

**Entwicklung und Charakterisierung sicherer CD4-
spezifischer retroviraler Vektoren des Typs
[MLV(SIVagm)] für die Gentherapie des Immunschwäche-
Syndroms AIDS**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Stefanie Steidl
aus Hanau

Frankfurt am Main 2001

DF1

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

Dekan:	Prof. Dr. Walter E. Müller
1. Gutachter:	Prof. Dr. Bernd Ludwig
2. Gutachter:	Prof. Dr. Klaus Cichutek
Datum der Disputation:	16.04.2002

Inhaltsübersicht

Einleitung	1
Retrovirale Vektoren für die Gentherapie	1
Aufbau und Lebenszyklus von Retroviren	2
Retrovirale Vektorsysteme	4
Bildung von Pseudotypvektoren durch den Austausch von Hüllproteinen	6
Risiko der Entstehung von Replikationskompetenten Retroviren	8
Die Korezeptoren der Primaten-Lentiviren	9
Ziel der vorliegenden Arbeit	12
Material und Methoden	14
Material und Methoden der Molekularbiologie	14
Material und Methoden der Zellbiologie	28
Material und Methoden zum Nachweis der Proteinexpression	42
Ergebnisse	49
Entwicklung und Charakterisierung von [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren	49
Konstruktion von MLV/SIVagm und MLV/HIV-1-Hybridviren	78
Diskussion	96
Zusammenfassung	112
Literatur	114
Abkürzungsverzeichnis	133

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Retrovirale Vektoren für die Gentherapie	1
1.2	Aufbau und Lebenszyklus von Retroviren	2
1.3	Retrovirale Vektorsysteme	4
1.4	Bildung von Pseudotypvektoren durch den Austausch von Hüllproteinen	6
1.5	Risiko der Entstehung von Replikationskompetenten Retroviren	8
1.6	Die Korezeptoren der Primaten-Lentiviren	9
1.6.1	Die Bedeutung des V3-Loops für die Korezeptornutzung	11
1.7	Ziel der vorliegenden Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Material und Methoden der Molekularbiologie	14
2.1.1	Plasmide und Bakterienstämme	14
2.1.2	Oligonukleotide	19
2.1.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
2.1.4	Restriktion und Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	23
2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.1.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	24
2.1.7	Ligation	24
2.1.8	Herstellung kompetenter Zellen	25
2.1.9	Transformation von Bakterien	26
2.1.10	Plasmid-Präparation	26
2.1.11	Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	26
2.1.12	Nukleotidsequenzbestimmung	26
2.2	Material und Methoden der Zellbiologie	28
2.2.1	Zellen und Kultivierung	28
2.2.1.1	Suspensionszellen	28
2.2.1.2	Adhärente Zellen	28
2.2.2	Präparation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	30
2.2.3	Stimulierung der PBMC	30
2.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.2.5	Transfektion von eukaryotischen Zellen	32
2.2.6	Synzytieninduktionsassay	33
2.2.7	Einzelzellklonierung stabil transfizierter Verpackungszellklone	33
2.2.8	Generierung von MLV-Pseudotyp-Vektorstocks	34
2.2.9	Konzentrierung von MLV-Pseudotyp-Vektorstocks	34
2.2.9.1	Ultrafiltration	34
2.2.9.2	Ultrazentrifugation	34
2.2.10	Transduktion von Zielzellen und Titration der Vektoren	35
2.2.11	Infektion von Zelllinien	36
2.2.12	Neutralisierung der Pseudotypvektoren durch Serum HIV-1-positiver Spender	36
2.2.13	Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten	36
2.2.14	Transduktion primärer Lymphozyten	37

2.2.15	Separation SIVagm Env-positiver Zellen mittels magnetischer Zell-Sortierung (MACS - "Magnetic Cell Sorting")	38
2.2.16	Analytische Durchflußzytometrie	39
2.2.16.1	Nachweis von EGFP in transduzierten Molt4/8	39
2.2.16.2	Nachweis von CD-Markern und Chemokinrezeptoren auf primären Blutlymphozyten	40
2.2.16.2.1	Analyse im Vollblut	40
2.2.16.2.2	Analyse von kultivierten und transduzierten PBLs	40
2.2.16.3	Nachweis der Expression von lentiviralen Hüllproteinen auf der Verpackungszelloberfläche	41
2.3	Material und Methoden zum Nachweis der Proteinexpression	42
2.3.1	Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität (X-Gal-Test)	42
2.3.2	Seren und Antikörper für den Nachweis viraler Proteine	42
2.3.3	<i>In-situ</i> -Immun-Peroxidase-Assay (IPA)	43
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.3.5	Western Blot	46
2.3.6	Nachweis der Reverse Transkriptase-Aktivität	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Entwicklung und Charakterisierung von [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren	49
3.1.1	Austausch der zu HIV-1 homologen V3-Loop-Sequenz des <i>env</i> -Gens von SIVagm durch einen CXCR4-tropen oder einen CCR5-tropen HIV-1 V3-Loop	49
3.1.2	Funktionalität der konstruierten SIVagm Env-Varianten im Synzytientest	52
3.1.3	Bildung von [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren	54
3.1.4	Etablierung stabiler Verpackungszellen für [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren	56
3.1.5	Expression von SIVagm Env in den Verpackungszellklonen	58
3.1.6	Anreicherung SIVagm Env-positiver Verpackungszellen	59
3.1.7	Expression von HIV-1 Env auf den stabilen Verpackungszellen	61
3.1.8	Konzentrierung von Vektorpartikeln	63
3.1.9	Transduktion von adhärenenten Zellen mit hoher MOI	65
3.1.10	Inkorporation der SIVagm-Hüllproteinvarianten in Vektor-Partikel	66
3.1.11	Korezeptornutzung von [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren	67
3.1.12	Neutralisierung der Vektoren durch Seren HIV-1-infizierter Spender	69
3.1.13	Transduktion von primären peripheren Blutlymphozyten (PBL)	70
3.1.13.1	Expression von CD4 und der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 auf humanen Spenderlymphozyten	70
3.1.13.2	Generierung von <i>egfp</i> -transferierenden Pseudotypvektoren zur Transduktion von primären humanen PBL	71
3.1.13.3	Die Transduktion von primären humanen PBL ist CD4-abhängig	72
3.1.13.4	Die Korezeptorspezifität bei der Transduktion von PBLs	76
3.2	Konstruktion von MLV/SIVagm und MLV/HIV-1-Hybridviren	78
3.2.1	Zielsetzung der Konstruktion von Hybridviren aus Onko- und Lentiviren	78
3.2.2	Klonierung der Hybridviren	78
3.2.3	Theoretische Spleißmuster der Hybridviren	80
3.2.4	Expression der Hybridvirus-kodierten Proteine in Transfektanden	83
3.2.4.1	Serologischer Nachweis der Expression viraler Proteine	83

3.2.4.2	Funktionalität der Hybridvirus-kodierten Hüllproteine im Synzytientest	84
3.2.4.3	Expression von Reverser Transkriptase	85
3.2.4.4	Die Rev-Aktivität der Hybridviren	85
3.2.5	Fähigkeit der Hybridviren zur Verpackung eines β -Galaktosidase transferierenden MLV-Vektors	88
3.2.6	Replikationskompetenz der Hybridviren bei Passagierung auf permissiven Zielzellen	89
3.2.6.1	Sezernierung von Reverser Transkriptase (RT) in Hybridvirus-infizierten Kulturen	91
3.2.6.2	Expression viraler Proteine in Hybridvirus-infizierten GHOST-Zellen	92
3.2.6.3	Nachweis proviraler DNA in Hybridvirus-infizierten Zielzellen	93
3.2.7	Hybridvirus-Infektion der humanen T-Zelllinie Molt4/8	94
4 Diskussion		96
4.1	Die Bedeutung des V3-Loops für die Korezeptornutzung	97
4.2	Etablierung stabiler Verpackungszelllinien	99
4.3	Konzentrierung von Pseudotypvektoren	100
4.4	Neutralisierungssresistenz der [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren gegenüber HIV-1-spezifischen Antikörpern	101
4.5	Gentransfer in humane periphere Blutlymphozyten	102
4.5.1	CD4-spezifische Transduktion	103
4.5.2	Korezeptorspezifität der Vektoren	104
4.6	Die Sicherheit von [MLV(SIVagm)]- und [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren	105
4.7	Proteinexpression der Hybridviren	106
4.8	Möglicher Einfluß der SD- und SA-Sequenzen auf die Env-Expression	106
4.9	Replikationskompetenz der Hybridviren	108
4.10	Sind [MLV(SIVagm)]- bzw. [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren sicher?	110
4.11	Ausblick	110
5 Zusammenfassung		112
5.1	Entwicklung und Charakterisierung von [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren	112
5.2	Konstruktion von MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-1-Hybridviren	113
6 Literatur		114
7 Abkürzungsverzeichnis		133

1 Einleitung

1.1 Retrovirale Vektoren für die Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man die Übertragung genetischer Informationen in Säugerzellen zu therapeutischen Zwecken. Der Gentransfer kann genutzt werden um Krankheiten, die durch (angeborene) genetische Defekte bedingt sind, zu therapieren. Es bestehen weitere Anwendungsmöglichkeiten in der Therapie verschiedener Formen von Krebs oder bei Infektionskrankheiten, wie z.B. AIDS.

Als Transfervehikel zur Übertragung von Genen werden häufig Retroviren verwendet. Ihre Eigenschaft, sich stabil in das Genom der Zielzelle zu integrieren, unterscheidet sie von den meisten anderen möglichen Vektoren (z.B. Adenovirusvektoren oder AAV-Vektoren). Sie wurden bereits vor über 10 Jahren in klinischen Studien eingesetzt (Culver *et al.*, 1991). Allerdings konnte erst kürzlich eine deutliche gesundheitliche Verbesserung durch retroviralen Gentransfer bei Patienten mit einer monogenetischen Erbkrankheit erzielt werden (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2001).

Bei der Entwicklung geeigneter Vektorsysteme gilt es, Probleme um die Dauer der Genexpression, die Gewebespezifität und die Effizienz der eingesetzten Vektoren zu lösen. Durch Modifikationen oder Ersetzen des retroviralen Promotors wurde das Abschalten der Transkription ("*Silencing*", Xu *et al.*, 1989) verhindert. Durch Verwendung gewebespezifischer Promotoren, heterologer Promotoren oder Verstärkerelemente für die Expression des Transgens konnte eine dauerhafte und effektive Expression in bestimmten Gewebetypen gewährleistet werden (Naviaux *et al.*, 1992; Zhao-Emonet *et al.*, 2000). Die gegenwärtigen Gentherapieverfahren sind hauptsächlich *Ex-vivo*-Verfahren, bei denen aus den Patienten Zellen isoliert, im Labor modifiziert und dem Patienten reimplantiert werden. Dadurch kann sichergestellt werden, daß nur die gewünschte Zellsubpopulation genetisch therapiert wird. Die primäre Zielzellgruppe für solche *Ex-vivo*-Therapien sind lympho-hämatopoetische Zellen, die leicht zu isolieren und einfach zu reinfundieren sind. Viele angeborene oder erworbene Erkrankungen treten jedoch in Zellen oder Organen auf, die sich nicht entfernen, kultivieren, modifizieren und reimplantieren lassen. Sie erfordern eine *In-vivo*-Gentherapie, bei der dem Patienten die Vektoren injiziert werden. Für den Therapie-Einsatz *in vivo* ist es notwendig, retrovirale Vektoren zu generieren, die gezielt eine gewünschte Zellsubpopulation ansteuern können. Zusätzlich sind hohe Titer Vorbedingung für eine effiziente *In-vivo*-Transduktion. Durch verschiedene

Modifikationen der Hülle der Vektoren konnte der Tropismus eingegrenzt werden, dies ging aber meist mit einem verringertem Titer der Virusvektoren einher (Buchholz *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 1999).

Zur Zeit sind die Gentransferverfahren - unabhängig von den im einzelnen angewandten Modifikation der Vektoren - relativ ineffizient. Die Effizienz ist jedoch der kritische Punkt bei einer erfolgreichen Anwendung in einem Gentherapieansatz am Menschen. Daher ist es nötig weiter an der Neuentwicklung von Vektorsystemen bzw. deren Verbesserung zu arbeiten.

1.2 Aufbau und Lebenszyklus von Retroviren

Die Familie der *Retroviridae* wird in drei Unterfamilien, nämlich die Onkoviren, Lentiviren und Spumaviren, eingeteilt. Die Gruppe der Onkoviren ist nochmals in fünf Genera (B-Typ-Viren, C-Typ-Viren der Säuger, C-Typ-Viren der Vögel, D-Typ-Viren und die HTLV-/BLV-Gruppe) unterteilt. Alle Retroviren sind ähnlich aufgebaut. Es sind umhüllte Viren mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm, deren Genom aus Einzelstrang-RNA besteht. Alle Retrovirus-Partikel enthalten zwei identische RNA-Moleküle, die wie typische eukaryotische mRNAs am 5'-Ende eine 7-Methylguanin-Kappe und am 3'-Ende einen poly(A)-Schwanz tragen.

Die Genome aller Retroviren sind ähnlich aufgebaut und enthalten drei proteinkodierende Genbereiche, die für die Vermehrung des Virus erforderlich sind (Abb. 1.1). Diese enthalten die Informationen

- für virale Kapsid-Proteine und Proteine des sogenannten Virus-Core (innere Strukturproteine; *gag*, für "*group-specific-antigens*"). Synthetisiert werden die Gag-Proteine als gemeinsames Vorläuferprodukt (Polyprotein), das durch die virale Protease in die einzelnen Komponenten gespalten wird.
- für eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, auch reverse Transkriptase (RT) genannt (*pol*, für "*polymerase*") und andere virusassoziierte Enzyme (Protease, Integrase und RNase H), und
- für die Glykoproteine in der viralen Lipidhülle (*env*, für "*envelope*").

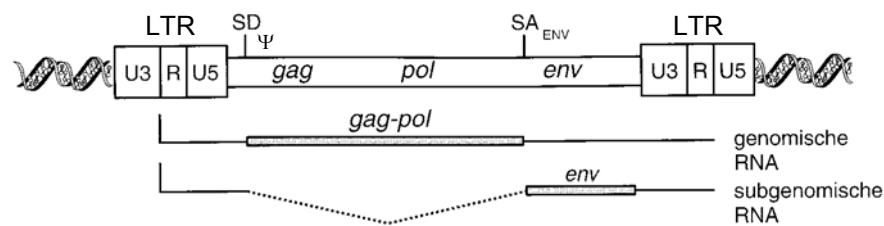


Abb. 1.1 Genomaufbau eines einfachen Retrovirus.

Retrovirales Provirus, das die *gag*, *pol* und *env*-Gene umfaßt. SD - Spleißdonor; SA - Spleißakzeptor; LTR - "long terminal repeat"; ψ - Psi (Verpackungssequenz); (Abbildung modifiziert nach Günzburg, W., 1997).

Komplexe Retroviren wie die zu den Lentiviren gehörenden Immundefizienzviren können weitere Gene (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpx* oder *vpu*; Johnson *et al.*, 1992; Hirsch *et al.*, 1994a; Barré-Sinoussi *et al.*, 1996) enthalten. Diese übernehmen regulatorische Funktionen während der Transkription (*tat*) und der RNA-Reifung (*rev*) und sind für die Partikelreifung (*vif*, *vpr*) sowie deren Freisetzung (*vpu*, *nef*) wichtig.

Zur Infektion einer Wirtszelle bindet das Virus mit seinen Hüllproteinen an Rezeptoren in der Zellmembran. Nach dem Zelleintritt wird die virale RNA von der mitgebrachten reversen Transkriptase (RT) im Zytoplasma der Wirtszelle in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Es entstehen DNA-Moleküle, die beiderseits von direkten Sequenzwiederholungen (LTR, für "long terminal repeat") eingefaßt sind. Die lineare, doppelsträngige DNA gelangt in den Zellkern und wird dort mit Hilfe der viruseigenen Integrase (IN) in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Der Ort der Integration des Virusgenoms ins Wirtszellgenom ist zufällig. Die integrierte virale DNA wird als Provirus bezeichnet. Eine Konsequenz der Integration ist die stabile Vererbung des Provirus auf alle Tochterzellen einer infizierten Zelle.

Die integrierte Virus-DNA wird wie ein zelluläres Gen von der zellulären RNA-Polymerase II transkribiert, wobei ein Abschnitt in der 5'-LTR als Promotor dient und der 3'-LTR-Bereich Sequenzen für die Polyadenylierung der RNA enthält. Dabei entstehen zum einen Transkripte, die mit der genomischen viralen RNA identisch sind, zum anderen entstehen durch Spleißung subgenomische mRNAs. Alle mRNAs dienen der Translation und Herstellung der Virusproteine, während ausschließlich die virale Vollängen-RNA als neues Genom für Nachkommenviren in das Kapsid verpackt wird. Eine spezifische Sequenz der genomischen viralen RNA fungiert als Verpackungssignal (Psi (Ψ)). Es liegt zwischen der 5'-LTR und dem Start-Kodon der für das Gag-Pol-Polyprotein kodierenden Region (Mann, R., *et al.*, 1983).

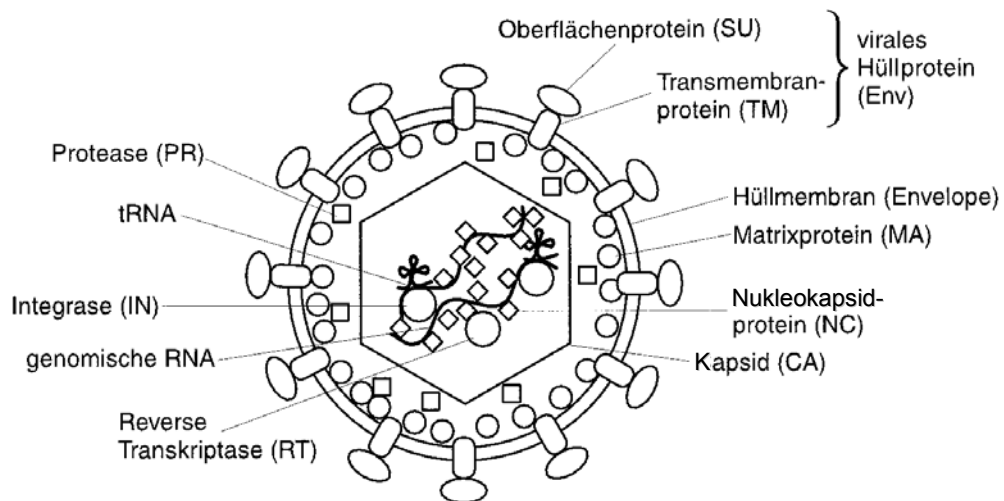


Abb. 1.2 Schematischer Aufbau eines Retroviruspartikels.

Aus den viralen Proteinen bilden sich die umhüllten Viruspartikel. (Abbildung modifiziert nach Günzburg, W., 1997).

Nach der Genexpression und Prozessierung bilden sich die Viruspartikel (Abb. 1.2). Sie verlassen die Zelle durch "Knospung". Dabei werden sie von der Zytoplasmamembran umschlossen. In die umschließende Membran sind virale Hüllproteine, kodiert vom *env*-Gen des Virus, eingebaut. Sie bestehen aus einem Transmembranprotein (TM) mit einer Transmembranregion (TMR) und einem an der Außenseite der Virushülle an das TM-Protein gekoppelten Oberflächenhüllprotein (SU, für "surface"-Protein). Beide werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet. Die Spaltung erfolgt durch eine zelluläre Protease. Das SU-Protein interagiert spezifisch mit dem Virusrezeptor an der Oberfläche der Zielzelle und vermittelt die Virusaufnahme. Die An- bzw. Abwesenheit eines geeigneten Rezeptors auf der Zielzelle legt fest, ob die Zelle von einem bestimmten Virus infiziert werden kann oder nicht.

1.3 Retrovirale Vektorsysteme

Der Begriff "retrovirale Vektoren" bezeichnet infektiöse, aber nicht vermehrungsfähige Retroviren, welche Expressionsvektoren als Genom tragen und in permissive Zielzellen übertragen (Transduktion). Diese verpackbaren Transfervektoren beinhalten in der Regel keine viralen Strukturgene. An Stelle der viralen Gene können therapeutische Gene oder Reportergene inseriert werden, deren Expression in den Wirtszellen durch die viralen oder heterologen Promotor-/Enhancerelemente

gewährleistet wird. Das Verpackungssignal (Psi (ψ)) erlaubt die Verpackung von RNA-Transkripten des Transfervektors in die retroviralen Vektorpartikel. Die Strukturproteine Gag, Pol und Env werden von sogenannten Verpackungszellen *in trans* von Psi-negativen mRNAs gebildet (Abb. 1.3).

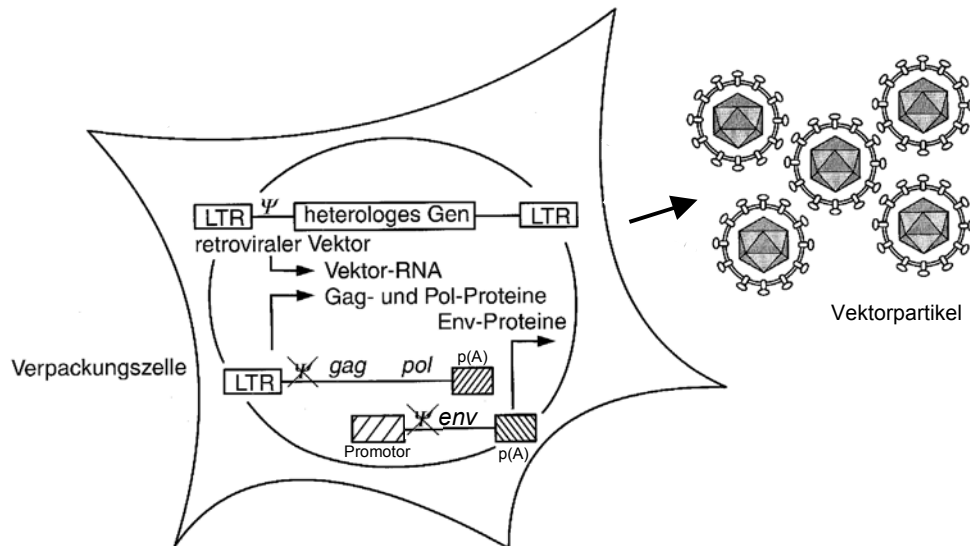


Abb. 1.3 Aufbau einer Verpackungszelle für den retroviralen Gentransfer.

Aus sicherheitsrelevanten Aspekten werden die viralen Proteine Gag/Pol und Env von getrennten Konstrukten kodiert. Nur das Psi-positive Vektorgenom wird verpackt und in die nächste Zielzelle übertragen (Abbildung modifiziert nach Günzburg, W., 1997). LTR - „long terminal repeat“; p(A) - Polyadenylierungssequenz

Aufgrund der guten Charakterisierung der Retroviren konnte man mittlerweile eine Reihe verschiedener Retrovirus-Vektorsysteme entwickeln. Unter anderem wurden Vektoren vom Milz Nekrose Virus (SNV - „spleen necrosis virus“; Chu *et al.*, 1994), Rous Sarkom Virus (RSV; Bell *et al.*, 1997), Avian Leukose Virus (ALV; Valsesia-Wittmann *et al.*, 1994) und dem humanen Foamy Virus (HFV; Schmidt *et al.*, 1995) entwickelt. Auch auf der Basis von Lentiviren wurden verschiedene Vektorsysteme entwickelt (Page *et al.*, 1990; Rizvi *et al.*, 1992).

Das am häufigsten für die Konstruktion retroviraler Vektoren verwendete Retrovirus ist das Murine Leukämie Virus (MLV; McLachlin *et al.*, 1990). Die Rezeptoren für zwei verschiedene Formen des MLV SU-Proteins sind bekannt. Das ecotrope SU-Protein interagiert mit einem kationischen Aminosäuretransporter (Rec-1) auf der Oberfläche der Zielzelle (Kim *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Dieses Protein wird nur in Mäusezellen exprimiert und limitiert daher das Infektionsspektrum von MLV (Typ Moloney). Im Gegensatz hierzu interagiert das amphotrope SU-Protein mit einem

verbreiteten zellulären Natrium-Phosphat-Symporter (Ram-1) und erlaubt auch die Infektion anderer Zellen (Miller *et al.*, 1994; van Zeijl *et al.*, 1994). Mit amphotropen Vektoren konnten auf humanen Zellen Titer von 10^6 infektiösen Einheiten pro ml (i.E./ml) erreicht werden.

Mit Hilfe von MLV-abgeleiteten Vektoren können nur proliferierende Zellen transduziert werden, da für den Eintritt des MLV-Kapsids in den Kern die Auflösung der Kernmembran nötig ist. Hämatopoetische Stammzellen und viele Gewebearten des menschlichen Organismus, wie z.B. Nervenzellen, ruhen jedoch. Lentiviren sind gegenüber MLV in der Lage auch ruhende Zellen zu infizieren. Von den humanen und simianen Immundefizienzviren (HIV und SIV) abgeleitete Vektoren können deshalb auch ruhende Zellen transduzieren (Vigna *et al.*, 2000; Palu *et al.*, 2000). HIV-Vektoren bergen theoretisch die Gefahr, AIDS auszulösen, weshalb für deren Einsatz in der Gentherapie lange Zeit nur geringe Akzeptanz herrschte.

1.4 Bildung von Pseudotypvektoren durch den Austausch von Hüllproteinen

Der Tropismus von Retroviren wird durch die spezifische Interaktion des externen viralen Oberflächen-Hüllproteins (SU) mit den zellulären Oberflächenproteinen determiniert. Bei gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit zwei verschiedenen Viren kann eine phänotypisch gemischte Virusgeneration produziert werden (Pseudotypviren). Sie besteht aus Viruspartikeln, die in ihrer Hülle Env-Proteine von zwei Viren enthalten und zeigt dabei das Infektionsspektrum beider parentaler Virusarten (Zavada *et al.*, 1972). Diese Beobachtung ist die Grundlage der Entwicklung von Pseudotypvektoren.

Durch den Austausch des kompletten Hüllproteins von MLV durch heterologe Hüllproteine kann der Tropismus oder andere Eigenschaften des Hüllproteinspenders auf MLV-Vektoren übertragen werden. Durch die Verwendung der Hüllproteine des Gibbon Leukämie Virus ("*Gibbon Ape Leukemia Virus*"- GaLV; Wilson *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1991; von Kalle *et al.*, 1994) konnte z.B. die Transduktionseffizienz für hämatopoetische Zellen verbessert werden, da auf diesen die Expressionsdichte des GaLV-Rezeptors (Kavanaugh *et al.*, 1994) im Vergleich zum amphotropen MLV-Rezeptor erhöht ist. Durch die Verwendung des Hüllproteins des feline endogenen Retrovirus (RD114; Takeuchi *et al.*, 1994; Cosset *et al.*, 1995) konnten Vektoren entwickelt werden, die gegenüber dem humanen Komplementsystem resistent sind. MLV-Pseudotypen können nicht nur mit Hüllproteinen anderer C-Typ Retroviren

gebildet werden. Die Verwendung des G-Proteins des vesikulären Stomatitisvirus ("Vesicular Stomatitis Virus" - VSV), ein Rhabdovirus, führte zur Bildung von Pseudotypen, die sich als sehr stabil erwiesen und sich deshalb durch Ultrazentrifugation zu hochtitrigen Vektorstocks (10^9 i.E./ml) konzentrieren ließen (Burns *et al.*, 1993; Yee *et al.*, 1994).

Teilweise sind zur Inkorporation der heterologen Hüllproteine in das Viruspartikel Modifikationen am C-Terminus des jeweiligen TM-Proteins nötig. Zur Pseudotypisierung von MLV mit den Hüllproteinen des humanen Foamyvirus (HFV; Lindemann *et al.*, 1997) mußte dessen C-Terminus gekürzt und der komplette C-Terminus von MLV anfusioniert werden.

Neben MLV lassen sich auch HIV-Vektoren mit verschiedenen Hüllproteinen pseudotypisieren, am gängigsten ist die Verwendung von VSV-G (Akkina *et al.*, 1996). Die Pseudotypisierung mit den Env-Proteinen des GaLV konnte durch die Insertion der MLV-Protease-Spaltstelle in den C-Terminus des GaLV TM-Proteins (Christodoulopoulos *et al.*, 2001) oder dessen Trunkierung (Stitz *et al.*, 2000b) erreicht werden.

Alle bisher genannten Pseudotypen können jedoch nicht zielgerichtet und zelltypspezifisch transduzieren, da sie ubiquitäre Rezeptoren benutzen, die auf vielen humanen Zellpopulationen zu finden sind. Sie werden deshalb bevorzugt in *Ex-vivo*-Anwendungen eingesetzt. Eine *In-vivo*-Gentherapie beruht auf der direkten Gabe des Vektors in den Patienten. Hierbei ist ein gezieltes Ansteuern ausschließlich des gewünschten Zielgewebes oder -organs von Nöten, um die therapeutischen Effekte auf diese Zellen einzugrenzen. Eine zielgerichtete Übertragung von Genen kann man durch die Verwendung von Hüllproteinen erreichen, die von Viren mit einem engen Infektionsspektrum stammen, wie etwa den humanen und simianen Immundefizienzviren (HIV und SIV). Von mehreren Gruppen konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung lentiviraler Hüllproteine der Wirtszelltropismus der MLV-basierenden Vektoren auf CD4-positive Zellen eingeschränkt wurde. Es wurden die Hüllproteine des HIV-1 (Schnierle *et al.*, 1997; Mammano *et al.*, 1997; Lodge *et al.*, 1998), HIV-2 (Höhne *et al.*, 1999), SIVagm (Afrikanische Grüne Meerkatze; Stitz *et al.*, 2000a) und SIVmac (Rhesusaffe; Indraccolo *et al.*, 1998) verwendet. Zur Pseudotypisierung der MLV-Kapside mußte der zytoplasmatische Anteil der TM-Proteine des HIV-1, HIV-2 und SIVagm trunkiert werden. Mit diesen Vektoren stehen vielversprechende Vektoren für Gentherapie-Anwendungen zur Bekämpfung der HIV-

Infektion bzw. für die Behandlung von AIDS zur Verfügung, da sie die Wirtszellen des HIV spezifisch ansteuern können.

Die mit dem HIV-1 Env pseudotypisierten MLV-Vektoren werden jedoch durch Serum HIV-1-positiver Spender neutralisiert (Schnierle *et al.*, 1997) und könnten daher bei bereits infizierten Personen nicht *in vivo* angewendet werden. Durch die Verwendung der Hüllproteine des SIVagm gelang die Entwicklung eines ebenfalls CD4-spezifischen Vektors, der der Neutralisation durch HIV-spezifische Antikörper entgehen kann und sich damit besonders für eine *In-vivo*-Therapie des Immunschwächesyndroms AIDS anbietet (Stitz *et al.*, 2000a).

1.5 Risiko der Entstehung von replikationskompetenten Retroviren

In den ersten MLV-Verpackungszellgenerationen kam es durch die Anwesenheit längerer Bereiche mit gleicher Sequenz zwischen dem für die Strukturproteine kodierenden Konstrukt und dem Transfervektor häufig zu Rekombinationen (Muenchau *et al.*, 1990). Sie führten zur Bildung von einem erneut replikationskompetenten Retrovirus ("*replication competent retrovirus*" - RCR). Die Übertragung eines replikationskompetenten Retrovirus auf den Patienten gilt als eines der Hauptrisiken bei der Anwendung retroviraler Vektoren in der Gentherapie. Primaten entwickelten T-Zell-Lymphome, nachdem ihnen autologes Knochenmark transplantiert wurde, welches mit einem RCR-verunreinigten Vektorstock transduziert worden war (Donahue *et al.*, 1992).

Um die Entstehung von RCRs in Verpackungszellen zu vermeiden, wurden die *env* und *gag/pol*-Gene auf getrennten Konstrukten in die Zellen eingebracht (Abb. 1.3). Bei solchen Vektorsystemen sind mehrere Rekombinationsereignisse für die Entstehung eines replikationskompetenten Retrovirus erforderlich (Markowitz *et al.*, 1988 a, b). Durch die Verwendung von heterologen Expressionskassetten wurden zusätzlich Sequenzhomologien abgebaut. Aber auch in diesen als sicher geglaubten Vektorsystemen der dritten Generation, den sog. "*split packaging cell lines*" wurde in Einzelfällen die Entstehung von RCRs nachgewiesen. In der auf murinen NIH3T3-Zellen basierenden amphotropen Verpackungslinie GP+envAM12 kam es durch mehrere Rekombinationen zwischen dem Transfervektor, den viralen Strukturproteinkodierenden Konstrukten und endogenen viralen Sequenzen zur Bildung eines erneut replikationskompetenten amphotropen Retrovirus (Chong *et al.*, 1996 und 1998). Die

Verwendung von Nicht-Maus-Zellen als Basis retroviraler Verpackungszellen vermindert die Gefahr einer Rekombination mit sequenzähnlichen endogenen murinen Viren.

Das Risiko der Entstehung eines RCRs ist bei Pseudotypvektoren zusätzlich gemindert. Durch die Verwendung von Strukturgenen verschiedener Parentalviren werden die für eine Rekombination dieser Gene notwendigen Sequenzhomologien minimiert. Sollte es doch zu einer Rekombination kommen, so entsteht durch die Kombination von Strukturgenen und regulatorischen Sequenzen unterschiedlicher Virustypen ein Hybridvirus, das nicht replikationsfähig sein muß. Bis heute konnte aus den etablierten Pseudotypverpackungszelllinien kein derartiges replikationskompetentes Hybridvirus isoliert werden. Zur Abschätzung des Risikos solcher Hybridviren, wie z.B. zwischen MLV und HIV-1, müßten diese gentechnisch konstruiert und auf ihre Replikationsfähigkeit überprüft werden. Reiprich *et al.* (1997) gelang die Entwicklung eines replikationskompetenten Hybridvirus zwischen einem Lentivirus und einem Typ C (Onko-) Retrovirus. Hierbei wurde im Genom von SIVmac das *env*-Gen gegen das *env*-Gen des amphotropen MLV (4070A) ersetzt. Das Hybridvirus zeigt einen erweiterten Wirtszelltropismus, es kann im Vergleich zum Ausgangsvirus auch in CD4-negativen humanen Zellen replizieren.

1.6 Die Korezeptoren der Primaten-Lentiviren

Während man bei der überwiegenden Mehrheit der Retroviren über die Art der Rezeptorbindung und die daran beteiligten zellulären Strukturen nur wenig weiß, sind die viralen und zellulären Reaktionspartner von HIV bekannt: Über gp120-SU interagiert HIV-1 mit der ersten immunoglobulinähnlichen Domäne des CD4-Proteins auf der Oberfläche der T-Helferzellen. Die von CD4 unabhängige Zellinfektion wurde zwar beschrieben, kann aber als Ausnahme betrachtet werden (Dumonceaux *et al.*, 1998; Hoxie *et al.*, 1998; Endres *et al.*, 1996). Zusätzlich zum primären CD4-Rezeptor dienen sieben Membrandurchgänge enthaltende G-Protein-gekoppelte Chemokin-Rezeptoren als essentielle Korezeptoren für die Lentiviren der Primaten (Doms *et al.*, 1997; Bieniasz *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 1996). Die Verwendung unterschiedlicher Korezeptoren durch verschiedene Stämme ist verantwortlich für deren unterschiedliche Tropismen. T-zelltrope HIV-1 Isolate benutzen bevorzugt den Korezeptor CXCR4 (Fusin; Feng *et al.*, 1996), während makrophagentrope HIV-1 Isolate (Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996, Deng *et al.*, 1997; Dragic *et al.*, 1996) CCR5 nutzen. Neben

CXCR4 und CCR5 wurden noch weitere Chemokinrezeptoren, wie CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR8, Bob (STRL33), Bonzo (GPR15), V28, US28 and APJ als Korezeptoren entdeckt (Berger *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000).

Bis auf zwei Isolate (SIV_{mand} für "mandrill", Schols *et al.*, 1998 und SIV_{rcm} für "red-capped mangabeys", Chen *et al.*, 1998) nutzen alle derzeit bekannten SIV-Stämme vorwiegend den Korezeptor CCR5 und nicht CXCR4 zum Zelleintritt. Meist wird neben CCR5 ein weiterer oder mehrere Korezeptoren, allerdings mit geringerer Effizienz, genutzt (Chen *et al.*, 1997; Edinger *et al.*, 1997; Marcon *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998). Der Molekularklon agm₃ des SIV der Afrikanischen Grünen Meerkatze nutzt neben CCR5 z.B. die Korezeptoren Bob und Bonzo (Stitz *et al.*, 2000a; König *et al.*, in Vorbereitung).

Die Expressionsstärke und das Verteilungsmuster der Korezeptoren CXCR4 und CCR5 auf primären humanen Blutlymphozyten (PBL) ist individuell unterschiedlich. Während CXCR4 auf den unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen außer den erythroiden Zellen exprimiert wird, zeigen nur Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen und T-Zellen eine nennenswerte CCR5-Expression. Der Prozentsatz CD4/CXCR4-positiver Zellen liegt zwischen 30 und 50%, der Prozentsatz CD4/CCR5-positiver Zellen zwischen 2 und 6% der Gesamt-PBL (Bleul *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Betrachtet man die CD4-positiven T-Lymphozyten, so wird CCR5 präferentiell auf Memory-Zellen (CD45RO⁺) exprimiert, die hauptsächlich in den peripheren Geweben zu finden sind. Naive, unstimulierte T-Zellen (CD45RO⁻) dagegen exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR4. CCR5 wird nicht auf naiven T-Zellen exprimiert, CXCR4 wird auf Memory-Zellen in signifikant niedrigerer Dichte exprimiert als CCR5 (Lee *et al.*, 1999). Nach Unutmaz *et al.* (2000) korreliert die Expression von CCR5 und Bonzo. Die Expression von CCR3 ist hauptsächlich auf Astrozyten, Gliazellen und Neuronen des zentralen Nervensystems nachgewiesen worden und wird deshalb oft in Verbindung gebracht mit neurovirulenten HIV-Stämmen und einer entsprechenden Neuropathogenese (Klein *et al.*, 1999, Lavi *et al.*, 1998). Die primäre Infektion mit HIV-1 erfolgt in nahezu 100% der Fälle mit CCR5-tropen Viren. Das Auftreten CXCR4-troper HIV-Isolate ist assoziiert mit dem Voranschreiten der Krankheit hin zu AIDS (Connor *et al.*, 1997; Scarlatti *et al.*, 1997).

1.6.1 Die Bedeutung des V3-Loops für die Korezeptornutzung

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen in gp120-SU verschiedener HIV-1-Isolate, so fällt die hohe Variabilität auf, die man vor allem fünf Bereichen (V1 bis V5) zuordnen kann. Diese sind voneinander durch Abschnitte getrennt, die im Vergleich zu den V-Regionen einen relativ hohen Konservierungsgrad haben (C1 bis C6). Die V3-Domäne hat unter den variablen Bereichen eine besondere Stellung: Sie ist 30 bis 36 Aminosäuren lang und wird von Cysteinresten flankiert, die sich zu einer Disulfidbrücke schließen und die Bildung einer oberflächenexponierten V3-Proteinschleife induzieren (Abb. 1.4).

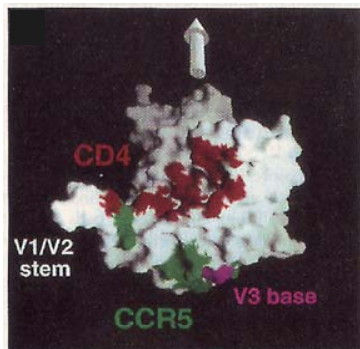


Abb. 1.4 Räumliche Darstellung der Oberfläche von HIV-1 gp120-SU.

Mutations- und Röntgenkristallographische Strukturanalysen des HIV-1 gp120-SU im Komplex mit löslichem CD4 oder verschiedenen Antikörpern führten zur genaueren Charakterisierung der Binderegionen auf der Oberfläche von gp120-SU. Der mit CD4-interagierende Bereich ist Rot gekennzeichnet. Die mit der Chemokinrezeptorbindung (hier CCR5) in Verbindung gebrachten Regionen sind Grün eingefärbt. Diese Analysen konnten jedoch nur an V3-Loop deletierten gp120-SU durchgeführt werden. Die Basis des ansonsten exponierten V3-Loops ist Pink gekennzeichnet. Der Pfeil gibt die Orientierung des gp120-SU in Richtung zur Virushülle an (Abbildung modifiziert nach Wyatt *et al.*, 1998).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, daß der V3-Loop direkt mit dem Korezeptor interagiert (Trkola *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997). Voraussetzung für die Bindung des Korezeptors ist allerdings die Interaktion des HIV-SU-Proteins mit dem CD4-Molekül. Die Bindung von CD4 bewirkt eine Konformationsänderung im gp120-SU, bei der der V3-Loop freigelegt wird (Moore *et al.*, 1993). Erst dann kann der Chemokinrezeptor gebunden werden. Diese Bindung führt zu einer weiteren Konformationsänderung. Am aminoterminalen Bereich von gp41-TM kommt es zur Umlagerung einer hydrophoben Sequenz, dem sogenannten Fusionspeptid, welches die Fusion der Virus- mit der Zytoplasmamembran der zu infizierenden Zelle vermittelt (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997).

Die Sequenz des V3-Loops hat somit Einfluß auf die Wahl des genutzten Korezeptors (Hwang *et al.*, 1991; Shioda *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 1998). Für HIV-1 wurde gezeigt, daß Isolate mit einem V3-Loop mit einem hohen Anteil basischer

Aminosäuren mit hoher Effizienz den Korezeptor CXCR4 nutzen (De Jong *et al.*, 1992; Fouchier *et al.*, 1992; Okada *et al.*, 1994). Für die Nutzung von CCR5 durch HIV-1 konnte eine Konsensus-Sequenz für den V3-Loop festgestellt werden (Xiao *et al.*, 1998). Der Austausch der V3-Loops zwischen einem CCR5-nutzenden und einem CXCR4-nutzenden HIV-1 Isolat führt zum Korezeptorwechsel der resultierenden Viren (Speck *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1999; LaBranche *et al.*, 1999; Isaka *et al.*, 1999). Die V1/V2-Region hat neben dem V3-Loop einen geringeren Einfluß auf die Wahl des genutzten Korezeptors (Hoffman *et al.*, 1998; Koito *et al.*, 1995, Stamatatos *et al.*, 1998). Die Analyse der V3-Loop-Sequenz von 15 primären HIV-2 Isolaten zeigte dagegen kein spezifisches Motiv bezüglich der Korezeptornutzung (Owen *et al.*, 1998).

Über den Einfluß der zu HIV-1 homologen V3-Loop-Region bei der Korezeptorbindung von SIV wird noch spekuliert (Hirsch *et al.*, 1994b). Im Unterschied zu HIV ist der V3-Loop der SIV-Stämme eher konserviert (Almond *et al.*, 1992; Overbaugh *et al.*, 1991). Weder die Insertion basischer Aminosäuren in den V3-Loop (Meister *et al.*, 2001), noch die Insertion des V3-Loops eines CXCR4-gängigen HIV-1 in das SU-Protein des SIVmac führten zur Nutzung des Korezeptors CXCR4 (Kirchhoff *et al.*, 1994; Mamounas *et al.*, 1995). Die HIV-1-V3-Loop-homologe Sequenz in SIVagm-SU (Müller *et al.*, 1993) wurde bisher noch nicht auf ihre Rolle bei der Korezeptornutzung untersucht.

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der Arbeit war die Entwicklung effizienter und sicherer CD4-spezifischer, mit Varianten des SIVagm Env pseudotypisierter MLV-Vektoren ([MLV(SIVagm)]), die für eine Anwendung im Rahmen der Gentherapie gegen AIDS geeignet sind.

Dazu sollte zuerst die Nutzung der Korezeptoren des Wildtyp-SIVagm Env von CCR5/Bonzo auf CXCR4 geändert werden, da CXCR4 im Gegensatz zu CCR5 und Bonzo von der Mehrzahl CD4-positiver Zellen exprimiert wird. Dies sollte durch den Austausch der zu HIV-1 homologen V3-Loop-Region des SIVagm-SU gegen den V3-Loop eines T-zelltropen HIV-1 erreicht werden. Die neu generierte Env-Variante sollte zur Pseudotypisierung von MLV-Vektoren eingesetzt werden. Die resultierenden [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren sollten auf ihre Korezeptornutzung und ihre Neutralisationsresistenz gegenüber HIV-1-spezifischen Antikörpern getestet werden.

Ihre Eignung zur selektiven Transduktion proliferierender primärer humaner Blutlymphozyten sollte erneut analysiert werden.

Die mögliche Entstehung von erneut replikationskompetenten Retroviren in Verpackungszellen muß bei der Entwicklung von Vektoren sorgfältig geprüft werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte deshalb in einem "*worst case scenario*" die mögliche Vermehrungsfähigkeit gentechnisch konstruierter Hybridviren des Typs MLV/SIVagm und MLV/HIV-1 analysiert werden. Hierzu sollten Hybridviren generiert werden, bei denen am wahrscheinlichsten eine Fähigkeit zur Replikation zu erwarten ist. Anschließend sollte ihre Replikationskompetenz *in vitro* überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Methoden der Molekularbiologie

2.1.1 Plasmide und Bakterienstämme

A) Konstrukte für die Expression von viralen Hüllproteinen:

pL128 - Kodiert für das C-terminal trunkierte Hüllprotein (HIV-1tr712) und das Rev-Protein des humanen Immundefizienzvirus vom Typ 1 ("*Human Immunodeficiency Virus type 1*"; HIV-1). Es wurde von Valerie Bosch, Heidelberg, zur Verfügung gestellt (Wilk *et al.*, 1992). Dabei entstammt das erste Exon des *rev*-Gens, das komplette Oberflächenprotein (SU) des HIV-1 Hüllproteins und das 7 Aminosäuren nach der Transmembranregion (TMR) trunkierte TM-Protein, einschließlich dem Rev-responsiven Element (RRE) dem CXCR4-tropen HIV-1-Moleklarklon HIV-1_{BH10} (Wong-Staal *et al.*, 1985; GenBank Accession Nr. M15654), während das zweite *rev*-Exon vom HIV-1-Moleklarklon HIV-1_{NL-4.3} (GenBank Accession Nr. AF324493) abgeleitet wurde. Als Hauptkorezeptor dient CXCR4, weshalb das Hüllprotein mit HIV-X4 benannt wurde. Die Transkription des *env*-Gens wird von einem β -Aktin-Promotor gesteuert und von einem Polyadenylierungssignal der Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase (HSV-TK poly(A)) abgeschlossen. Für die Selektion in eukaryotischen Zellen besitzt das Plasmid eine G418 Resistenz-vermittelnde Selektionskassette.

pL128MBK - Durch Austausch der V3-Loop Region und angrenzender Bereiche der HIV-1_{BH10} *env* cDNA in pL128 (über *StuI* - *Bsu36*) gegen die entsprechende Region des makrophagentropen HIV-1 Primärisolats MBK (Cichutek *et al.*, 1992) wurde ein Plasmid erhalten, welches für ein C-terminal trunkiertes, CCR5-gängiges HIV-1 Hüllprotein kodiert (P. Müller, Dissertation, 1999). Als Hauptkorezeptor nutzt das resultierende HIV-1 Hüllprotein CCR5, weshalb es als HIV-R5 bezeichnet wurde. Das Plasmid wurde von Dr. P. Müller, PEI, Langen zur Verfügung gestellt.

pCMV-NLenv Δ 712 - Die cDNA des HIV-1_{NL-4.3} *env*-Gens wird in diesem Konstrukt von einem CMV-Promotor getrieben. Das TM-Protein ist 7 Aminosäuren nach der Transmembranregion (TMR) analog zu HIV-1_{BH10} Env in pL128 an Position 712 trunkiert. Die flankierenden Leserahmen für *rev* sind deletiert, dadurch ist die

Expression von Env auf die Anwesenheit von Rev *in trans* angewiesen. Das Konstrukt wurde von Dr. H. Merget-Militzer, PEI, Langen zur Verfügung gestellt.

pRep Δ 10env - Kodiert für das trunkierte Env-Protein des simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (*Chlorocebus aethiops*) ("Simian Immunodeficiency Virus"; SIVagm; Stitz *et al.*, 2000a). Die kodierende env-Region, sowie die flankierenden Exons des rev-Gens entstammen dem SIVagm-Moleklarklon agm₃ (Baier *et al.*, 1990; GenBank Accession Nr. M30931). Die Transkription wird von einem RSV LTR Promotor und einem Polyadenylierungssignal des SV40 (SV40 poly(A)) gewährleistet (pRep4, Promega). Der zytoplasmatische Anteil des TM-Proteins wurde 7 Aminosäuren nach der TMR deletiert, klonierungsbedingt folgen drei Alanine, womit ein zytoplasmatischer Anteil mit einer Länge von 10 Aminosäuren entstand. Das Konstrukt enthält außerdem eine Hygromycin Resistenz-vermittelnde Expressionskassette zur Selektion in eukaryotischen Zellen.

pRep Δ 10env-X4* und **pRep Δ 10env-R5*** - Diese Konstrukte kodieren für trunkierte SIVagm-Hüllproteinvarianten. Es wurden die 34 Aminosäuren des potentiellen V3-Loops des Wildtyp-SIVagm Env durch die 36 Aminosäuren des V3-Loops aus dem Hüllprotein des CXCR4-zelltropen HIV-1-Moleklarklon HIV-1_{BH10} (pL128) bzw. die 35 Aminosäuren des CCR5-tropen HIV-1-Moleklarklons HIV-1_{SF162} (pHIVSF162env; GenBank Accession Nr. M65024) mittels Fusions-PCR (Methode nach Horton *et al.*, 1989) ausgetauscht. Es entstanden die Hüllproteinvarianten SIVagm-X4 bzw. SIVagm-R5.

pRep Δ 7MLVenv - Das Konstrukt kodiert neben dem Vollängen SIVagm-SU für ein chimäres TM-Protein, bestehend aus dem C-terminal trunkierten SIVagm-TM und dem C-Terminus des amphotropen MLV Env (4070A; Gen Bank Accession Nr. M33469). Es wurde von Dr. J. Stitz, PEI zur Verfügung gestellt. Der zytoplasmatische Anteil des TM-Proteins wurde 7 Aminosäuren nach der TMR deletiert und der 32 Aminosäuren umfassende C-Terminus des MLV anfusioniert. Klonierungsbedingt wurde dadurch der Leserahmen des 2. rev-Exons von SIVagm zerstört. Entstanden ist ein Expressionskonstrukt für SIVagm-SU mit einem chimärem TM, welches zur Expression auf die Anwesenheit von Rev *in trans* angewiesen ist.

pALF-MLV-A - Es handelt sich um ein Expressionskonstrukt für das Hüllprotein des amphotropen murinen Leukämie Virus 4070A (Gen Bank Accession Nr. M33469). Es wurde von Dipl. Biochem. I. Schmitt, PEI, Langen zur Verfügung gestellt. Die Transkription des *env*-Gens wird von einem FB29 LTR-Promotor gesteuert (Cosset *et al.*, 1995). Das Plasmid enthält eine Phleomycin Resistenz-vermittelnde Genkassette für die Selektion in eukaryotischen Zellen.

B) Konstrukte für virale Vollängengenome:

pNL-4.3 - Kodiert für die Vollängensequenz des humanen Immundefizienzvirus HIV-1_{NL-4.3} (Adachi *et al.*, 1986, GenBank Accession Nr. AF324493).

pMB2 - Kodiert für die Vollängensequenz des simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (*Chlorocebus aethiops*, Molekularklon SIVagm₃ (Baier *et al.*, 1990; GenBank Accession Nr. M30931)). Es wurde von Dr. M. Baier, PEI, Langen zur Verfügung gestellt.

pM91 - Kodiert für die Vollängensequenz des amphotropen murinen Leukämievirus (MLV-A; Gene Bank Accession Nr. J02255 und M33469). Das Konstrukt wurde von Dr. D. von Laer, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt zur Verfügung gestellt.

pKA1558LDS - Das Plasmid kodiert für die Volllänge des ecotropen murinen Leukämie Virus (Typ Moloney – MoMuLV; Shinnick *et al.*, 1981; GenBank Accession Nr. J02255; Molekularklon KA1558, Skov *et al.*, 1993) mit einem inserierten *Sfi*I - *Not*I-Linker nach den Kodons für die ersten sechs Aminosäuren des MLV-Hüllproteins (Russel *et al.*, 1993). Die natürlich vorkommenden *Cl*aI (Position 4981) und *Sfi*I (Position 5389) Schnittstellen im Bereich des *pol*-Gens sind mutiert. Diese Veränderungen (LDS-Linker Δ *Sfi*I) beeinträchtigen die Replikationsfähigkeit des vorliegenden MLV nicht. Das Plasmid wurde von D. Kahlenberg, PEI, Langen zur Verfügung gestellt.

pKA1558LDS.ATGm* - Ausgehend von pKA1558LDS wurde im MLV-Vollängengenom durch Fusions-PCR (Horton *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1989) das Start-ATG (Position 5777) des Leaderpeptids des MLV-Hüllproteins zu GTG mutiert. Da der Leserahmen des *env*-Gens mit dem 3'-Bereich des *pol*-Gens überlappt, war nur die Mutation der ersten Base des ATG-Tripletts möglich. Im Leseraster für Pol wird so keine

Aminosäurenänderung hervorgerufen (stille Mutation). Das so veränderte MLV ist nicht in der Lage das Hüllprotein zu bilden und ist dadurch nicht mehr replikationskompetent.

C) Verpackbare MLV-Transfervektoren:

pMgEGFP- Δ LNGFR* - Der verpackbare retrovirale MLV-Transfektor, der zur Transduktion von lympho-hämatopoetischen Stammzellen geeignet ist, wurde von dem von Dr. M. Grez (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellten Plasmid pMgSLdelS abgeleitet. Es handelt sich um einen bicistronischen Vektor mit der 5'LTR des "Mouse Stem Cell Virus" (MSCV) und der 3'LTR des "Friend Spleen Focus Forming Virus" (SFFV). Als Reporter wurde das "*Enhanced Green Fluorescent Protein*" (EGFP; CLONTECH, Heidelberg) anstelle des ursprünglich enthaltenen offenen Leserahmens der β -Untereinheit der NADPH-Oxidase (gp91^{Phox}) vor den offenen Leserahmen des C-terminal trunkierten, schwach-affinen Rezeptors des humanen Nerven-Wachstumsfaktors ("*Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor*" - Δ LNGFR) kloniert. Beide Markerproteine sind mittels einer durchflußzytometrischen Analyse leicht nachzuweisen.

pMFGNLS/lacZ – Es handelt sich um einen verpackbaren retroviralen MLV-Transfektor, der das Gen für die bakterielle β -Galaktosidase (*lacZ*) transferiert (Ferry *et al.*, 1991). Das *lacZ*-Gen enthält ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), die gebildete β -Galaktosidase reichert sich im Kern der transduzierten Zellen an.

D) Konstrukte für die Expression von MLV Gag/Pol bzw. HIV-1 Rev:

pHIT60 - Kodiert für die Proteine Gag und Pol des ecotropen murinen Leukämievirus (Typ Moloney - MoMuLV; Soneoka *et al.*, 1995). Die Transkription wird von einem CMV-Promotor gewährleistet. Zusätzlich besitzt das Konstrukt einen SV40ori zur zytoplasmatischen Amplifikation des Plasmides in "*Large T*"-transformierten Zellen. Es besitzt keine Verpackungssequenz zur Verpackung in MLV-Virionen. Das Konstrukt beinhaltet das *gpt* (XGPRT - Xanthin-guanin-Phosphoribosyl-Transferase)-Gen zur Selektion mit Mycophenolsäure in Säugerzellen.

pCMVrev/hyg - Das Konstrukt enthält die cDNA für das Rev-Protein des HIV-1 (Anazodo *et al.*, 1995). Die Expression wird von einem CMV-Promotor getrieben. Das Konstrukt enthält eine Hygromycin Resistenz-vermittelnde Kasette.

E) Hybridviruskonstrukte:

pKASIV* und **pKAHIV*** - Kodieren für ein MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-Hybridvirus. Sie bestehen aus den regulatorischen Elementen des MoMuLV (5' und 3' LTR, inklusive Verpackungssignal Psi; GenBank Accession Nr. J02255), den viralen Strukturgenen *gag* und *pol* des MoMuLV und den *env*- und *rev*-Genen des SIVagm₃ bzw. HIV-1_{BH10}. Ausgehend von pRepΔ10*env* bzw. pL128 wurden die C-terminal trunkierten *env*-Gene und die flankierenden Exons der *rev*-Gene über *SfiI*-*Clal* in pKA1558LDS.ATGm inseriert, wodurch der Hauptanteil des offenen Leserahmens des MLV-Hüllproteins deletiert wurde.

F) Sonstige Klonierungsplasmide:

pHIVSF162*env* - Das Plasmid enthält ein *EcoRI*-Fragment des CCR5-tropen HIV-1 Moleklarklons HIV-1_{SF162} (Cheng-Mayer *et al.*, 1990; GenBank Accession Nr. M65024), welches den kodierenden Bereich für das Hüllprotein überspannt. Es wurde von Dr. A. Werner, PEI, Langen zur Verfügung gestellt. Es diente als PCR-Template zur Amplifizierung des V3-Loops für die Konstruktion von pRepΔ10*env*-R5.

pUC18 - Prokaryotischer Klonierungsvektor, der durch das Einfügen von Inserts in das enthaltene *lacZ*-Gen zur Blau-/Weiß-Selektion in *E. coli* befähigt ist (2686 bp, GenBank Accession Nr. L08752, Pharmacia).

Alle mit * gekennzeichneten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

Alle verwendeten Plasmide besitzen das Ampicillinresistenzgen (*amp^r*) und ein Replikationssignal zur Amplifikation in *E. coli*. Für alle Amplifizierungen und Klonierungen wurde der Bakterienstamm Top10F' (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) verwendet.

2.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma ARK Scientific (Darmstadt) bezogen und auf eine Standardkonzentration von 10 μ M eingestellt.

Primer für den V3-Loop Austausch in pRep Δ 10env mittels Fusions-PCR (Die den Primerbezeichnungen vorangestellten Buchstaben kennzeichnen die Primer zur Orientierung in Abb. 3.3):

A AgmBsrGI(+)	5'-CCA CTT TGC CGT GTG TCC AGA ACA AG-3'
F AgmBstZ17I(-)	5'-GCC TAG GAA CCC TAG CAC GAA CGG G-3'
E Agm(+)	5'-GTA ACT GTT AGA TTG TAA TG-3'
B Agm(-)	5'-CAC TTC CAG GGC AAC TGG AG-3'

HIV-1_{BH10} V3-Loop (Position 6464 bis 6572; M15654):

C Fuagm-BH10V3(+)	5'-CAT TAC AAT CTA ACA GTT ACT TGC ACA AGA CCC AAC AAC AAT AC-3'
D Fuagm-BH10V3(-)	5'-CTC CAG TTG CCC TGG AAG TGA CAA TGT GCT TGT CTC ATA TTT CC-3'

HIV-1_{SF162} V3-Loop (Position 1360 bis 1465; M65024):

C Fuagm-SF162V3(+)	5'-CAT TAC AAT CTA ACA GTT ACT TGC ACA AGA CCT AAC AAT AAT AC-3'
D Fuagm-SF162V3(-)	5'-CTC CAG TTG CCC TGG AAG TGA CAA TGT GCT TGT CTT ATA TCT CC-3'

Primer für die Sequenzierung des kompletten SIVagm env und rev-Leserahmens:

A5970(-)	5'-AGT GAT GTT TAA TGG TAC CT-3'
1(+)	5'-ACC TGC TAT TTG AGC AGA-3'
A6463(+)	5'-GGA TGA GTT AAG ATT AAG GTA CTG TG-3'
2(-)	5'-ATC TTA ACT CAT CCC AAT-3'
4(-)	5'-GTT AGT ACA ATG CAC CAC TGA AAC-3'
A6982(+)	5'-GTC AGG GGG AAT TCT TCT ATT G-3'
A7079(-)	5'-CTT CGT ACC ATT ACA CGG ATT ATG GTC CGG-3'
A7681(+)	5'-GTC ATA CAA CCG TAC CGT GG-3'
A7797(-)	5'-CTA ATT GTG TTG TTA TGT TAC CTT CC-3'
A7910(+)	5'-GGA TTT TTG GAT GTA CTA GG-3'
A8280(-)	5'-GGC GTG CCA AAG CGA CAA CTG C-3'

SIVV3Seq(+) 5'-CCC AGA TAT GGC AGA AAC ATA GAG-3'

Primer für die Mutation des Start-ATGs des Leaderpeptides des MLV *env*-Gens zu *GTG* in pKA1558LDS durch Fusions-PCR:

*Sph*MLV5141(+) 5'-ACA TGC ATG CCT CAG GTA TTG GGA ACT G-3'
MuATG-GTG(-) 5'-GCG TTG AAC GCG CCA **CGT** CAG TCT AGA GG-3'
MuATG-GTG(+) 5'-CCT CTA GAC TGA **CGT** GGC GCG TTC AAC GC-3'
*Sfi*MLV5903(-) 5'-CG GAG GCC GGC TGG GCC GCA CTG GAG CCG
GGC G-3'

Primer für die Sequenzierung von pKA1558LDS.ATGm:

MLVATGSeq(+) 5'-GAT ACA CGC CGC CCA CGT GAA GGC-3'

Primer für die Amplifikation des SIVagm bzw. des HIV-1_{BH10} *env*-Gens inklusive der flankierenden *rev*-Exons für die Konstruktion der MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-1-Hybridviren. Als Templates dienten die Expressionskonstrukte pRep Δ 10*env* bzw. pL128. Die durch die Primer eingefügten Schnittstellen *Sfi*I und *Cla*I sind in den Primersequenzen unterstrichen:

*Sfi*lagmII(+) 5'-GCG GAG GCC CAG CCG GCC ATG CCC CTA GGA TCA
GAA GAA AGA-3'
Agm*Cla*(-) 5'-CCA TCG ATC TAA GAT GAA CTA GGA GGG TCA GGC
AAC TG-3'
*Sfi*BH10Rev(+) 5'-GCG GAG GCC CAG CCG GCC ATG GCA GGA AGA AGC
GGA GAC AGC G-3'
*Cla*BH10Rev(-) 5'-CCA TCG ATC TAT TCT TTA GCT CCT GAC TCC-3'

Primer für den Nachweis des MLV/SIVagm (301 bp) bzw. MLV/HIV-1 (288 bzw. 420 bp)-Provirus und des Haushaltgens für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*huGAPDH*; Gene Bank Accession Nr. XM 033263) in genomischer DNA (590 bp):

MLV5753(+) 5'-GGG TGG ACC ATC CTC TAG AC-3'
SIV6054(-) 5'-CTG TGA CCC ATT GTT GCC TTG-3'
HIV6041(-) 5'-GCT ACT ACT AAT GCT ACT ATT GC-3'
HIV6173(-) 5'-CCT TCA CTC TCA TTG CCA CTG-3'
huGAPDH(+) 5'-GTG AGT GCA GGA GGG CCC G-3'
huGAPDH(-) 5'-CAA AAG GAG TGA AGG CCC TGC-3'

2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, spezifische Nukleotidsequenzen ausgehend von genomischer DNA oder Plasmid-DNA zu amplifizieren (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986 und 1987). Das amplifizierte Fragment kann anschließend in weitere molekularbiologische Techniken eingesetzt werden. Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase ist unter geeigneten Puffer- und Zyklusbedingungen die Synthese eines, durch zwei Primer (synthetische Starter-Oligonukleotide) eingegrenzten DNA-Fragmentes möglich. Verwendet wurde die *Taq*-Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten) aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus*, die ihr Temperaturoptimum bei 72°C hat.

Ein Standard-PCR-Ansatz (100 µl) enthielt: 1x PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,8; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01% Gelantine), 200 µM je Desoxynukleotid, 20 pmol (+)-Primer, 20 pmol (-)-Primer, 2,5 Einheiten *Taq*-Polymerase und 100 ng Plasmid-DNA mit der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz oder 2 µg genomische DNA.

Bei den Zyklusbedingungen richteten sich die Annealingtemperatur und die Synthesedauer nach den verwendeten Primern und der Länge des zu amplifizierenden Nukleotidfragments:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung:	1 3 min	94°C	
Denaturierung:	2 45 sec	94°C	} 25 - 40 Schleifen
Annealing:	3 45 sec	55 - 65°C	
DNA-Synthese:	4 0,5 - 3 min	72°C	
DNA-Synthese:	5 10 min	72°C	
	6 ∞	4°C	

Die PCR-Amplifikate für den Austausch des V3-Loops in pRepΔ10env wurden mit einer Mischung der *Taq* DNA-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* und der *Pwo* DNA-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus woesei* (Expand™ High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die *Pwo* DNA-Polymerase besitzt Korrekturlese-Aktivität (enthält 3'->5'-Exonukleasefunktion). Das Temperaturoptimum für die DNA-Synthese liegt bei 68°C.

Es wurden die folgenden PCR-Bedingungen für die Amplifikation der drei Ausgangsfragmente für die Fusions-PCR (abgewandelt nach Dipl. Biol. R. König, PEI, Langen) angewandt:

Fragmente Nr. 1 und Nr. 3			Fragment Nr. 2		
Schritt	Zeit	Temperatur	Schritt	Zeit	Temperatur
1	3 min	94°C	1	3 min	94°C
2	45 sec	94°C	2	45 sec	94°C
3	45 sec	55°C	3	45 sec	55°C
4	50 sec	68°C	4	30 sec	68°C
x 30 Zyklen			x 40 Zyklen		
5	5 min	68°C	5	5 min	68°C
6	∞	4°C	6	∞	4°C

Die drei Ausgangsfragmente wurden zu gleichen Anteilen (1 µl) in die Fusions-PCR eingesetzt. Unter folgenden PCR-Bedingungen wurde das Fusionsfragment amplifiziert:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
1	3 min	94°C	
2	45 sec	94°C	x 10
3	45 sec	55°C	
4	1 min	68°C	
5	45 sec	94°C	x 25
6	45 sec	60°C	
7	1 min + 2 sec	68°C	
8	10 min	68°C	
9	∞	4°C	

PCR-Bedingungen für die Mutation des Start-ATGs in pKA1558LDS:

5' Fragment			3' Fragment		
Schritt	Zeit	Temperatur	Schritt	Zeit	Temperatur
1	3 min	94°C	1	3 min	94°C
2	45 sec	94°C	2	45 sec	94°C
3	45 sec	60°C	3	45 sec	60°C
4	1 min	68°C	4	30 sec	68°C
x 30 Zyklen			x 40 Zyklen		
5	5 min	68°C	5	5 min	68°C
6	∞	4°C	6	∞	4°C

Bedingungen der Fusions-PCR:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
1	3 min	94°C	
2	45 sec	94°C] x 10
3	45 sec	55°C	
4	50 sec	68°C	
5	45 sec	94°C] x 25
6	45 sec	60°C	
7	50 sec + 2 sec	68°C	
8	10 min	68°C	
9	∞	4°C	

Nach der abschließenden DNA-Synthesephase wurden die jeweils erhaltenen PCR-Produkte direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren. Die PCR-Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermoblock der Firma Biometra, Göttingen durchgeführt.

2.1.4 Restriktion und Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Alle Restriktionen wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Mit der Verwendung von alkalischer Phosphatase (*"calf intestinal alkaline phosphatase"*, CIP; NEB, Schwalbach) konnte nach Restriktion die Möglichkeit einer Religation von Plasmid-DNA reduziert werden. Dieses Enzym entfernt die für eine Ligation benötigten 5'-Phosphatgruppen der DNA. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese in 1x TAE-Puffer. Für Fragmente im Größenbereich von 0,1 bis 2 kb wurden 2%ige, im Bereich von 0,5 bis 7kb 1%ige und für Fragmente größer 7kb 0,7%ige Agarose-Gele verwendet. Der flüssigen Agarose (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) wurde vor dem Erstarren Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 10% DNA-Probenpuffer versetzt. Die aufgetrennten DNA-Banden konnten auf einem UV-Transilluminator (302 nm) photographiert werden.

Als DNA-Größenstandard wurde *Hind*III restringierte Lambda-DNA (NEB, Schwalbach), *Hae*III restringierte ϕ X-174-RF DNA (NEB, Schwalbach), die 1 kb DNA-Leiter (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) oder die 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach) verwendet. Als Restriktionskontrolle wurde unverdautes Plasmid (1 μ g DNA) aufgetragen.

DNA-Probenpuffer: 15% Glycerin
 0,1% Xylenblau (XL)
 0,075% Bromphenolblau (BPB)
 10 mM EDTA

1x TAE-Puffer [pH 8,0]: 40 mM Tris/Acetat
 1 M EDTA

2.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Restriktionsansätze oder PCR-Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Danach wurden die Fragmente unter Verwendung des "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel aufgereinigt.

Nach der Restriktion der mit endständigen Schnittstellen versehenen PCR-Produkte wurden diese ohne vorherige gelelektrophoretische Auftrennung über das "QIAquick PCR Purification Kit" nach Angaben des Herstellers aus dem Restriktionsansatz aufgereinigt.

2.1.7 Ligation

DNA-Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym knüpft unter Verbrauch von ATP Phosphodiesterbindungen zwischen den zu ligierenden DNA-Fragmenten, wodurch eine kovalente Bindung hergestellt wird.

Die Ligation von restringierten DNA-Fragmenten erfolgte mit 2,5 Einheiten/Ansatz der T4-DNA-Ligase von Gibco/Life Technologies, Eggenstein und dem zugehörigen Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 10-20 μ l für 1 Stunde bei RT und anschließender Lagerung bei 4°C. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug

in der Regel 1:3. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde zur Transformation von 100 µl kompetenter Bakterien eingesetzt.

2.1.8 Herstellung kompetenter Zellen

Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurde der *E. coli* Stamm Top10F' (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode "kompetent" gemacht. Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur (37°C) angeimpft und bei 37°C im Bakterienschüttler geschüttelt bis eine Bakteriendichte von $OD_{550} = 0,5$ bis 0,55 erreicht war. Danach wurden die Bakterien für 5 min auf Eis gestellt, anschließend auf zwei 50 ml Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) aufgeteilt und bei 4°C in einer Heraeus-Variofuge RF pelletiert (6.000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen in je 20 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Zellen pelletiert (6.000 rpm, 10 min, 4°C), anschließend in 2 ml TFB2-Puffer resuspendiert und nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis zu 100 µl aliquotiert und schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -70°C gelagert.

LB-Medium: 10 g/l Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl
 autoklaviert

TFB1-Puffer [pH 5,8]: 30 mM KAc
 100 mM RbCl₂
 10 mM CaCl₂/2H₂O
 50 mM Mn₂Cl₂/4H₂O
 15% Glycerol (BTL)
 pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt
 sterilfiltriert

TFB2-Puffer [pH 6,5]: 10 mM MOPS
 75 mM CaCl₂
 10 mM RbCl₂
 15% Glycerol
 pH 6,5 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert

2.1.9 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Top10F'-Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 5 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 sec und einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden die Transformationsansätze mit 500 µl S.O.C.-Medium (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) versetzt und bei 25°C drei Stunden im Bakterieneschüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (10 min, 3.000 rpm, Heraeus, Minifuge T). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Bakterienpellet im Restmedium resuspendiert und auf LB-Amp-Platten (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die Platten wurden drei Tage bei RT inkubiert.

2.1.10 Plasmid-Präparation

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mittels des Plasmid-Aufreinigungs-Kits der Firma QIAGEN (Hilden). Zur Gewinnung kleinerer Mengen DNA aus 15 ml Übernachtskulturen wurde der "QIAprep 8 Miniprep Kit" verwendet. Die Präparation größerer Mengen DNA erfolgte aus 250 ml Übernachtskulturen mittels des "Maxi Kits" (Anionenaustauschersäulen tip-500). Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.11 Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurde mittels des "QIAamp DNA Blood Mini Kit" der Firma QIAGEN (Hilden) durchgeführt. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurden 1×10^6 Zellen pro Ansatz eingesetzt. Die Ausbeute lag bei ca. 20-30 µg genomischer DNA pro Ansatz.

2.1.12 Nukleotidsequenzbestimmung

Zur Überprüfung der korrekten Nukleotidsequenz der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente und deren korrekte Inserierung wurde eine Nukleotid-Sequenzanalyse nach dem Sanger-Verfahren durchgeführt. Die Sequenzierungen erfolgten mit dem "Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v2.0" der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt. Eingesetzt wurden pro Ansatz 1 µg Plasmid-DNA und 10 pmol des

2.2 Material und Methoden der Zellbiologie

2.2.1 Zellen und Kultivierung

2.2.1.1 Suspensionszellen

Molt4/8 - Molt-4 Klon 8: Humane T-Zellen (akut lymphoblastische Leukämie). Klon 8 ist durch Subklonierung entstanden, der Klon ist besonders empfänglich für eine Infektion mit HIV-1 (Daniel *et al.*, 1988). NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm: #175.

A3.01/CCR5 - humane CD4-positive T-Zellen, stabil transfiziert mit einem CCR5-Expressionskonstrukt, welches zur Selektion eine G418-Antibiotikumresistenz trägt. NIBSC: #ARP067.

Die Suspensionszelllinien wurden in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% komplement-inaktiviertem (1 h, 56°C) fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom KG, Berlin), 1 g/l Glucose, 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus, Hanau) bei 37°C, gesättigter Wasserdampfatosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Sie wurden zweimal pro Woche 1:10 mit frischem Medium versetzt.

2.2.1.2 Adhärente Zellen

293T - humane Nierenepithelzelllinie, SV40 LargeT transformiert. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. M. Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt zur Verfügung gestellt.

GHOST/parental - GHOST (3) Parental: Humane Osteosarkomzelllinie (HOS), stabil transduziert mit einem retroviralen Vektor für die Expression von humanem CD4 (MV7neo-T4). Zusätzlich tragen die Zellen ein HIV-2 LTR-getriebenes hGFP-Konstrukt, welches durch Kotransfektion mit einem CMV getriebenen Hygromycin Resistenz-vermittelnden Konstrukt und anschließender Selektion stabil eingebracht wurde. Die

Zellen wurden von Dr. M. Dittmar, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg zur Verfügung gestellt. NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm: #3679

GHOST/CCR2b - GHOST/CCR3 - GHOST/CCR4 - GHOST/CCR5 - GHOST/CCR8 - GHOST/CXCR4 - GHOST/Bob - GHOST/Bonzo - GHOST/V28 - GHOST (3)-Parental-Zellen stabil transduziert mit einem retroviralen Expressionskonstrukt für die verschiedenen angegebenen HIV-Korezeptoren. Sie wurden zur Bestimmung der Korezeptornutzung von HIV-Primärisolaten entwickelt. Es handelt sich um Mischkulturen. Die Zellen wurden von Dr. M. Dittmar, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg zur Verfügung gestellt. NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm: CCR2 #3681, CCR3 #3682, CCR4 #3683, CCR5 (Hi-5) #3944, CCR8 #3940, CXCR4 #3685, Bob #3686, Bonzo #3687, V28 #3939.

TE671 - humane Rhabdomyosarkomzelllinie (Stratton *et al.*, 1989), ursprünglich als Medullarblastomzelllinie eingeordnet. American Type Culture Collection (ATCC) #CRL-8805

TELCeB6 - von TE671-Zellen abgeleitete Hüllprotein-negative MLV-Verpackungszelllinie. Sie exprimiert stabil die MLV-Proteine Gag und Pol und trägt einen *lacZ*-Gen transferierendes Vektorgenom (Cosset *et al.*, 1995). Die Zellen wurden freundlicherweise von Y. Takeuchi, Chester Beatty Laboratories, UK zur Verfügung gestellt.

Die adhärennten Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10% komplement-inaktiviertem (1 h, 56°C) fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom KG, Berlin), 2 mM L-Glutamin, 1g/l Glucose und einem Antibiotikacocktail aus 50 mg/ml Streptomycin und 100 Einheiten/ml Penicillin in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus, Hanau) bei 37°C, gesättigter Wasserdampf Atmosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10, dazu wurden die Zellen mit 5 mM EDTA in PBS aus den Kulturflaschen gelöst und mit frischem Medium versetzt.

Dem Medium für die GHOST-Zellen wurde 100 µg/ml Hygromycin (Gibco/Life Technologies, Eggenstein), 500 µg/ml G418 (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) und sofern sie ein Korezeptor exprimierten zusätzlich 1 µg/ml Puromycin (ICN Biomedicals, Eschwege) zugegeben.

Die TELCeB6-Zellen wurden mit 5 µg/ml Basticidin (ICN Biomedicals, Eschwege) zur Selektion auf das enthaltene MLV *gag/pol*-Konstrukt gehalten.

Die von TELCeB6-Zellen abgeleiteten Verpackungszelllinien K52SR20 (Stitz *et al.*, 2000a), MBK.15, wt.6, X4.3 und TeLMLV-A wurden dauerhaft mit 5 µg/ml Basticidin (ICN Biomedicals, Eschwege) zur Selektion auf das enthaltene MLV *gag/pol*-Konstrukt gehalten. Zur Selektion auf die jeweils eingefügten Env-Expressionsplasmide wurden die Linien K52SR20 und MBK.15 mit 800 µg/ml G418 (Gibco/Life Technologies, Eggenstein), wt.6 und X4.3 mit 200 µg/ml Hygromycin (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) und TeLMLV-A mit 50 µg/ml Phleomycin (CAYLA, Toulouse, Frankreich) im Medium gehalten. Zusätzlich wurden die Verpackungszelllinien zur vermehrten Vektorproduktion in DMEM-Medium mit erhöhter Glucosekonzentration (4,5 g/l Glucose) kultiviert (Verpackungszellmedium).

2.2.2 Präparation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Zur Gewinnung primärer, peripherer Blutlymphozyten (PBL) wurden zunächst die mononukleären Zellen (PBMC) aus frischem Vollblut gesunder Spender isoliert. Bei dem Blut handelte es sich um Citrat-Blut. 15 ml vorgewärmtes Ficoll Histopaque (Sigma, Taufkirchen) wurden in einem 50 ml Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) vorsichtig mit 15-30 ml Blut überschichtet und anschließend für 30 min zentrifugiert (1.000 rpm, RT, ohne Bremse, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Hierbei sedimentierten die roten Blutkörperchen und Granulozyten in den Ficoll, über dem Ficoll sammelten sich die Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (im "Lymphozytenring") und über diesen das Plasma. Dieses wurde abgenommen und Hitze-inaktiviert (1 h, 56°C). Der Lymphozytenring wurde abgezogen und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Die PBMC wurden zweimal mit je 35 ml PBS gewaschen, um restliches Ficoll Histopaque zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Lyse restlicher Erythrozyten durch 15-minütige Inkubation der Zellen in PBS 0,86% NH₄Cl bei 37°C. In zwei Waschschrritten wurde das Ammoniumchlorid entfernt und die Zellen wurden in einer Dichte von 1x10⁶/ml in X-Vivo 10 Medium (BioWhittaker, Verviers, Belgien), das mit 10% FKS und 10% autologem Plasma (komplement-inaktiviert, 1 h, 56°C), 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) und 200 Einheiten Interleukin 2 (IL-2, Chiron, Marburg) supplementiert war, aufgenommen.

2.2.3 Stimulierung der PBMC

Nach der Isolation der PBMC wurden die Zellen zur Stimulation für drei Tage in Gegenwart der immobilisierten monoklonalen Antikörper anti-CD3 und anti-CD28 (Becton Dickinson, Heidelberg) kultiviert. Dazu wurden 24-Lochplatten mit einer 10 µg/ml konzentrierten Lösung der Antikörper zwei Stunden bei 37°C inkubiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Bevor die Zellen auf die beschichteten Platten gegeben wurden, wurden die Platten zweimal mit Medium gewaschen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen in 2 ml Medium pro 24-Lochbohrung ausgesät. Unter diesen Stimulationsbedingungen sterben Monozyten und Makrophagen ab, so daß man eine 95-98% reine Lymphozytenpopulation erhält, was durch durchflußzytometrische Analyse auf den T-Zell-Marker CD3 (DAKO Diagnostika, Hamburg) bestätigt wurde.

2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mittels 5 mM EDTA in PBS vom Kulturgefäßboden gelöst und anschließend in Medium resuspendiert. Suspensionszellen und adhärenente Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (1.300 rpm, 4°C, 10 min, Heraeus, Minifuge T), ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen in 800 µl eisgekühltem Medium (DMEM bzw. RPMI, 20% FKS) resuspendiert und in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) auf Eis überführt. Tropfenweise wurden 800 µl gekühltes DMEM bzw. RPMI1460 mit 20% FKS und 20% DMSO (Merck, Darmstadt) zugefügt und die Zellen sofort bei -80°C eingefroren. 24 Stunden später konnten die Kryoröhrchen zur permanenten Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen in Stickstoff gelagerter Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C zügig erwärmt. Zur Entfernung des zytotoxischen DMSO wurden die Zellen sofort in 10 ml erwärmtes Medium überführt und bei 1.300 rpm 10 min bei RT (Minifuge T, Heraeus, Hanau) pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in einer der Zellzahl entsprechenden Mediummenge aufgenommen und in ein Kulturgefäß entsprechender Größe überführt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Eventuell notwendige Selektionsmarker wurden erst einen Tag nach dem Auftauen dem Medium zugesetzt.

2.2.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Zur stabilen und transienten Transfektion wurde die DNA mit Lipidvesikeln komplexiert, welche anschließend mit der Zellmembran fusionieren und ihr Inhalt über Endozytose ins Zellinnere gelangt (Lipofektion). Hierzu wurde das Transfektionsreagenz Lipofektamin™ in Kombination mit dem vorkomplexierenden PLUS-Reagenz (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) verwendet.

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen (293T oder TELCeB6) in einer Dichte von 6×10^5 pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Sie sollten zu Transfektionsbeginn zu 80% konfluent sein. Pro Transfektionsansatz wurden 3 µg Plasmid-DNA mit 6 µl PLUS-Reagenz in 100 µl OptiMEM (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) für 15 Minuten bei RT inkubiert. Bei Kotransfektionen verteilten sich die 3 µg zu gleichen Anteilen auf die einzelnen Konstrukte. Parallel wurden 5 µl Lipofektamin™ mit 100 µl OptiMEM inkubiert. Danach wurden beide Ansätze miteinander vermischt und es folgte eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei RT. Der Transfektionsansatz wurde mit 800 µl OptiMEM auf 1 ml aufgefüllt und vorsichtig auf die zweimal mit PBS gewaschen Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem DNA-Liposomengemisch betrug vier Stunden bei 37°C im Zellinkubator. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in 4 ml frischem Medium kultiviert. Am nächsten Tag folgte ein Mediumwechsel (2 ml). Bei der Generierung von Pseudotypvektoren oder Hybridviren wurde der Überstand 48 Stunden nach Transfektion geerntet.

Transfektion zur Generation der *egfp*-Gen transferierenden Pseudotypvektoren:

Zellkulturflaschen (75 cm^2) mit subkonfluent gewachsenen 293T-Zellen wurden mit 7 µg des MLV Gag/Pol-Expressionsplasmids pHIT60, 9 µg des Psi-positiven für EGFP-kodierenden Transfervektors pMgEGFP-ΔLNGFR und 7 µg der jeweiligen Hüllproteinvariante pRepΔ10env für SIVagm-wt Env, pRepΔ10-X4 für SIVagm-X4 Env, pL128 für HIV-X4 Env, pL128MBK für HIV-R5 Env und pALF-MLV-A für das amphotrope MLV Env transfiziert. Die Transfektion der Zellen in Zellkulturflaschen erfolgte analog der Transfektion in 6-Lochplatten, alle Mengen- und Volumenangaben wurden um den Faktor Acht multipliziert.

2.2.6 Synzytieninduktionsassay

Die Fusionsfähigkeit von lentiviralen Hüllproteinvarianten wurde durch direkte Kokultur Env-positiver Zellen mit humanen T-Zelllinien getestet. Dazu wurden 6×10^5 293T-Zellen pro 6-Lochbohrung mit 3 μg der entsprechenden Env-Konstrukte bzw. Hybridvirus-Konstrukte transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 1×10^6 Zellen der CD4-positiven Suspensionslinien Molt4/8 oder A3.01/CCR5 überschichtet. 48 Stunden nach Transfektion konnte die Synzytienbildung zwischen den transfizierten 293T-Zellen und den überlagerten Suspensionszellen beobachtet werden. Die Expression der Hüllproteine wurde anschließend im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay nachgewiesen.

2.2.7 Einzelzellklonierung stabil transfizierter Verpackungszellklone

Zur Generierung stabiler Verpackungszelllinien auf der Basis der Hüllprotein-negativen TELCeB6-Zellen wurden diese mit dem entsprechenden Expressionsplasmid in einer 6-Loch-Kulturschale transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:5, 1:10, 1:100) in 100 mm-Kulturschalen umgesetzt und ab dem nächsten Tag in dem entsprechenden Antibiotikum-haltigen Medium selektioniert.

Das zur Selektion verwendete Medium entsprach dem zur Kultivierung von TELCeB6-Zellen beschriebenen Medium, welches zusätzlich mit den zur Selektion benötigten Antibiotika 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 (pL128-abgeleitete Konstrukte), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin (pRep Δ 10env-abgeleitete Konstrukte) oder 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Phleomycin (pALF-MLV-A Konstrukt) supplementiert wurde.

Sobald sich Zellkolonien von Einzelzellklonen gebildet hatten, wurden diese mit einer Eppendorfpipette von der Kulturschale abgelöst, in 24-Lochplatten (Nunc, Wiesbaden) resuspendiert und expandiert. Bei der Generation der Mischkultur TeLMLV-A wurden ca. 50 Klone gepoolt. Durch Titration der Überstände aus 12-Lochplatten auf geeigneten Zielzellen wurden die erhaltenen Verpackungszellklone im Bezug auf ihren Vektortiter untersucht.

2.2.8 Generierung von MLV-Pseudotyp-Vektorstocks

Zur Ernte von Pseudotypvektoren aus stabilen Verpackungszellen wurden auf konfluent gewachsene Kulturen in großen Zellkulturflaschen (182 cm²) 12 ml Verpackungszellmedium (2.2.1.2) ohne Selektionsmarker gegeben. In manchen Versuchen wurde dem Verpackungszellmedium Natrium-Butyrat (10 mM NaB, Olsen *et al.*, 1995) zugegeben. Das Salz wirkt transkriptionssteigernd und damit positiv auf die Vektorproduktion. Nach ca. 14 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch Filtration (0,45 µm Filter; Minisart, Satorius, Göttingen) von Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde á 1,2 ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Gewinnung der transient hergestellten *egfp*-transferierenden Überstände wurden die Transfektanden einen Tag nach der Transfektion mit PBS gewaschen und mit 6 ml frischem Medium versorgt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Überstände geerntet, filtriert (0,45 µm, Satorius, Göttingen) und direkt zur Transduktion bzw. Titration auf Molt4/8-Zellen eingesetzt.

2.2.9 Konzentrierung von MLV-Pseudotyp-Vektorstocks

2.2.9.1 Ultrafiltration

Es wurden die Ultrafiltrationseinheiten centriprep 30 concentrator (Amicon, Beverly, MN, USA) verwendet. Die enthaltene Membran läßt Partikel größer 30 kD nicht passieren und hält damit bei der Zentrifugation (2.400 rpm, Heraeus, Minifuge T, Hanau) die Vektoren zurück, während das Volumen des Zellkulturmediums verringert wird. Es wurden 8 ml frisch geernteter Vektorüberstand auf eine Endvolumen von 1 ml eingeeengt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.9.2 Ultrazentrifugation

Der filtrierte vektorhaltige Überstand wurde in 11 ml Röhrchen (35.000 rpm, 1 h, 4°C, SW41-Rotor) oder 35 ml Röhrchen (25.000 rpm, 1,5 h, 4°C, SW28-Rotor) in einer Ultrazentrifuge von Beckmann (München) durch ein 20%iges Zuckerkissen (Sucrose, Serva, Heidelberg) abzentrifugiert. Das Zuckerkissen machte 1/6 des

Gesamtvolumens aus. Das Vektorpellet wurde in geringen Mengen PBS (30-100 µl pro Röhrchen) aufgenommen, unter Schwenken für 45 min bei 4°C resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Von nativen und pelletierten Vektoraliquots wurde je ein Aliquot wieder aufgetaut, um den Vektortiter zu bestimmen. Aus dem Vergleich des nativen Titers und des konzentrierten Titers wurde die sog. "Recovery" bestimmt. Sie wird durch die Volumeneinengung des Überstandes im Verhältnis zur erreichten Titersteigerung ausgedrückt.

2.2.10 Transduktion von Zielzellen und Titration der Vektoren

Die Verpackungszellklone wurden 24 Stunden vor einer geplanten Transduktion mit frischem, nicht Antibiotikum-haltigem Medium versorgt. Für die Transduktion der adhärennten GHOST-Zellen wurden am Vortag 1×10^5 Zellen pro Loch einer 12-Loch Platte bzw. 4×10^4 Zellen pro Loch einer 24-Loch Platte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Die vektorhaltigen Zellkulturüberstände wurden mit Spritzen aufgenommen und zum Abtrennen von Zelltrümmern filtriert (Minisart 0,45 µm, Sartorius). Für die Titration wurden Verdünnungsreihen (1000 µl, 100 µl und 10 µl bei nativen Überständen, 10 µl, 1 µl, 0,1 µl bei UZ-pelletierten Überständen) angelegt, die dann zur Transduktion der entsprechenden Zelllinie eingesetzt wurden. Die Zielzellen wurden mit PBS gewaschen bevor sie mit den Überständen überschichtet wurden. Nach einer Inkubation von fünf Stunden bei 37°C wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. 48 Stunden nach Transduktionsbeginn konnten die Zellen fixiert und auf ihre β-Galaktosidase-Aktivität untersucht werden (Nachweis des Reportergens). Zur Angabe des Titers in infektiösen Einheiten pro ml (i.E./ml) wurde der Mittelwert aus den drei durchgeführten Titrationsstufen gebildet.

Die Bestimmung des Vektortiters von [MLV(HIV-X4)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Überständen wurde auf GHOST/CXCR4-Zellen, der Titer von [MLV(HIV-R5)], [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-R5)]-Vektoren auf GHOST/CCR5-Zellen durchgeführt. [MLV(MLV-A)]-Vektoren wurden auf GHOST/parental-Zellen titriert.

Der Titer der transient hergestellten *egfp*-transferierenden Vektoren wurde durch Transduktion von 2×10^5 Molt4/8-Zellen in 3 Verdünnungsstufen (500 µl, 100 µl und 10 µl Vektorüberstand) in 48-Lochplatten bestimmt. Vier Stunden nach Transduktion wurde pro Ansatz 500 µl frisches Medium zugegeben. Zwei Tage nach Transduktion wurden die Zellen durchflußzytometrisch auf die Expression von EGFP analysiert.

2.2.11 Infektion von Zelllinien

Zur Infektion von $2,5 \times 10^5$ GHOST/CXCR4 und GHOST/CCR5-Zellen in 6-Lochplatten wurden 2 ml virushaltiger Überstand (filtriert, 0,45 μm , Satorius, Göttingen) eingesetzt. Infiziert wurde mit den Hybridviren MLV/SIVagm oder MLV/HIV-1, MLV-A, MLVeco, SIVagm oder HIV-1. Es wurde der Überstand von entsprechend transfizierten 293T-Zellen oder mit den entsprechenden Viren infizierter GHOST-Zellen verwendet. 2 Tage nach Infektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zur Infektion von 1×10^6 Molt4/8-Zellen wurden 2 ml filtrierter Überstand von transfizierten 293T-Zellen (transfiziert mit den Konstrukten für die Bildung der Hybridviren bzw. MLV-A) eingesetzt. Die Inkubation der Zellen mit den Viren erfolgte für 2 Stunden, danach wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend in frischem Medium kultiviert.

2.2.12 Neutralisierung der Pseudotypvektoren durch Seren HIV-1-positiver Spender

Es wurden vier Seren HIV-1-positiver humaner Spender verwendet. Die HIV-Stämme, mit denen die Spender ursprünglich infiziert wurden, sind nicht bekannt. Von Dr. S. Norley, PEI, Langen wurde ihr Neutralisationstiter gegenüber HIV-1_{III_B} bestimmt. Er lag zwischen 3,0 und 6,8 $\log_2 \text{ND}_{50}$ (J. Stitz, Dissertation, 1998).

5×10^3 Partikel der Pseudotypen wurden mit den Seren von vier HIV-1 infizierten Spendern und vier uninfizierten Spendern 1:20 verdünnt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend zur Transduktion von 4×10^4 GHOST-Zellen des entsprechend genutzten Hauptkorezeptors eingesetzt. Nach zwei Stunden wurden die Zellen gewaschen und zwei Tage später mittels X-Gal-Test die Effizienz des Gentransfers ermittelt.

2.2.13 Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten

Retronektin ist ein rekombinantes Fragment aus humanem Fibronektin. Es enthält spezifische Bindungsstellen sowohl für retrovirale Vektoren, als auch für hämatopoetische Zellen (Hanenberg *et al.*, 1996). Die Kolo-kalisierung von Vektoren

und Zellen auf Retronektin-beschichteten Platten führt zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz (Fehse *et al.*, 1998).

Zur Transduktion primärer T-Zellen wurden unbeschichtete 24- oder 48-Lochplatten (BD Falcon, Heidelberg) mit Retronektin (TAKARA, OTSU, Japan, über BioWhittaker Europe, Taufkirchen) beschichtet. Dazu wurden 250 bzw. 150 µl Retronektinlösung (0,1 mg/ml) je Vertiefung der 24- bzw. 48-Lochplatte gegeben und für eine Stunde offen unter UV-Licht inkubiert. Nach einer weiteren halben Stunde unter UV-Licht mit geschlossenem Plattendeckel wurde die Retronektinlösung abgenommen und 250 µl einer 2%-igen BSA-Lösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in die Vertiefungen gegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten zweimal mit HBSS (Hanks Buffered Saline Solution)-Puffer ("*Hanks' Balanced Salts*", Sigma, Taufkirchen) gewaschen und zur Lagerung bei 4°C mit 1 ml PBS überschichtet. Die Retronektin-beschichteten Platten können bei 4°C mehrere Monate gelagert werden.

2.2.14 Transduktion primärer Lymphozyten

Die Transduktion der stimulierten primären T-Zellen erfolgte nach einem von Dipl. Biochem. I. Schmitt, PEI, Langen optimierten Protokoll, auf Retronektin-beschichteten 48-Lochplatten. 5×10^4 Zellen in 250 µl Medium wurden mit 1 ml frischem Vektorüberstand transduziert. Die zur Transduktion eingesetzte MOI war daher erst nach der Auswertung der Referenztitration der Überstände auf Molt4/8-Zellen bekannt. Die Transduktionsansätze wurden auf eine Konzentration von 4 µg/ml Protaminsulfat (Sigma, Taufkirchen) und 200 U/ml IL-2 mit 10% FKS und 10% autologem Plasma eingestellt. Anschließend wurden die Platten für 90 min bei 32°C und 1.000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau) zentrifugiert und weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Halbmediumwechsel. Die Transduktion wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Die durchflußzytometrische Analyse auf EGFP-Expression und Anfärbung auf die Oberflächenmarker CD4, CXCR4 und CCR5 in den transduzierten PBL erfolgte drei Tage nach der letzten Transduktion.

2.2.15 Separation SIVagm Env-positiver Zellen mittels magnetischer Zell-Sortierung (MACS - "Magnetic Cell Sorting")

Die Sortierung von Zellen aufgrund der Expression von Oberflächenantigenen wird durch die Bindung spezifischer Antikörper oder Seren und anschließender Bindung eines speziell konjugierten Zweitantikörpers ermöglicht. Der Zweitantikörper kann mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sein, was die durchflußzytometrische Analyse und Sortierung der positiven Zellen an einem "Fluorescence activated cell sorter" (FACS) ermöglicht. Wenn der Zweitantikörper an ein Metallkügelchen (Bead) gekoppelt ist, kann mit Hilfe eines angelegten Magnetfeldes die positive Zellfraktion aussortiert werden (MACS - "Magnetic Cell Sorting", Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Für die Separation SIVagm Env-positiver Zellen über MS⁺-Separationssäulen im MiniMACS-System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurden 2x10⁶ Zellen der stabilen Klone wt.6 und X4.3 eingesetzt. Die Zellen wurden mit 5 mM EDTA in PBS abgelöst, pelletiert (1.300 rpm, 10 min, RT) und in 1 ml einer 50%igen BSA-Lösung aufgenommen. Die 20 minütige Inkubation (4°C) der Zellen in 50% BSA diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, damit durch die Verwendung eines Serums zum Nachweis von SIVagm Env mangels eines monoklonalen Antikörpers möglichst wenig unspezifische Bindung erfolgen konnte. Zur Anfärbung des lentiviralen Hüllproteins wurde das Serum eines SIVagm-infizierten Makaken (*Macaca nemestrina* 170) verwendet. Nach dem Abzentrifugieren der BSA-Lösung wurden die Zellen in 100 µl MACS-Waschpuffer mit 1:1000 verdünntem Serum resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml MACS-Waschpuffer gewaschen und in 90 µl Waschpuffer plus 10 µl der anti-human IgG Micro Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) bei 4°C für 20 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen, in 500 µl aufgenommen und auf mit 2 ml equilibrierte MS⁺-Separationssäulen des MiniMACS-System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) aufgebracht. Die Separierungssäulen befanden sich in einem starken Magnetfeld. Die SIVagm Env-negativen Zellen passierten die Säulen, während die SIVagm Env-positiven Zellen durch ihre Bindung an die Metallkügelchen im Magnetfeld der Säulen zurückgehalten wurden. Die Säulen wurden nach dem Durchlaufen der Zellsuspension zweimal mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Säulen aus dem Magnetfeld genommen und die zurückgehaltenen Zellen mit 2 ml Waschpuffer aus den Säulen in ein Auffanggefäß eluiert. Die SIVagm Env-negativen Zellen befanden

sich im Durchfluß der Säulen und wurden verworfen. Die Env-positiven Zellen im Eluat wurden abzentrifugiert und die erhaltenen Zellen in einer der Zellzahl entsprechenden Mediummenge aufgenommen und zur Expansion in ein Kulturgefäß der passenden Größe überführt. Die Analyse der sortierten Zellen erfolgte durchflußzytometrisch ca. 1 Woche nach der Separation.

MACS-Waschpuffer: 5% FKS
 5 mM EDTA (pH 8,0) in PBS

2.2.16 Analytische Durchflußzytometrie

Anhand der analytischen Durchflußzytometrie wurden in der vorliegenden Arbeit transduzierte Zellen auf die Expression des Markers EGFP und primäre Lymphozyten auf die Expression von CD-Markern und Chemokinrezeptoren analysiert. Außerdem wurde die Expression von lentiviralen Hüllproteinen auf der Verpackungszelloberfläche dargestellt. Die Durchflußzytometrie liefert hierbei sowohl eine qualitative wie auch quantitative Aussage zur Expression des jeweiligen Proteins. Das intrazellulär exprimierte "*Enhanced Green Fluorescent Protein*" (EGFP) kann direkt als Fluoreszenz 1 gemessen werden, während die Oberflächenmarker mittels Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper nachgewiesen wurden. Die Analysen erfolgten an einem FACStar^{Plus} der Firma Becton Dickinson (San Jose, CA) oder an einem DAKO Galaxy (DAKO Diagnostika, Hamburg). Es wurden pro Probe 10.000 Ereignisse (Zellen) eingemessen.

2.2.16.1 Nachweis von EGFP in transduzierten Molt4/8

Der Titer der transient erzeugten *egfp*-transferierenden Pseudotypvektoren wurde in drei Verdünnungen auf der Suspensionzelllinie Molt4/8 bestimmt. Zwei Tage nach Transduktion wurden die Zellen analysiert. Pro Probe wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden einmal in Waschpuffer gewaschen, pelletiert und in 500 µl der Fixierlösung aufgenommen. Der Prozentsatz positiver Zellen gibt nach Berücksichtigung der transduzierten Zellzahl den eingesetzten Vektortiter in infektiösen Einheiten pro ml an. Die Titerangabe resultiert aus dem Mittelwert der drei Verdünnungsstufen.

Waschpuffer: 1% BSA
0,1% NaN₃ (Merck, Darmstadt) in PBS

Fixierlösung: 1% Paraformaldehyd (Sigma, Taufkirchen) in PBS

2.2.16.2 Nachweis von CD-Markern und Chemokinrezeptoren auf primären Blutlymphozyten

2.2.16.2.1 Analyse im Vollblut

Durch Verwendung des Erythrozyten-lyisierenden Reagenz Uti-Lyse™ (DAKO Diagnostica, Hamburg) kann ohne Aufreinigung der peripheren mononukleären Blutlymphozyten im Vollblut die Expression der CD-Marker und Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der PBMC analysiert werden. Dazu wurde frisches Citrat-Blut gesunder Spender eingesetzt. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Analyse der Oberflächenrezeptoren auf primären Lymphozyten wurden die folgenden Antikörper verwendet: anti-CD3 (Klon UCHT1, IgG1), anti-CD4 (Klon MT310, IgG1) und anti-CD8 (Klon DK25, IgG1) direktkonjugiert mit FITC, PE oder PE-Cy5 (DAKO Diagnostika, Hamburg), anti-CCR5 (Klon 2D7, IgG2a, k) und anti-CXCR4 (Klon 12G5, IgG2a, k), PE-konjugiert (BD Pharmingen, Heidelberg). Die entsprechenden IgG-Isotypkontrollen wurden jeweils vom gleichen Hersteller bezogen. Für die Färbungen wurden 5 µl der DAKO Diagnostika-Antikörper und 10 µl der BD Pharmingen-Antikörper eingesetzt. Die Analyse der Proben erfolgte am Tag der Färbung.

2.2.16.2.2 Analyse von kultivierten und transduzierten PBLs

Zur Analyse der Oberflächenmarker kultivierter PBLs zum Zeitpunkt der Transduktion und zur Analyse der transduzierten PBLs wurden 2×10^5 Zellen pro Färbung eingesetzt. Sie wurden einmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 30 µl Waschpuffer resuspendiert und die entsprechenden Antikörper zugegeben. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Waschschrritten wurden die Zellen in 500 µl 1% PFA-Lösung aufgenommen. Die Proben wurden innerhalb einer Woche nach Färbung analysiert.

Zur Analyse der Oberflächenrezeptoren dienten die bereits in der Vollblut-Analyse eingesetzten Antikörper. Für die Färbungen wurden 2,5 µl der DAKO Diagnostika-Antikörper und 5 µl der BD Pharmingen-Antikörper eingesetzt.

2.2.16.3 Nachweis der Expression von lentiviralen Hüllproteinen auf der Verpackungszelloberfläche

Zum Nachweis von SIVagm und HIV-1 Env auf der Oberfläche der Verpackungszellklone wurde das Serum eines SIVagm infizierten Schweinsaffen (*Macaca nemestrina* 170) bzw. das Serum eines HIV-1 infizierten Spenders (Nr. 456) verwendet. 5×10^5 Zellen der stabilen Verpackungszellklone wurden mit 5 mM EDTA in PBS abgelöst, pelletiert (1.300 rpm, 10 min, RT, Heraeus Minifuge T, Hanau) und in 1 ml einer 50%igen BSA-Lösung aufgenommen. Die 20 minütige Inkubation (4°C) der Zellen diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Nach dem Abzentrifugieren der BSA-Lösung wurden die Zellen in 30 µl Waschpuffer mit 1:1000 verdünnten Seren resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und in 30 µl Waschpuffer aufgenommen. Die spezifische Erstantikörperbindung wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper nachgewiesen. Als Zweitantikörper wurde ein anti-human IgG (g-Kette) F(ab')₂-Fragment, PE-gekoppelt (Sigma, Taufkirchen) aus der Ziege verwendet. Pro Ansatz wurden 1 µl der Stammlösung eingesetzt und bei 4°C für 20 min inkubiert. Als Negativkontrollen wurden zum einen die Hüllprotein-negativen TELCeB6-Zellen mit den Seren und dem Zweitantikörper inkubiert und zum anderen die Verpackungszelllinien ohne die Sereninkubation nur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 500 µl der 1% PFA-Fixierlösung aufgenommen. Die so markierten Zellen wurden bis zur Messung unter Lichtausschluß bei 4°C gelagert.

2.3 Material und Methoden zum Nachweis der Proteinexpression

2.3.1 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität (X-Gal-Test)

Der Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität von Zellen wurde nach einer modifizierten Methode (Sanes *et al.*, 1986) mittels X-Gal-Färbung durchgeführt. Mit dieser Methode wurde eine erfolgreiche Transduktion der GHOST-Zellen mit den verschiedenen MLV-abgeleiteten, β -Galaktosidase transferierenden Pseudotypvektoren nachgewiesen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 10 min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit der X-Gal-Substratlösung für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei dieser Färbemethode wird das X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid; Sigma, Taufkirchen) durch die β -Galaktosidase metabolisiert. Der Vektortiter wurde mittels Auszählung der blauen Zellen unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Der Titer wird in infektiösen Einheiten pro ml (i.E./ml) angegeben.

Fixierlösung: 2% Formaldehyd
 0,2% Glutaraldehyd in PBS

X-Gal-Substratlösung: X-Gal [1 mg/ml], (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-
 Galaktopyranosid; Sigma, Taufkirchen)
 5 mM K-Ferricyanid ((K₃Fe(CN)₆), Sigma, Taufkirchen)
 5 mM K-Ferrocyanid ((K₄Fe(CN)₆), Sigma, Taufkirchen)
 2 mM MgCl₂ in PBS

2.3.2 Seren und Antikörper für den Nachweis viraler Proteine

Die verwendeten Seren und Antikörper zum Nachweis der verschiedenen viralen Proteine in den unterschiedlichen Assays sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Neben dem Zielantigen ist die Herkunft der/des Seren/Antikörpers und die eingesetzte Konzentration in den unterschiedlichen Assays angegeben:

Antigen	Art/Herkunft	Assay
FrMLV gp71 SU; Kreuzreagiert mit ecotropen MLV Env	isoliertes Gesamt-IgG aus mit FrMLV (Friend- Maus-Leukämie-Virus) infizierter Ziege; Heinz Schwarz, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen	IPA 1:300
HIV-1 (Plasma Nr. 456)	Plasma eines HIV-1-positiven Spenders (Nr. 456); Dr. S. Norley, PEI, Langen	IPA 1:1000 DFZ 1:1000 N 1:20
SIVagm	Plasma aus SIVagm3mc-infiziertem Schweinsaffen (<i>Maccaca nemestrina</i> , Nem170); Dr. B. Beer, PEI, Langen	IPA 1:400 DFZ 1:1000 MACS 1:1000 WB 1:400
RLVp30Gag; kreuzreagiert mit ecotropen MLV p30Gag	polyklonales Antiserum aus mit RLVp30Gag (Rauscher Leukemia Virus) immunisierter Ziege (Lot 81S000263); Viromed, Camden ,NJ ,USA	IPA 1:1000 WB 1:10000
HIV-1 (Plasma Nr. 259, 275, 369)	Plasma von 3 HIV-1 infizierten Spendern mit bekanntem Neutralisationstiter (J. Stitz, Dissertation, 1998) gegenüber HIV-1 _{III} B; Dr. S. Norley, PEI, Langen	N 1:20

Tab. 2.1 Übersicht der verwendeten Seren und Antikörper zum Nachweis viraler Proteine.
IPA – *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay; DFZ - Durchflußzytometrie; WB - Western Blot; N -
Neutralisationsassay

2.3.3 *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay (IPA)

In dieser Arbeit wurde die *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung zum Nachweis viraler Proteine in Zellen verwendet. Die Detektion erfolgt durch die Bindung eines primären Antikörpers, der spezifisch gegen das nachzuweisende Hüllprotein oder ein anderes virales Protein gerichtet ist. In einem zweiten Schritt bindet mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Protein G an den konstanten Teil des primären Antikörpers. Die Peroxidase läßt sich durch eine Substratreaktion, die zu einer roten Färbung führt,

nachweisen. Durch die Färbung werden die Zellen mit viraler Proteinexpression identifiziert.

Stabile Verpackungszellkulturen oder infizierte Kulturen wurden in 6- oder 12-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag auf die Expression viraler Proteine untersucht. 48 Stunden nach Transfektion der 293T-Zellen und Kokultivierung mit Suspensionszellen wurden die Ansätze analysiert. Die Zellen wurden mit Methanol 20 min bei -20°C fixiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden abgesättigt, indem die fixierten Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur in 2 ml Blockingpuffer inkubiert wurden. Nach Abziehen des Blockingpuffers wurde 1 ml der spezifischen Seren bzw. der Erstantikörperlösung (anti-SIVagm-Serum eines SIVagm infizierten Schweinsaffen, anti-HIV-1-Serum eines HIV-1 infizierten Spenders Nr. 456 oder anti-MLVp30Gag-Antikörper; Verdünnungen siehe Tab. 2.1) zu den Zellen pipettiert, danach folgte eine Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Die Antikörperlösung wurde abgezogen und die fixierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen bevor 1 ml der mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelte Protein G (Bio-Rad, München)-Lösung (1:1000 verdünnt in PBS mit 2% BSA) zugegeben wurde. Der Erstantikörper konnte durch Filtration der abgezogenen Lösung zurückzugewonnen werden. Nach einer weiteren Inkubation für eine Stunde bei 37°C wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Substratlösung bedeckt. Die Intensität der Färbung wurde am Mikroskop kontrolliert und die Reaktion mit Leitungswasser abgestoppt. Die Auswertung des IPA erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

Blocking-Puffer: 2% BSA in PBS

Substratlösung: 4 mg Farbstoff (3-Amino-9-Ethylcarbazol; Sigma, Taufkirchen)
1 ml Dimethylformamid (Sigma, Taufkirchen)
19 ml 0,02 M Na-Acetat-Puffer, pH 5,2 (RT)
20 μl H_2O_2 (Sigma-Aldrich)

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit diesem Verfahren (modifiziert nach Laemmli, 1970) werden Proteingemische nach ihrem apparenten Molekulargewicht durch die Molekularsiebeigenschaften des

Polyacrylamid-Gelsystems aufgetrennt. Hierbei umgibt das negativ geladene Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) die Proteine mit negativen Ladungen im Überschuß, so daß deren eigentliche Nettoladung nicht mehr zum Tragen kommt. Verwendet wurden diskontinuierliche Gele, die sich aus einem niederprozentigen Sammelgel, zur Konzentration der Proteine, und einem höherprozentigen Trenngel zusammensetzen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1% APS (Ammoniumpersulfat, Gibco/Life Technologies, Eggenstein) und 0,05% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Serva, Heidelberg) eingeleitet.

Probenaufbereitung:

Für den Nachweis der SIVagm-Hüllproteinvarianten in den Vektorpartikeln wurden 20 ml vektorhaltiger Überstand (DMEM, 6% FKS, 10 mM Natrium-Butyrat) aus einer konfluenten Verpackungszellkulturflasche filtriert (0,45 µm, Satorius, Göttingen) und mittels Ultrazentrifugation durch ein 20%iges Zuckerkissen (2 h, bei 4°C, im SW28-Rotor, 25.000 rpm in einer Ultrazentrifuge; Beckmann, München) pelletiert. Das Viruspellet wurde in 60 µl PBS aufgenommen und bei -80°C gelagert. 30 µl der Probe wurden vor dem Gelauftrag mit 10 µl 4x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht.

Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels

	Sammelgel (5%)	Trenngel (10%)
Aqua bidest.	2,9 ml	3,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	0,83 ml	2,51 ml
Laemmli B	-----	1,875 ml
Laemmli C	1,25 ml	-----
10% APS	40 µl	75 µl
TEMED	3 µl	4 µl

30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese, Roth, Karlsruhe)

Laemmli B [pH 8,8]: 1,5 M Tris/HCl
 0,4% SDS

Laemmli C [pH 6,8]:	0,5 M Tris/HCl 0,4% SDS
4x Laufpuffer:	0,1 M Tris/HCl, pH 8,3 0,77 M Glycin 0,4% SDS
4x Probenpuffer:	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 20% Glycerin 4% SDS 10% β -Mercapto-Ethanol 20 mg/l Bromphenolblau

Als Größenstandard wurde der Protein-Molekulargewichts-Marker Full range Rainbow (RPN 800, Amersham Biosciences, Freiburg) mit den Größen 250/160/105/70/50/35/30/25/15/10 kD verwendet.

Die Durchführung des diskontinuierlichen SDS-PAGE erfolgte mittels einer Mighty small II SE 250 Apparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Laufdauer betrug ca. 1 Stunde bei 30 mA.

2.3.5 Western Blot

Die Übertragung von Proteinen, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden auf eine Membran (Towbin *et al.*, 1979) wird in Anlehnung an den Nukleinsäuretransfer nach Southern (Southern, 1975) Western Blotting genannt.

Die Gele wurden auf Filterpapier (Whatmann-3MM) überführt und mit in Methanol präinkubierter PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) und einer weiteren Lage Filterpapier in eine Kunststoffkassette eingespannt. Der Blot-Prozeß erfolgte in Blotting-Puffer bei 300 mA über 3 Stunden unter Kühlung in einer Blotting-Apparatur (KMO2 electronic; Janke & Kunkel, Staufen). Nach dem Protein-Transfer wurden die Membranen 30 min in 1% Tween 20 in PBS und anschließend für 1 h in Blocking Puffer inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Blots mit dem entsprechenden Serum bzw. Primärantikörper (anti-SIVagm Serum bzw. anti-MLVp30Gag in Blocking-Puffer; Verdünnung siehe Tab. 2.1) für 1 h bei RT oder

bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit 0,1% Triton X-100 (in PBS) erfolgte für 1 Stunde bei RT die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Als Sekundärantikörper wurde Meerrettich-Peroxidase ("*horseradish peroxidase*", HRP) gekoppeltes Protein G (Bio-Rad, München) verwendet. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschschritten erfolgte der Nachweis der Proteine in der ECL-Reaktion. Sie wurde mit dem ECL Detection Reagent Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase setzt bei der Spaltung ihres Substrates (ECL Solution 1 und 2 im Verhältnis 1:1) Energie in Form von Chemilumineszenz frei. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte auf speziellen Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg). Je nach Stärke des Signals wurden die Filme zwischen 25 Sekunden und 4 Minuten exponiert.

Nach gründlichem Waschen der Membran mit Waschpuffer zum Entfernen der ECL-Lösung konnte die Membran zur weiteren Analyse mit einem anderen Zweitantikörper behandelt werden. Es wurde wie bei der Erstfärbung verfahren.

Blotting-Puffer [pH 8,3]: 25 mM Tris/HCl
 192 mM Glycin
 20% Methanol

Blocking-Puffer: 10% FKS
 1% BSA
 0,1% Triton X-100
 in PBS

Waschpuffer: 0,1% Triton X-100
 in PBS

2.3.6 Nachweis der Reverse Transkriptase-Aktivität

Zum Nachweis der Reversen Transkriptase (RT) wurde der C-type-RTTM Activity Assay der Firma Cavid Tech (Uppsala, Schweden) verwendet. Er ermöglicht die Bestimmung der RT-Aktivität, und damit die Menge an RT direkt aus 10 µl Zellkulturüberstand. 500 µl Zellkulturüberstand wurden filtriert (0,45 µm) und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Der Test wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Positive RT-Werte

werden durch einen farbigen Niederschlag angezeigt, dieser wurde in einem ELISA-Reader (SLT.Spectra, Spectra II, Tecan, Crailsheim) bei 405nm gemessen. Die bestimmte OD kann mit Hilfe eines mitgeführten Standards im linearen Bereich in mU RT/ml umgerechnet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Charakterisierung von [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren

3.1.1 Austausch der zu HIV-1 homologen V3-Loop-Sequenz des *env*-Gens von SIVagm durch einen CXCR4-tropen oder einen CCR5-tropen HIV-1 V3-Loop

Die Nutzung unterschiedlicher Korezeptoren für den Zelleintritt von HIV-1 wird zum großen Teil auf die unterschiedlichen Sequenzen im V3-Loop zurückgeführt. Ob die Korezeptornutzung von SIVagm ebenfalls durch den V3-Loop bestimmt wird ist bisher unklar. Durch den Austausch der zu HIV-1 homologen V3-Loop-Region in SIVagm-SU durch V3-Loop-Sequenzen von HIV-1 soll die Korezeptornutzung von SIVagm gezielt beeinflusst werden. Hintergrund ist die Entwicklung von [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren mit veränderter Korezeptornutzung.

Durch einen Aminosäurevergleich zwischen dem V3-Loop aus dem CXCR4-tropen Molekularklon HIV-1_{BH10} und dem SU-Protein des simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (SIVagm; Molekularklon SIVagm₃) wurde eine 34 Aminosäuren umfassende Sequenz zwischen zwei Cystein-Resten identifiziert, die den 36 Aminosäuren des V3-Loops aus HIV-1_{BH10} zu 33% homolog ist (Abb. 3.1). Die 35 Aminosäuren lange Sequenz des V3-Loops des CCR5-gängigen HIV-1 Molekularklons HIV-1_{SF162} ist der HIV-1 homologen V3-Loop-Region von SIVagm₃ zu 38% homolog, dem CXCR4-gängigen HIV-1_{BH10} V3-Loop immerhin zu 71%.

Isolat	Korezeptor	Aminosäuresequenz	Homologie
SIV agm _{3mc}	CCR5/Bonzo	CKRPGNKTVLPVTIMAG--LVFHSQR-YNTRLRQAWC	100%
HIV-1 _{BH10mc}	CXCR4	CTRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKI-GNMRQAHC	33%
HIV-1 _{SF162mc}	CCR5	CTRPNNNTRKSITI--GPGRIFYATGDIIGDIRQAHC	38%

Abb. 3.1 Identifizierung des putativen V3-Loops von SIVagm₃. Aminosäurevergleich verschiedener HIV- und SIV-Stämme.

Es ist jeweils der hauptsächlich genutzte Korezeptor und die Aminosäurehomologie zu SIVagm₃ angegeben. mc - Molekularklon

Um den potentiellen V3-Loop von SIVagm exakt gegen den V3-Loop von HIV-1_{BH10} oder HIV-1_{SF162} auszutauschen wurde eine spezielle Fusions-PCR-Strategie (Methode nach Horton *et al.*, 1989) mit drei Fragmenten angewandt. Dabei wurde der 34

Aminosäuren umfassende V3-Loop-Bereich (SIVagm Position 6725 bis 6827) ausgetauscht und keine Veränderung in den flankierenden Bereichen vorgenommen. Der Austausch wurde im Expressionskonstrukt pRep Δ 10env durchgeführt (Abb. 3.2). Es kodiert für das Oberflächenprotein (SU) des SIVagm Hüllproteins (SIVagm-wt; wt für Wildtyp) und das 10 Aminosäuren nach der Transmembranregion (TMR) trunkierte TM-Protein inklusive der flankierenden *rev*-Exons.

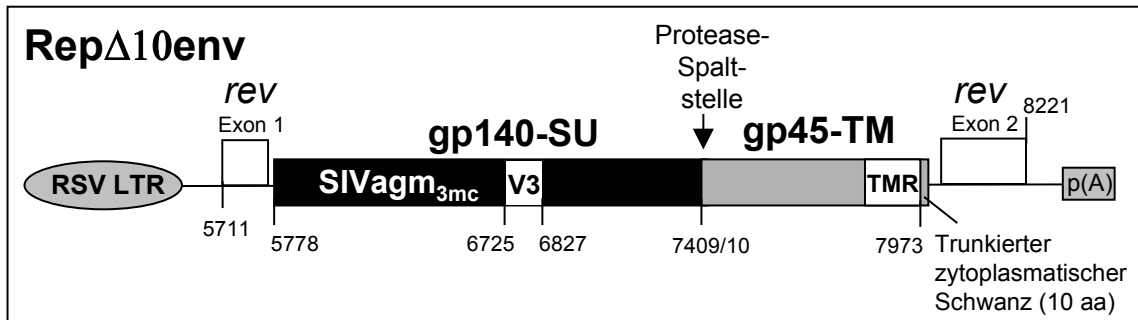


Abb. 3.2 Die SIVagm Env-Expressionskassette in pRep Δ 10env.

Die SIVagm Gene *rev* und *env* werden von einer RSV LTR getrieben. Zur Expression von Rev wird das Exon 1 mit Exon 2 durch Herauspleißen der dazwischen liegenden Sequenz verbunden. Der V3-Loop befindet sich im gp140-SU. Die angegebenen Nukleotidpositionen entsprechen der SIVagm₃-Sequenz nach GenBank Accession Nr. M30931. Aufgrund der Trunkierung des C-Terminus des TM-Proteins kann dieses SIVagm Env mit MLV-Kapsiden Pseudotypvektoren bilden. aa - Aminosäuren ("aminoacid"); TMR - Transmembranregion; p(A) - Polyadenylierungssequenz

Der Austausch wurde in zwei getrennten PCR-Runden durchgeführt (Übersicht in Abb. 3.3). In der ersten Runde wurden drei Fragmente (Nr. 1, 2 und 3) in getrennten PCR-Ansätzen hergestellt. Fragment Nr. 1 und Nr. 3 wurden auf dem SIVagm *env*-Template (pRep Δ 10env) erzeugt. Fragment Nr. 1 entspricht einem 5' an die V3-Loop-Sequenz von SIVagm *env* grenzenden Fragment, welches die nahegelegene singuläre Schnittstelle *BsrGI* (Position 6297) aus dem SIVagm *env*-Gen überspannt (525 bp; Primer A und B), und Fragment Nr. 3, ein 3' an die V3-Loop-Sequenz von SIVagm *env* grenzendes Fragment, welches die nahegelegene singuläre Schnittstelle *BstZ171* (Position 7378) enthält (605 bp; Primer E und F).

Das dritte Fragment (Nr. 2, 148 bp für HIV-1_{BH10} bzw. 145 bp für HIV-1_{SF162}) wurde auf dem entsprechenden V3-Loop Spenderplasmid pL128 für HIV-1_{BH10} oder pHIVSF162env für HIV-1_{SF162} erzeugt. Für diese PCR wurden Hybrid-Primer verwendet. Sie enthielten neben der Sequenz des jeweils zu amplifizierenden HIV-1 V3-Loops einen Überhang aus der 5' bzw. 3' der SIVagm V3-Loop umgebenden Sequenz (Primer C und D). Zusätzlich wurde durch den Primer C die durch die ersten sechs Nukleotide der zu inserierenden HIV-1 V3-Loop kodierenden Sequenz TGTACA

gebildete Schnittstelle für *BsrGI* zu TGCACA mutiert. Es handelt sich um eine stille Mutation, die keine Aminosäureänderung bewirkt. Die Schnittstelle mußte entfernt werden, damit ein Rückklonieren des V3-Loop enthaltenden Fragmentes über *BsrGI* und *BstZ171* in die komplette SIVagm *env*-Sequenz in pRep Δ 10*env* möglich war.

In der zweiten PCR-Runde wurden die drei über Gelelektrophorese aufgereinigten Fragmente in der eigentlichen Fusions-PCR zusammengebracht und mit den beiden äußeren Primern A und F amplifiziert. Es entstand das Fusionsfragment Nr. 4 (1240 bp bzw. 1237 bp), welches anschließend mit *BsrGI* und *BstZ171* verdaut wurde (1087 bzw. 1084 bp). Das Fusionsfragment wurde über *BsrGI* und *BstZ171* in pRep Δ 10*env* inseriert, wodurch der V3-Loop-Austausch abgeschlossen war.

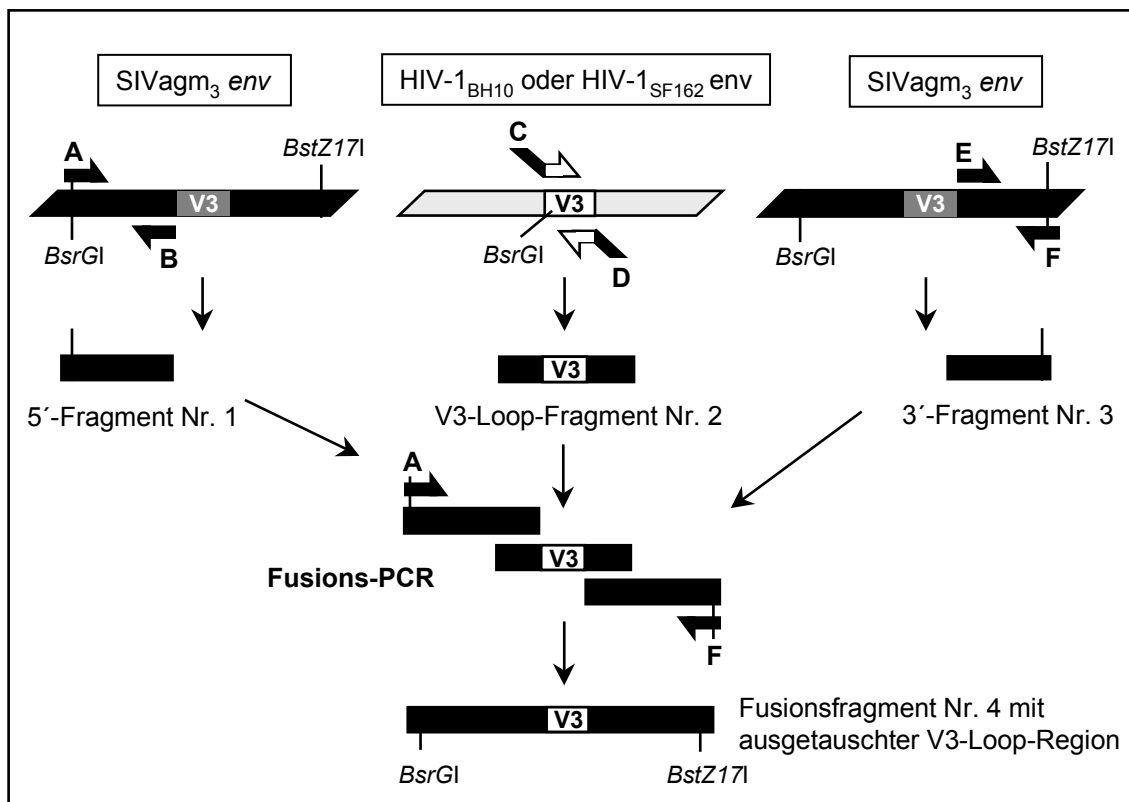


Abb. 3.3 Schema der Fusions-PCR zum V3-Loop-Austausch.

Zwei der HIV-1_{BH10} V3-Loop enthaltenden Klone wurden sequenziert, beide zeigten die korrekte Nukleotidsequenz. Die neue SIVagm Env-Variante wurde mit SIVagm-X4 bezeichnet, X4 steht für den Tropismus des HIV-1 V3-Loop-Spender Isolates.

Von den HIV-1_{SF162} V3-Loop enthaltenden Klone wurden drei Klone sequenziert, welche alle eine Mutation 5' oder 3' des inserierten V3-Loops zeigten. Die Nukleotidaustausche lagen im Bereich der Primer. Sie sind wahrscheinlich durch

Verwendung nicht korrekt synthetisierter Primer in das Konstrukt eingeführt worden. In zwei dieser Klone kam es durch den Nukleotidaustausch zu keiner Aminosäureänderung (stille Mutation), weshalb die Konstrukte trotzdem verwendet werden konnten. Diese Env-Variante wurde mit SIVagm-R5 nach dem CCR5-gängigen V3-Loop-Spender Isolat benannt.

Für die anschließenden Untersuchungen standen neben den neu generierten SIVagm Env-Varianten ein CXCR4-gängiges HIV-1 Env und ein daraus durch V3-Loop-Austausch abgeleitetes CCR5-gängiges HIV-1 Env (P. Müller, Dissertation, 1999) zur Verfügung (Tab. 3.1).

Bezeichnung	Env-Variante
SIVagm-wt	Wildtyp-SIVagm ₃ Env
SIVagm-X4	SIVagm ₃ Env mit V3-Loop des CXCR4-nutzenden HIV-1 _{BH10}
SIVagm-R5	SIVagm ₃ Env mit V3-Loop des CCR5-nutzenden HIV-1 _{SF162}
HIV-X4	HIV-1 _{BH10} Env
HIV-R5	HIV-1 _{BH10} Env mit V3-Loop des CCR5-nutzenden HIV-1 _{MBK}

Tab. 3.1 Überblick über die eingesetzten lentiviralen Hüllproteinvarianten.

3.1.2 Funktionalität der konstruierten SIVagm Env-Varianten im Synzytientest

Um die Expression und Rezeptorerkennung der neu konstruierten SIVagm Env-Varianten zu testen, wurde ihre Fähigkeit zur Bildung von Synzytien untersucht. Synzytien sind durch Fusion mehrerer Zellen entstandene blasenförmige Riesenzellen. Die Zellfusion wird durch die Bindung der auf der Oberfläche von Zellen präsentierten lentiviralen Hüllproteine mit dem CD4-Oberflächenmarker und einem Korezeptor auf benachbarten Zellen bewirkt.

Hierzu wurden die SIVagm Env-Konstrukte in 293T-Zellen transfiziert und diese nach 24 Stunden mit der humanen T-Zelllinie Molt4/8 überschichtet. Für Molt4/8-Zellen ist die Expression von CD4, dem Korezeptor CXCR4 und in geringer Menge CCR5 nachgewiesen (Dejucq *et al.*, 1999). Als Positiv-Kontrollen dienten mit dem CXCR4-gängigen HIV-1_{BH10} Env bzw. dem CCR5-gängigen HIV-1_{MBK} Env transfizierte 293T. Als Negativ-Kontrolle wurden untransfizierte 293T-Zellen verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.4 dargestellt.

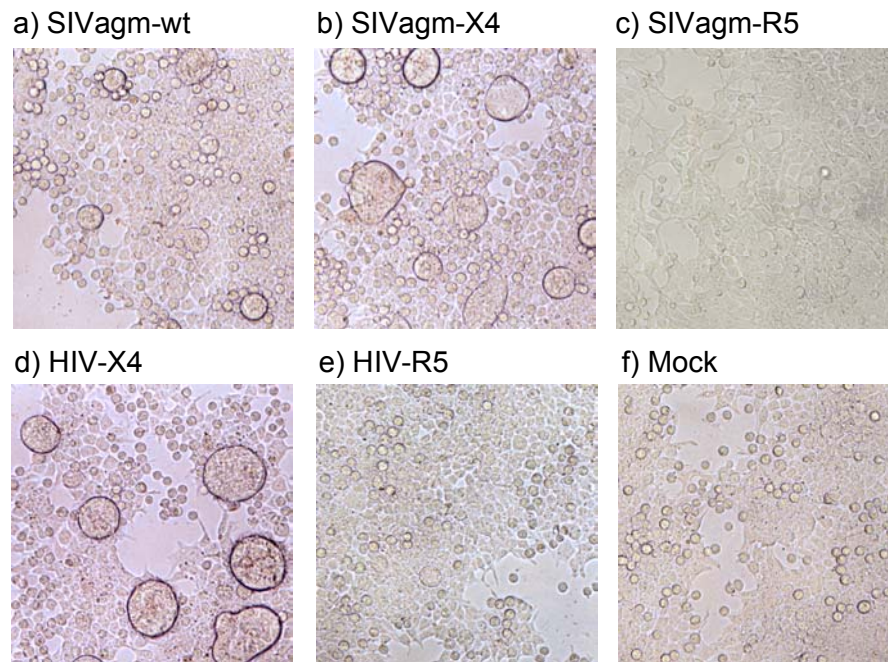


Abb. 3.4 Funktionalität der Env-Varianten: Synzytieninduktion durch die Expression der lentiviralen Hüllproteine.

293T-Zellen nach Transfektion mit den angegebenen Env-Varianten und anschließender Kokultur mit der humanen T-Zelllinie Molt4/8.

Außer SIVagm-R5 Env (Abb. 3.4 c) bewirkten alle Env-Varianten eine unterschiedlich starke Synzytienbildung. Die schwache Synzytieninduktion durch HIV-R5 Env (Abb. 3.4 e) ist vermutlich auf die geringe Menge exprimiertem CCR5-Korezeptor auf Molt4/8-Zellen zurückzuführen. Außerdem sind CCR5-nutzende HIV-Varianten oft weniger fusogen als CXCR4-nutzende Varianten. Die starke Synzytienbildung der übrigen Varianten ist durch die Verwendung der C-terminal trunkeierten Env-Varianten zu erklären, da die Trunkierung die Fusogenität gegenüber Hüllproteinen mit komplettem zytoplasmatischen Anteil erhöht (Wilk *et al.*, 1992).

Um auszuschließen, daß zuwenig Zellen mit der SIVagm-R5 Env-Variante transfiziert worden waren und deshalb keine Synzytienbildung erfolgen konnte, wurden die Transfektanden im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay auf die Expression von Env analysiert (Abb. 3.5). Zur Detektion der SIVagm-Varianten wurde das Serum eines SIVagm₃-infizierten Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*, Nemestrinaserum N170) verwendet, zur Detektion der HIV-Varianten wurde das Serum eines HIV-1 infizierten Spenders (Nr. 456) verwendet. Untransfizierte 293T-Zellen wurden ebenfalls mit beiden Seren inkubiert.

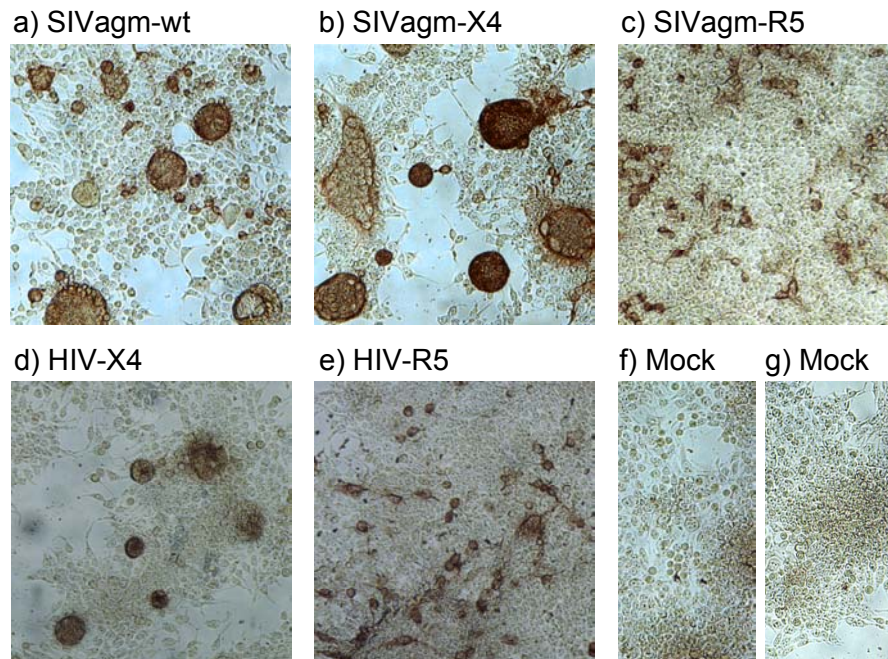


Abb. 3.5 Hüllproteinexpression im Synzytieninduktionsassay. *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay von 293T-Zellen nach Transfektion mit den angegebenen Konstrukten und Kokultivierung mit Molt4/8. Zur Färbung benutzte Seren: a), b), c), f) anti-SIVagm Serum; d), e), g) anti-HIV-1 Serum.

Alle Synzytien (Abb. 3.5 a, b, d, e) wurden rot gefärbt. Offensichtlich ist die Synzytienbildung auf die Expression der Hüllproteine zurückzuführen. Obwohl SIVagm-R5 (Abb. 3.15 c) keine Synzytien induzierte, konnte die Env-Expression in Einzelzellen nachgewiesen werden. Die Expressionsrate ist mit der der anderen Ansätze vergleichbar. In der untransfizierten 293T-Kultur wurden erwartungsgemäß keine rot gefärbten Zellen nach Inkubation mit anti-SIVagm Serum (Abb. 3.15 f) bzw. anti-HIV-1 Serum (Abb. 3.15 g) gefunden.

Die über Fusions-PCR konstruierten Env-Varianten SIVagm-X4 und SIVagm-R5 werden also exprimiert. Nur die SIVagm-X4 Env-Variante zeigte die Fähigkeit zur Fusogenität, ist also zur Bindung von CD4 und einem Korezeptor in der Lage. Wahrscheinlich ist der SIVagm-R5 Env-Variante die Bindung eines Korezeptors nicht möglich.

3.1.3 Bildung von [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren

Um zu testen, ob mit den neu erhaltenen SIVagm Env-Varianten die Pseudotypisierung von MLV-Vektoren und dadurch die Transduktion CD4-positiver Zielzellen möglich ist, wurden 293T-Zellen mit den Expressionskonstrukten für die

viralen Strukturproteine Gag und Pol des MLV (pHIT60), ein verpackbarer *lacZ*-transferierender MLV-Transfektor (MFGNLS/*lacZ*) und jeweils einem der SIVagm Env-Varianten kodierenden Plasmide kotransfiziert. Der Überstand wurde durch Übertragen auf CD4-positive Zellen auf das Vorhandensein infektiöser Partikel analysiert. Als Zielzellen wurden Zellen des sogenannten GHOST-Pannels verwendet: Sie exprimieren stabil den CD4-Oberflächenmarker (GHOST/parental) oder CD4 in Kombination mit einem der bisher bekannten Chemokinrezeptoren (GHOST/CXCR4, GHOST/CCR5, etc.), welche als Korezeptoren für HIV und SIV fungieren. Die erfolgreiche Transduktion konnte zwei Tage nach dem Übertragen der Überstände durch Nachweis der Expression von β -Galaktosidase nach X-Gal-Färbung in den Zielzellen gezeigt werden (Tab. 3.2).

Vektortiter der Pseudotypen in i.E./ml			
GHOST-Zellen	[MLV(SIVagm-wt)]	[MLV(SIVagm-X4)]	[MLV(SIVagm-R5)]
/parental	$1,8 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	< 1
/CCR5	$1,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^2$	< 1
/CXCR4	$0,7 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$	< 1
/Bonzo	$5,8 \times 10^3$	$1,9 \times 10^2$	< 1

Tab. 3.2 Korezeptorabhängigkeit und Titer transient generierter Pseudotypvektoren.

Die Titer auf GHOST/parental-Zellen müssen als Hintergrundtransduktion gewertet werden, sie sind auf die bekannte endogene Expression an CXCR4 und Bonzo in der Ausgangszelllinie (Edinger *et al.*, 1998) zurückzuführen. Für [MLV(SIVagm-wt)]-Pseudotypvektoren konnte unter Berücksichtigung der Hintergrundtransduktion die Benutzung von CCR5 und Bonzo bestätigt werden. Im Vergleich dazu wurde für die [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren ein Korezeptorwechsel festgestellt: [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren haben die Fähigkeit verloren, die Korezeptoren CCR5 und Bonzo für den Zelleintritt zu nutzen, statt dessen verwenden sie den Korezeptor CXCR4. [MLV(SIVagm-R5)]-Vektoren waren dagegen nicht in der Lage, einen der angebotenen Korezeptoren zum Zelleintritt zu nutzen.

3.1.4 Etablierung stabiler Verpackungszellen für [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren

Stabile Verpackungszellen erlauben eine transfektionsunabhängige Vektorernte und ergeben größere Mengen an Vektor und meist auch höhere Titer als transiente Verpackungszellen. Aus diesem Grund wurden stabile Verpackungszellen für die weitere Charakterisierung der [MLV(SIVagm)]-Vektoren etabliert. Die bereits vorhandene Verpackungszelllinie $\Delta 0$ Mix für die Produktion von [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren (Stitz *et al.*, 2000a) hatte nach dem Auftauen ihren ursprünglichen Titer von 8×10^4 i.E./ml nicht mehr erreicht, deshalb wurde auch für diesen Pseudotypvektor eine neue Verpackungszelllinie generiert.

Die stabilen Verpackungszellen wurden auf Basis der Hüllprotein-negativen MLV-Verpackungszelllinie TELCeB6 (Cosset *et al.*, 1995) hergestellt, welche stabil die MLV-Proteine Gag und Pol exprimiert und einen verpackbaren *lacZ* transferierenden MLV-Transfervektor trägt. Die transfizierten SIVagm Env-Konstrukte tragen eine Hygromycinresistenz-vermittelnde Kasette. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Hygromycin-haltigem Medium kultiviert und nur das Resistenz-Gen exprimierende Einzelzellen können wachsen. Die Klone wurden von der Kulturschale abgenommen und zunächst in 12-Loch-Platten expandiert. Durch Übertragen der Überstände auf GHOST-Zellen und anschließendem X-Gal-Test wurden die einzelnen Klone auf ihre Fähigkeit zur Bildung von infektiösen Vektorpartikeln untersucht (Tab. 3.3).

Zur Kontrolle der korezeptorspezifischen Transduktion wurden [MLV(HIV-1)]-Vektoren mit bekanntem Tropismus eingesetzt. Zur Produktion von CD4/CXCR4-gängigen [MLV(HIV-X4)]-Vektoren stand die von TELCeB6-Zellen abgeleitete Verpackungszelllinie K52SR20 zur Verfügung (Schnierle *et al.*, 1997; Stitz *et al.*, 1998). Für die Produktion von CD4/CCR5-gängigen [MLV(HIV-R5)]-Vektoren wurde eine stabile Linie mit einem CCR5-gängigen HIV-1 Env generiert. Zur Produktion von [MLV(MLV-A)]-Vektoren, die keine CD4-Spezifität aufweisen, wurden keine Einzelzellklone isoliert, sondern die Antibiotika-resistenten Klone wurden als Mischkultur verwendet. Die Env-Proteine waren auf unterschiedlichen Expressionsplasmiden kodiert, zur Selektion von HIV-R5 Env mußte G418 (Geneticin) und zur Selektion von MLV-A Env Phleomycin eingesetzt werden.

Pseudotyp- vektor	Anzahl analysierter Klone	Anteil produktiver Klone	ausgewählter Verpackungs- zellklon	Vektortiter [i.E./ml] [⊗]
[MLV(SIVagm-wt)]	200	30%	wt.6	2x10 ⁴
[MLV(SIVagm-X4)]	200	5%	X4.3	5x10 ²
[MLV(SIVagm-R5)]	50	0%	R5.36	< 1
[MLV(HIV-X4)]	150 [#]		K52SR20	5x10 ⁵
[MLV(HIV-R5)]	50	> 50%	MBK.15	1x10 ⁶
[MLV(MLV-A)]	MK [*]		TeLMLV-A	2,5x10 ⁵

Tab. 3.3 Überblick über die verschiedenen Verpackungszellklone.

Der Vektortiter ist als Mittelwert aus drei bis fünf Vektorernten und Titrationsen angegeben.

[#] Die Klone wurden von Dr. J. Stitz, PEI, Langen selektioniert. ^{*} MK - Mischkultur

[⊗] Die Vektoren wurden auf der GHOST-Linie des jeweiligen Hauptkorezeptors titriert, die [MLV(MLV-A)]-Vektoren auf GHOST/parental.

Es konnten weniger produktive [MLV(SIVagm-X4)]-Verpackungszellklone identifiziert werden als für [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren. Die Überstände der stabilen Verpackungszellklone für [MLV(SIVagm-R5)]-Vektoren führten in keinem Ansatz zur Transduktion von GHOST-Zellen. Pro Linie wurden die drei bis vier Klone mit dem höchsten Titer expandiert und erneut auf ihren Vektortiter überprüft. Dabei zeigte sich, daß der Titer mit andauernder Kulturzeit der [MLV(SIVagm)]-Verpackungszelllinien abfiel. Außerdem erreichten eingefrorene Zellklone nach dem Auftauen ihren ursprünglichen Vektortiter meist nicht mehr.

Die Etablierung eines Verpackungszellklons zur Produktion von CCR5-gängigen [MLV(HIV-R5)]-Vektoren mit einem Titer > 10⁴ i.E./ml erwies sich leichter als die Etablierung entsprechender [MLV(SIVagm)]-Verpackungszelllinien. Die Mischkultur TeLMLV-A zur Produktion von amphotropen Vektoren besteht aus ca. 50 Einzelzellklonen.

Die Vektortiter schwankten von Ernte zu Ernte, angegeben sind deshalb Mittelwerte aus drei bis fünf Ernten und Titrationsen. Die Titer der [MLV(SIVagm)]- und [MLV(HIV-1)]-Vektoren unterlagen einem größeren Schwankungsbereich als der Titer der [MLV(MLV-A)]-Vektoren.

3.1.5 Expression von SIVagm Env in den Verpackungszellklonen

Erfahrungen mit stabilen Verpackungszelllinien zeigten, daß die Titer der Linien meist mit der Menge an exprimiertem Hüllprotein pro Zelle und auch mit der Anzahl Hüllprotein-positiver Zellen in der Kultur korrelierten. Möglicherweise ist der niedrige Titer der [MLV(SIVagm)]-Verpackungszelllinien auf eine geringe Expression der SIVagm Hüllproteinvarianten zurückzuführen.

Die erhaltenen [MLV(SIVagm)]-Verpackungszellklone wurden daher im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay (IPA) auf die Expression von SIVagm Env untersucht (Abb. 3.6). Zur Anfärbung wurde das Serum eines SIVagm infizierten Schweinsaffen (Nemestrina) verwendet. Die Hüllprotein-negative Ausgangszelllinie TELCeB6 wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

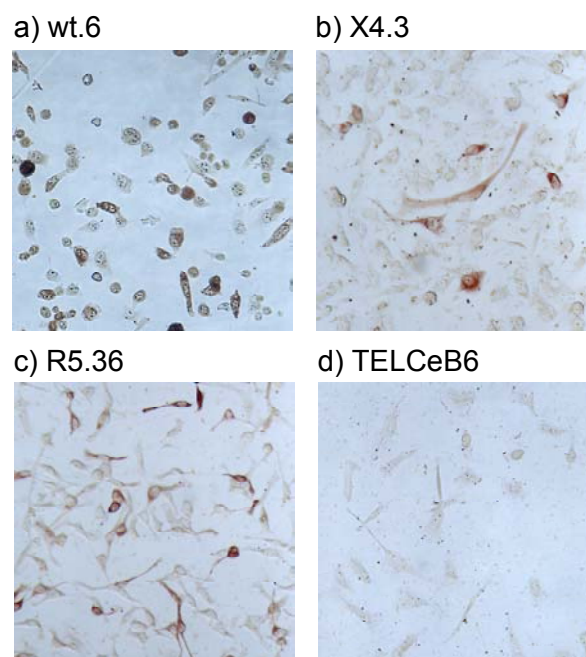


Abb. 3.6 SIVagm-Hüllproteinexpression in den stabilen Verpackungszellkulturen.

In-situ-Immun-Peroxidase-Färbung mit anti-SIVagm Serum. a) Verpackungszelle für [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren; b) Verpackungszelle für [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren; c) Verpackungszelle für [MLV(SIVagm-R5)]-Vektoren; d) *env*-negative Verpackungszelle

Es zeigte sich, daß nur eine Minderheit der Zellen in den einzelnen Verpackungszellkulturen SIVagm Env exprimierten. Die Klone wurden unter ständiger Antibiotikumselektion gehalten und exprimierten daher das Antibiotikumresistenzvermittelnde Gen. Jedoch schienen sie die Expression des lentiviralen Hüllproteins eingestellt zu haben.

Alle untersuchten Klone der stabil selektionierten Linie für die Produktion von [MLV(SIVagm-R5)]-Vektoren zeigten die Expression von SIVagm-R5 Env. Das Unvermögen der Überstände, die Transduktion von GHOST-Zellen zu vermitteln, kann deshalb nicht auf eine fehlende Expression in den Verpackungszellen zurückzuführen zu sein. Da offensichtlich durch die Insertion des V3-Loops des CCR5 nutzenden HIV-1_{SF162} Isolates in SIVagm Env eine Variante entstanden ist, die nicht zur Transduktion von permissiven Zielzellen befähigt ist, wurde diese Variante nicht weiter zur Entwicklung von Pseudotypvektoren verwendet.

3.1.6 Anreicherung SIVagm Env-positiver Verpackungszellen

Da die Immunfärbungen der Verpackungszellkulturen zeigten, daß nur ein geringer Teil der Zellen die SIVagm-Hüllproteine tatsächlich exprimiert, wurde durch eine Anreicherung dieser Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) versucht, den Vektortiter zu steigern.

Bei der Benutzung von Seren anstelle von spezifischen monoklonalen Antikörpern kann es bei FACS oder MACS-Markierungen zu Problemen durch unspezifische Bindungen an die Zelloberfläche kommen. Daher wurde vor der Sortierung der SIVagm Env-positiven Zellen in der durchflußzytometrischen Analyse getestet, ob das vorhandene Serum eines SIVagm infizierten Schweinsaffen geeignet ist.

SIVagm-wt Env-transfizierte 293T-Zellen wurden auf die Expression des Hüllproteins im FACS untersucht (Abb. 3.7). Zur Bestimmung der unspezifischen Bindungseigenschaften des verwendeten Serums wurden untransfizierte 293T-Zellen ebenfalls mit dem Schweinsaffen-Serum inkubiert. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper aus dem Schweinsaffen-Serum wurde ein anti-human IgG-PE-konjugierter Zweitantikörper benutzt, welcher mit den Immunglobulinen aus dem Schweinsaffen-Serum kreuzreagieren kann.

Die Peakverschiebung zwischen der grauen Kurve der untransfizierten 293T-Zellen ohne Schweinsaffen-Serum und der grünen Kurve der untransfizierten 293T-Zellen nach Inkubation mit dem Schweinsaffen-Serum zeigt ein beträchtliches Ausmaß unspezifischer Bindung des Serums an humane Zellen. Die weitere Verschiebung der blauen Kurve (293T SIVagm-wt Env-positiv, mit Schweinsaffen-Serum) gegenüber der grünen Kurve (untransfizierte 293T mit Schweinsaffen-Serum) belegt jedoch, daß

SIVagm-wt Env in SIVagm-wt Env transfizierten 293T-Zellen von diesem Serum nachgewiesen werden kann.

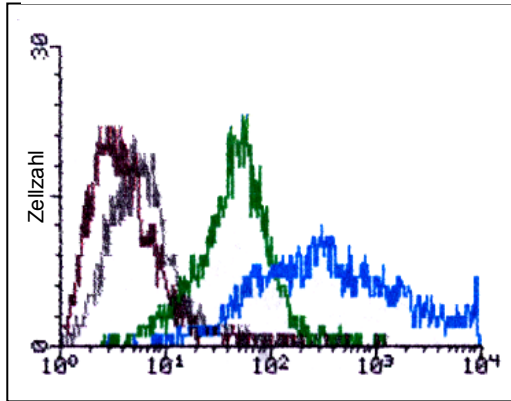


Abb. 3.7 Eignung des Schweinsaffen-Serums zum Nachweis von SIVagm Env.

Durchflußzytometrische Analyse von mit SIVagm-wt Env transfizierten und untransfizierten 293T-Zellen. X-Achse: relative Fluoreszenz-Intensität in logarithmischen Einheiten; Y-Achse: Anzahl gezählter Zellen.

Grau: 293T, anti-hu IgG-PE

Grün: 293T, Schweinsaffen-Serum und anti-hu IgG-PE

Braun: 293T SIVagm-wt Env-transfiziert, anti-hu IgG-PE

Blau: 293T SIVagm-wt Env-transfiziert, Schweinsaffen-Serum und anti-hu IgG-PE

Die durchflußzytometrische Analyse ergab also, daß trotz der unspezifischen Bindungseigenschaften des Serums der Nachweis SIVagm Env-positiver Zellen mittels des vorliegenden Schweinsaffen-Serum möglich ist. Somit konnte eine Sortierung der Hüllprotein-positiven Zellen aus den Verpackungszellkulturen durchgeführt werden.

Die Zellen wurden mittels magnetischer Sortierung (MACS) separiert. Die Verpackungszelllinien wt.6 und X4.3 wurden dazu mit dem Schweinsaffen-Serum inkubiert. Als Zweitantikörper wurde an Beads gekoppeltes anti-humanes IgG verwendet. Anschließend wurden die Zellen über MACS-Säulen im Magnetfeld separiert. Die nach der Sortierung erhaltenen Zellen wurden erneut kultiviert, expandiert und nach einer Woche nochmals sortiert. Eine Woche nach der 2. Sortierung wurden die Ausgangsklone und die 2x sortierten Zellen durchflußzytometrisch auf ihre Env-Expression analysiert. In Abb. 3.8 ist die Analyse der X4.3-Zellen gezeigt. Als Negativkontrolle wurden TELCeB6-Zellen mitgeführt.

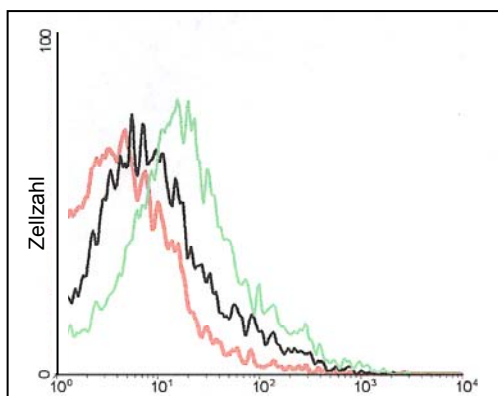


Abb. 3.8 Expression von SIVagm-wt Env auf Zellen der Verpackungszellkultur X4.3 nach zweimaliger Sortierung.

Durchflußzytometrische Analyse von X4.3-Zellen und Kontroll-Zellen auf die Expression von SIVagm-X4 Env. Alle Ansätze wurden mit Schweinsaffen-Serum und anti-hu IgG-PE Zweitantikörper inkubiert. X-Achse: relative Fluoreszenz-Intensität in logarithmischen Einheiten angegeben; Y-Achse: Anzahl gezählter Zellen.

Rot: TELCeB6 (SIVagm Env-negativ)

Schwarz: X4.3 (SIVagm-X4 Env-positiv)

Grün: X4.3 MACS (Kultur zweimal auf SIVagm-X4 Env durch MACS angereichert)

Das Ergebnis der *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung (Abb. 3.6) wurde bestätigt: Nur wenige Zellen der unsortierten Verpackungszellkultur exprimieren Env. Die schwarze Kurve ist gegenüber der der SIVagm Env-negativen Zellen (rote Kurve) nur leicht verschoben. Bei den zweimal sortierten Zellen (grüne Kurve) konnte im Vergleich zu den unsortierten X4.3-Zellen (schwarze Kurve) eine weitere leichte Verschiebung des Peaks nach rechts festgestellt werden. Dies deutet auf eine Anreicherung SIVagm-X4 Env-positiver Zellen hin.

Die Bestimmung des Titers der sortierten Verpackungszellkulturen wurde erneut durch Transduktion der entsprechenden GHOST-Linien durchgeführt (Tab. 3.4).

Pseudotyp-vektor	GHOST-Linie	Verpackungszellklon	Vektortiter vor MACS [i.E./ml]	Vektortiter nach MACS [i.E./ml]
[MLV(SIVagm-wt)]	/CCR5	wt.6	$2,0 \times 10^4$	$7,6 \times 10^5$
[MLV(SIVagm-X4)]	/CXCR4	X4.3	$5,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^3$

Tab. 3.4 Steigerung der Vektortiter durch zweimalige magnetische Sortierung der Verpackungszellkulturen.

Es ist der Mittelwert aus drei bis fünf Vektorernten und Titrationen gezeigt.

Beide Verpackungszellklone zeigten nach Anreicherung Hüllprotein-positiver Zellen eine deutliche Titersteigerung.

Beide Verpackungszelllinien wurden noch zwei weitere Mal sortiert. Es konnte jedoch keine weitere Anreicherung SIVagm Env-positiver Zellen und keine weitere Titersteigerung erzielt werden. Die FACS-Analysen wurden durch *In-situ*-Immun-Peroxidase Färbungen bestätigt (nicht gezeigt).

3.1.7 Expression von HIV-1 Env auf den stabilen Verpackungszellen

Analog zu den [MLV(SIVagm)]-Verpackungszellen wurden die [MLV(HIV-1)]-Verpackungszellen auf die Expression von HIV-1 Env durchflußzytometrisch untersucht. Vor der Analyse wurde das Serum eines HIV-1 infizierten Spenders (Nr. 456) auf seine Fähigkeit getestet HIV-1 Env exprimierende 293T-Zellen zu markieren und der Anteil unspezifischer Bindung an HIV-1 Env-negative Zellen bestimmt. Das humane Serum erwies sich als geeignet (Daten nicht gezeigt) und wurde zur Analyse der Verpackungszellkulturen eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurden Hüllprotein-negative TELCeB6-Zellen mit dem Serum inkubiert. Abb. 3.9 zeigt die Env-Expression

der [MLV(HIV-1)]-Verpackungszellklone im Vergleich zu den MACS-sortierten [MLV(SIVagm)]-Verpackungszellklonen.

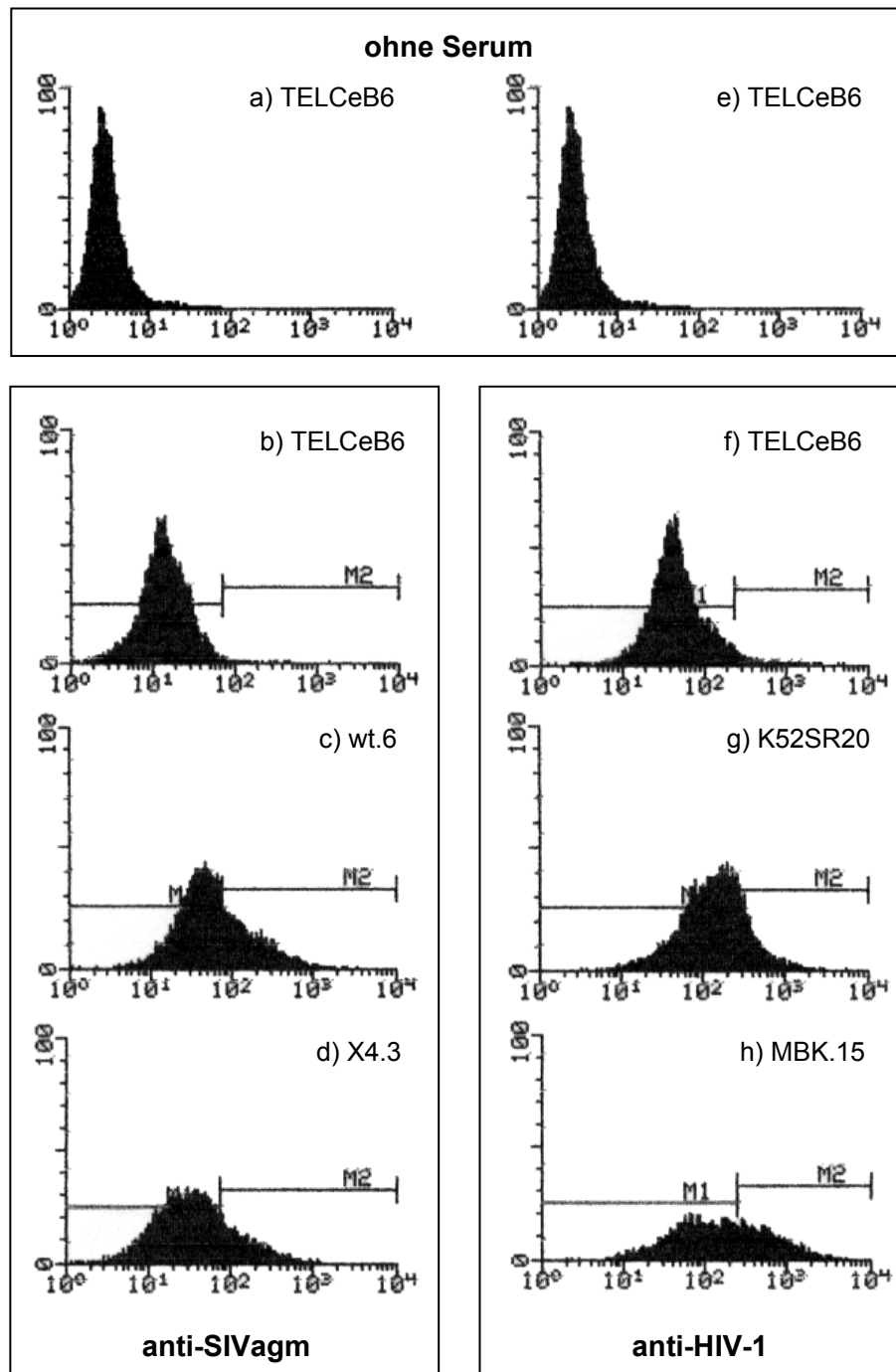


Abb. 3.9 Expression von SIVagm bzw. HIV-1 Env in den jeweiligen Verpackungszellklonen.

Durchflußzytometrische Analyse. X-Achse: relative Fluoreszenz-Intensität in logarithmischen Einheiten; Y-Achse: Anzahl gezählter Zellen. Die Ansätze wurden wie angegeben ohne Serum, mit anti-SIVagm Serum oder mit anti-HIV-1 Serum versetzt. Alle Ansätze wurden mit anti-hu IgG-PE inkubiert. Zur Verdeutlichung der Verschiebung der Kurven wurde in den Kontrollen b) und f) rechts neben den abfallenden Peakschenkel eine Markierung gesetzt (Bereich M2) und in die nachfolgenden Graphen kopiert.

Der Vergleich der Peakverschiebung zwischen ungefärbten TELCeB6 (Abb. 3.9 a) und mit Schweinsaffen-Serum gefärbten TELCeB6 (Abb. 3.9 b) bzw. zwischen ungefärbten TELCeB6 (Abb. 3.9 e) und mit humanem Serum gefärbten TELCeB6 (Abb. 3.9 f) zeigt die unspezifische Bindung der verwendeten Seren an die Hüllprotein-negativen TELCeB6-Zellen. Die Verschiebung der Peakmaxima der SIVagm Env-positiven Klone (Abb. 3.9 c und d) bzw. der HIV-1 Env-positiven Klone (Abb. 3.9 g und h) gegenüber der mit dem entsprechenden Serum gefärbten Kontrolle (Abb. 3.9 b bzw. f) zeigt dagegen die spezifische Markierung des entsprechenden Hüllproteins.

Auch in den [MLV(HIV-1)]-Verpackungszellkulturen ist nur eine geringe Verschiebung des Peaks für die HIV-1 Env-Expression zu detektieren. Da diese Vektoren nur als Kontrollen dienten und ihre Titer bereits in einem zu den [MLV(SIVagm)]-Vektoren vergleichbaren Bereich lagen, wurde auf eine MACS-Anreicherung verzichtet.

3.1.8 Konzentrierung von Vektorpartikeln

Um eine weitere Erhöhung der [MLV(SIVagm)]-Vektortiter zu erreichen, wurden die Überstände mit Ultrafiltration (UF) oder Ultrazentrifugation (UZ) konzentriert und der durch den Konzentrationsvorgang verbundene Verlust an Infektiosität bestimmt.

Zuerst wurden in zwei getrennten Versuchen jeweils 8 ml [MLV(SIVagm-wt)]-vektorhaltiger Überstand durch Ultrafiltration auf das minimale Endvolumen von 1 ml eingengt. Es wurden Centriprap30 (Centriprep, Amicon)-Säulen mit einer Porengröße für Proteinkomplexe kleiner als 30 kD, eingesetzt. Ausgangs- und Endtiter wurden durch Transduktion von GHOST/CCR5-Zellen und anschließendem X-Gal-Test bestimmt (Tab. 3.5).

Titer vor UF [i.E./ml]	Titer nach UF [i.E./ml]	Volumen- reduktion	Titer- anstieg	Wiedergewinnung [%]
$2,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	8-fach	3,5-fach	43,8
$7,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	8-fach	2,0-fach	25,0

Tab. 3.5 Konzentrierung von [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren durch Ultrafiltration (UF).

Der Vektortiter war durch die Ultrafiltration um Faktor 3,5 bzw. 2,1 erhöht worden. Die Verrechnung der Titersteigerung mit der Volumenreduktion ergab eine Wiedergewinnungsrate von 38%. Sie gibt den Anteil der funktionell wiedergefundenen Vektorpartikel an. Auffallend war, daß die Zellen, die länger als die zur Transduktion angesetzte Zeit von 4 Stunden den über Ultrafiltration angereicherten Überständen ausgesetzt waren, leichte Zellschädigungen aufwiesen und allgemein schlechter proliferierten. Ursache sind wahrscheinlich Mediumbestandteile und von den Verpackungszellen sezernierte Stoffe, die mit den Vektoren angereichert wurden.

Danach wurde in vier getrennten Ansätzen die Möglichkeit zur Konzentrierung von [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren durch Ultrazentrifugation untersucht. Die Ansatzgröße und der Ausgangstiter wurden willkürlich gewählt. Die Pelletierung der Vektoren durch ein 20%iges Zuckerkissen sollte die Anreicherung von Mediumbestandteilen in den Vektorstocks reduzieren. Der Vektortiter wurde vor und nach der Ultrazentrifugation durch Transduktion von GHOST/CCR5 und X-Gal-Test bestimmt (Tab. 3.6).

Titer vor UZ [i.E./ml]	Titer nach UZ [i.E./ml]	Volumen- reduktion	Titer- anstieg	Wiedergewinnung [%]
2,0x10 ³	5,5x10 ⁴	53-fach	25,5-fach	48,1
3,0x10 ³	8,0x10 ⁴	82-fach	26,6-fach	32,4
7,5x10 ³	2,2x10 ⁵	50-fach	29,3-fach	58,6
3,4x10 ⁴	1,0x10 ⁶	80-fach	29,4-fach	36,8

Tab. 3.6 Konzentrierung von [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren durch Ultrazentrifugation (UZ).

Aus der Verrechnung von Ausgangs- und Endtiter (Titeranstieg) und dem Anfangs- und Endvolumen (Volumenreduktion) ergab sich die Wiedergewinnungsrate für den einzelnen Konzentrationsansatz. Sie lag im Mittel bei 43%.

Am Beispiel eines bereits hochtitrigen Überstandes von 7,5x10⁵ i.E./ml konnte zudem gezeigt werden, daß es möglich ist, durch Ultrazentrifugation [MLV(SIVagm-wt)]-Vektorstocks mit einem Titer von 1x10⁸ i.E./ml herzustellen (Daten nicht gezeigt).

Bei der Konzentrierung von Vektorüberständen mittels Ultrazentrifugation konnten im Vergleich zur Ultrafiltration größere Mengen an Überstand in ein nahezu beliebig kleines Volumen reduziert werden. Da die Wiedergewinnungsrate ähnlich war und bei

den transduzierten Zellen keine Zellschädigungen auftraten, wurde im weiteren die Ultrazentrifugation zur Herstellung konzentrierter Stocks angewendet.

3.1.9 Transduktion von adhärennten Zellen mit hoher MOI

Durch die Möglichkeit der Konzentrierung der Pseudotypvektoren konnte die Transduktion von GHOST-Zellen mit einer "*multiplicity of infection*" (MOI) von 5 durchgeführt werden (Abb. 3.10). Es sollte eine maximale Transduktionseffizienz der Zielzellen erreicht werden.

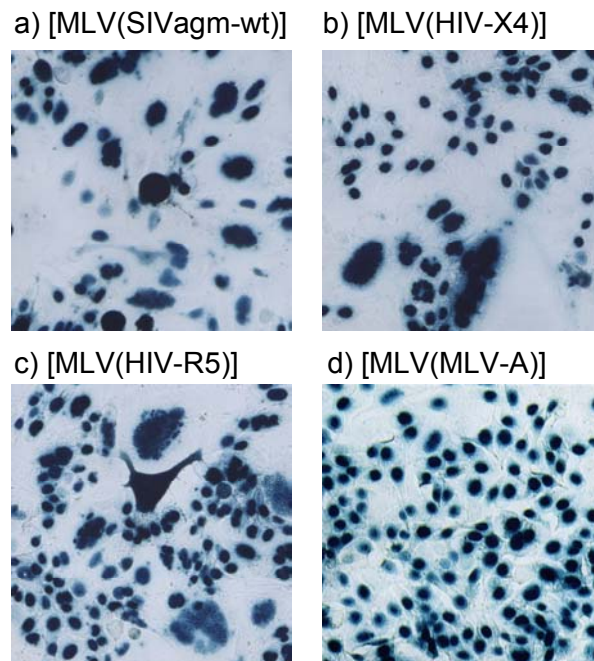


Abb. 3.10 GHOST-Zellen nach Transduktion mit Pseudotypvektoren (MOI =5).

Nachweis der β -Galaktosidase im X-Gal-Test zwei Tage nach Transduktion mit den angegebenen Pseudotypvektoren. Syncytienbildung bei a), b) und c). Zielzellen: a) GHOST/CCR5; b) GHOST/CXCR4; c) GHOST/CCR5; d) GHOST/parental

Tatsächlich wurden fast alle Zielzellen transduziert. Jedoch führte die Transduktion der GHOST/CCR5-Zellen durch [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(HIV-R5)]-Vektoren zu starker Syncytienbildung zwischen den Transduktanden. In den Syncytien erkennt man mehrere blau gefärbte Zellkerne umgeben von einem breiten Plasmasaum. Das gleiche Phänomen wurde bei GHOST/CXCR4-Zellen nach der Transduktion durch die [MLV(HIV-X4)]-Vektoren beobachtet. Zur Transduktion von GHOST/CXCR4-Zellen mit [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren standen keine entsprechend hochtitrigen Überstände zur

Verfügung. Die Verwendung von [MLV(MLV-A)]-Vektoren mit einer MOI von 5 führte dagegen nicht zur Synzytienbildung.

Bei der Transduktion von Suspensionszellen, wie der humanen T-Zelllinie Molt4/8 oder A3.01/CCR5 wurde bei der Verwendung der gleichen MOI bei keinem der eingesetzten Vektoren eine Synzytienbildung zwischen den Suspensionszellen beobachtet (nicht gezeigt). Offensichtlich können die Vektoren mit hoher MOI für die Transduktion von Suspensionszellen eingesetzt werden, sind jedoch nur beschränkt für adhärenzte Zellen geeignet.

3.1.10 Inkorporation der SIVagm-Hüllproteinvarianten in Vektor-Partikel

Zum Nachweis der Inkorporation der SIVagm-Hüllproteinvarianten in MLV-Vektorpartikel wurden 20 ml vektorhaltigen Überstandes der Verpackungszell-kulturen wt.6 und X4.3 steril filtriert und mittels Ultrazentrifugation pelletiert. Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-Page wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und dieser Western Blot mit dem bereits zur durchflußzytometrischen Analyse eingesetzten Schweinsaffen-Serum gefärbt (Abb. 3.11 A). Als Negativkontrollen wurden die Überstände von TE671-Zellen, der nicht transgenen Ausgangszelllinie, und der davon abgeleiteten TELCeB6-Zellen, die Hüllprotein-negative MLV-Partikel in den Überstand entlässt, mitgeführt. Das p30Gag-Protein der MLV-Kapside wurde mit einem polyklonalem p30MLVGag Serum auf dem selben Blot nachgewiesen (Abb. 3.11 B).

In den [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-vektorhaltigen Überständen konnte jeweils eine spezifische Bande für gp140-SU und eine ca. 29 kD große Bande nachgewiesen werden. 29 kD entspricht dem erwarteten Molekulargewicht des C-terminal um 135 Aminosäuren trunkierten gp45-TM (gp29-TM Δ 10) von SIVagm Env. Der Blot bestätigt den Einbau der SIVagm-Hüllproteine in die MLV-Vektorkapside. Bei den weiteren Banden handelt es sich um unspezifische Reaktionen, da sie in allen Spuren vorkommen.

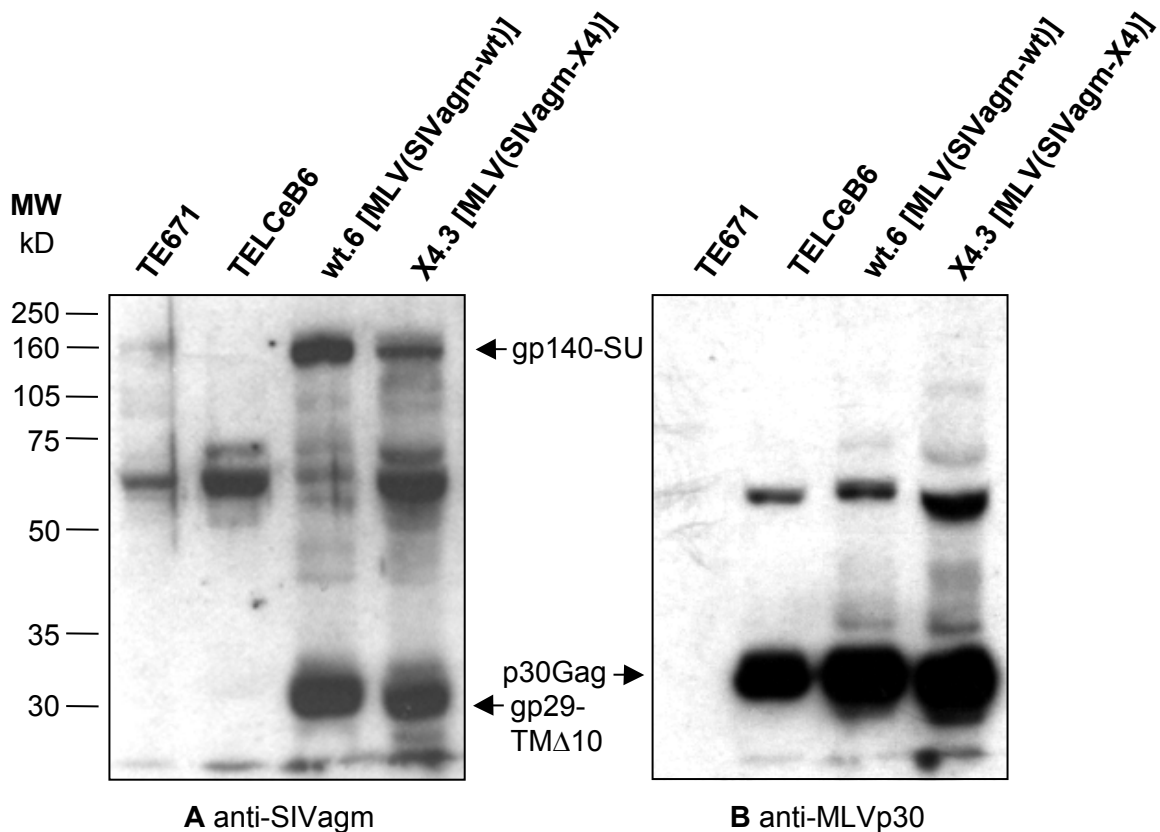


Abb. 3.11 Inkorporation der SIVagm Env Varianten in MLV-Vektor-Partikel. Western Blot von pelletierten Überständen der Verpackungszellklone.

Der Nachweis von MLVp30Gag (30 kD) im Überstand von [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren bestätigt die Bildung von MLV-Partikeln. MLVp30Gag wurde auch im Überstand von TELCeB6-Zellen nachgewiesen, da diese Hüllprotein-negative MLV-Partikel ins Medium entlassen.

3.1.11 Korezeptornutzung von [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren

Zur Bestimmung des Tropismus der Pseudotypvektoren wurden die vektorhaltigen Überstände mit einer MOI von 1 zur Transduktion des kompletten GHOST-Indikatorzellpanels verwendet. Die eingesetzten Vektorstocks waren auf den jeweils geeigneten GHOST-Linien titriert worden. In Abb. 3.12 sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Transduktionstiter auf den Zellen des hauptsächlich als Rezeptor genutzten Chemokinrezeptors wurde 100% gesetzt.

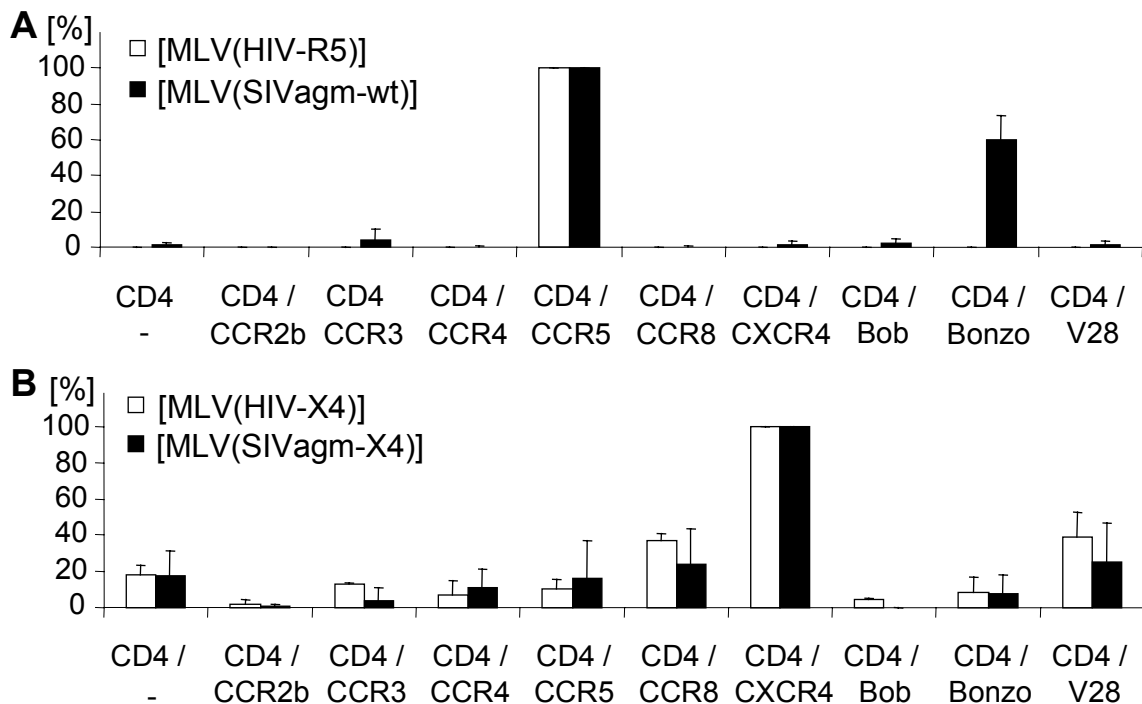


Abb. 3.12 Korezeptornutzung der [MLV(SIVagm)]- und [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren. Titer nach Transduktion der verschiedenen Linien des GHOST-Zellpanel.

A) CCR5-nutzende Vektoren und B) CXCR4-nutzende Vektoren. Der Titer des hauptsächlich genutzten Korezeptors wurde 100% gesetzt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

[MLV(SIVagm-wt)] benutzt neben CCR5 zu 60% den Korezeptor Bonzo für den Zelleintritt (Abb. 3.12 A). Die geringe "Hintergrundtransduktion" des kompletten Pannels durch [MLV(SIVagm-wt)] ist auf die von Edinger *et al.* (1998) beschriebene endogene Expression von Bonzo in der Ausgangslinie zurückzuführen. Der [MLV(HIV-R5)]-Vektor ist strikt CCR5-gängig, auf den anderen Korezeptorlinien war keine Transduktion nachzuweisen.

[MLV(SIVagm-X4)]- und [MLV(HIV-X4)]-Vektoren zeigten eine deutliche Präferenz in der Benutzung von CXCR4 (Abb. 3.12 B). Beide Vektoren zeigten jedoch auf dem gesamten Panel ein sich gleichendes Muster an "Hintergrundtransduktion". Dieses ist durch die von Edinger *et al.* (1998) beschriebene endogene Expression von CXCR4 in der Ausgangslinie zu erklären.

Der Tropismuswechsel der transient hergestellten Vektoren (Tab. 3.2) wurde von den Vektoren der stabilen Linien nochmals bestätigt. Der neu etablierte [MLV(SIVagm-X4)]-Vektor transduziert die gleichen GHOST-Zelltypen wie der mit dem trunkierten HIV-1_{BH10} Env pseudotypisierte MLV-Vektor [MLV(HIV-X4)]. Der V3-Loop des CXCR4-

nutzenden HIV-1_{BH10} bewirkt nach Insertion in SIVagm die Nutzung von CXCR4. Da ausschließlich der Austausch des V3-Loops diesen Tropismuswechsel von SIVagm-wt Env bewirkt hat, ist somit der V3-Loop von SIVagm für die Wahl des benutzten Korezeptors verantwortlich oder zumindest daran beteiligt.

3.1.12 Neutralisierung der Vektoren durch Seren HIV-1-infizierter Spender

Es sollte geprüft werden, ob die [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren, die einen Teil der HIV-1 Sequenz (V3-Loop) tragen, ebenso wie [MLV(SIVagm-wt)] der Neutralisierung durch Seren HIV-1 infizierter Spender entgehen können. Dazu wurden 5×10^3 Partikel der Pseudotypvektoren mit dekomplementierten Seren vier verschiedener HIV-1 infizierter und vier nicht infizierter Spender inkubiert und anschließend zur Transduktion der jeweils geeigneten GHOST-Linie eingesetzt.

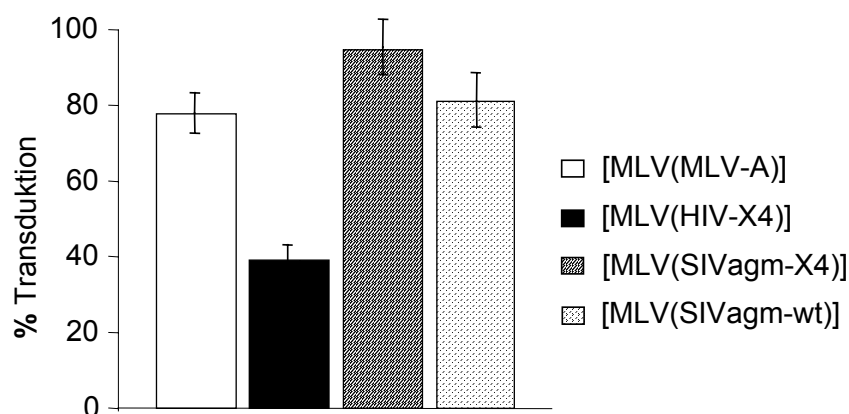


Abb. 3.13 Neutralisierung der Vektoren durch Seren HIV-1 infizierter Spender. Transduktionseffizienz nach Inkubation mit Seren infizierter und uninfizierter Spender.

Die Transduktionseffizienz nach Inkubation mit Seren uninfizierter Spender wurde 100% gesetzt. Für jeden Vektor ist der Anteil transduzierter Zellen nach Inkubation mit Seren HIV-positiver Spender relativ zur Effizienz nach Inkubation mit Seren uninfizierter Spender angegeben. Die angegebenen Werte sind das Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen mit den Seren von vier infizierten bzw. vier uninfizierten Spendern.

In Abb. 3.13 ist der Mittelwert der verbleibenden Transduktionseffizienz nach Neutralisierung durch vier verschiedene HIV-1-positive Spenderseren aus drei unabhängigen Experimenten relativ zur Effizienz nach Inkubation mit Seren uninfizierter Spender angegeben. Setzt man den Mittelwert der Transduktion in Gegenwart der uninfizierten Seren als 100%, so ergibt sich für die [MLV(HIV-X4)]-Vektoren in Gegenwart von Seren HIV-1 infizierter Spender eine Reduzierung des Titters um 60%. Der Titer der [MLV(MLV-A)]-Partikel wurde um 22% reduziert. Die

[MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren zeigten eine Reduktion innerhalb des gleichen Bereiches. Sie erlitten eine Titerreduktion um 19% bzw. 6%.

Das Ergebnis zeigte, daß die [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren von den vorhandenen HIV-1-spezifischen Antikörpern in den Seren HIV-1-positiver Patienten nicht neutralisiert werden konnten.

3.1.13 Transduktion von primären peripheren Blutlymphozyten (PBL)

3.1.13.1 Expression von CD4 und der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 auf humanen Spenderlymphozyten

Zur Feststellung des Anteils an potentiellen Zielzellen in primären peripheren Blutlymphozyten (PBL) für die verschiedenen Pseudotypvektoren wurde die Verteilung der Korezeptoren CXCR4 und CCR5 auf den CD4-positiven Zellen im Vollblut bestimmt. Dazu wurde das Citratblut von drei Spendern mit monoklonalen Antikörpern auf CD4 und die Chemokinrezeptoren gefärbt (Tab. 3.7).

Donor	Oberflächenmarker [in %]			
	in Gesamt-PBMC		in CD4-positiven Zellen	
	CD4/CXCR4	CD4/CCR5	CXCR4	CCR5
I	32,8	5,8	78,4	11,5
II	25,0	3,1	64,8	9,2
III	47,1	1,7	89,9	3,2

Tab. 3.7 Expression des Oberflächenmarkers CD4 und der Chemokinrezeptoren.

Analyse der Expression von CD4 und der Korezeptoren CXCR4 und CCR5 im Vollblut dreier Spender.

Der Prozentsatz CXCR4-positiver CD4-Zellen der Spender lag zwischen 64,8 und 89,9%. Sie stellen die Zielpopulation für die neu entwickelten [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren dar. Der Prozentsatz CCR5-positiver CD4-Zellen ist wesentlich geringer und betrug zwischen 3,2 und 11,5%. Sie können von den [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren transduziert werden. Für den Nachweis des Korezeptors Bonzo stand kein Antikörper zur Verfügung. Da jedoch von Unutmaz *et al.* (2000) gezeigt wurde, daß das Expressionsprofil von Bonzo auf PBMCs mit dem von CCR5 fast identisch ist, wird nur

mit einer leichten Veränderung der Anzahl an potentiellen Zielzellen für die [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren gerechnet.

Aus dem Citratblut der drei Spender wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durch Ficollgradientenzentrifugation aufgereinigt und mit den immobilisierten monoklonalen Antikörpern anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert. Unter diesen Stimulationsbedingungen sterben Monozyten und Makrophagen ab, so daß man eine zu mindestens 95% reine Lymphozytenpopulation erhält, was durch durchflußzytometrische Analyse auf den T-Zell-Marker CD3 bestätigt wurde (nicht gezeigt). Durchflußzytometrische Analysen der PBL am Tag der Transduktion zeigten, daß nach dreitägiger Stimulation der Anteil CD4 und Korezeptor-positiver Zellen im Vergleich zur Färbung der unstimulierten Zellen im Vollblut leicht anstieg (Daten nicht gezeigt).

3.1.13.2 Generierung von *egfp*-transferierenden Pseudotypvektoren zur Transduktion von primären humanen PBL

Um die CD4-spezifische Transduktion von primären Lymphozyten durch die [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren auf einfachem Weg im FACS analysieren zu können, wurden statt der vorhandenen *lacZ*-Gen transferierenden Pseudotypvektoren das *egfp*-Gen ("*enhanced green fluorescent protein*") transferierende Vektoren eingesetzt. Diese haben den Vorteil, daß transduzierte Zellen durchflußzytometrisch parallel auf die Expression von CD4 und die Transgenexpression (EGFP) auf Einzelzellniveau analysiert werden können. Zugunsten der Routineauswertung mittels Durchflußzytometrie wurden die niedrigen Titer der transient hergestellten *egfp*-transferierenden Vektoren gegenüber den *lacZ*-transferierenden Vektoren aus den Überständen der stabilen Verpackungszellen in Kauf genommen.

Die Vektoren wurden durch transiente Transfektion von 293T-Zellen hergestellt. Transfiziert wurden ein Konstrukt für die MLV-Strukturproteine Gag und Pol (pHIT60), der für *egfp*-kodierende MLV-Transfervektor MgEGFP- Δ LNGFR und das jeweilige Env-Konstrukt. Um Titerverluste zu umgehen wurden die Vektoren ohne zwischenzeitliche Lagerung zwei Tage nach Transfektion direkt zur Transduktion der PBLs eingesetzt. Es wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit frischem Überstand aus drei unabhängigen Transfektionen transduziert. Der Titer der hergestellten Vektoren wurde an jedem Transduktionstag parallel zur PBL-

Transduktion auf Molt4/8-Zellen bestimmt. Die Auswertung erfolgte durchflußzytometrisch auf EGFP-Fluoreszenz.

Es konnten keine Titer für die CCR5-nutzenden [MLV(HIV-R5)]-Vektoren und nur geringe Titer ($\sim 5 \times 10^3$ i.E./ml) für die CCR5/Bonzo-nutzenden [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren festgestellt werden. Zumindest für die [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren müssen jedoch bedeutend mehr Partikel enthalten gewesen sein, da mit diesen Überständen PBL effizient transduziert werden konnten (Tab. 3.9). Die verwendeten Molt4/8-Zellen stellten sich damit nachträglich als Referenzlinie zur Titerbestimmung von CCR5-tropen Vektoren als nicht geeignet heraus. Offensichtlich war ihre CCR5-Expression zu gering. In Tab. 3.8 sind deshalb nur die Titer der CXCR4-tropen Vektoren gezeigt. Es sind die Titer der drei separat generierten Überstände und die in den drei Transduktionen mit je 1 ml Überstand insgesamt eingesetzte Partikelzahl angegeben.

Titer der Pseudotypvektoren [i.E./ml]			
Tag der Transduktion	[MLV(SIVagm-X4)]	[MLV(HIV-X4)]	[MLV(MLV-A)]
1	$2,7 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$
2	$1,5 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$
3	$8,8 \times 10^3$	$7,7 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$
Insgesamt eingesetzte Vektorpartikelzahl	$5,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$

Tab. 3.8 Titer der transient generierten *egfp*-übertragenden Pseudotypvektoren auf der humanen T-Zelllinie Molt4/8.

3.1.13.3 Die Transduktion von primären humanen PBL ist CD4-abhängig

Durch Ficollgradientenzentrifugation aufgereinigte und mit immobilisierten anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimulierte PBL der drei Donoren wurden mit den transient erzeugten Überständen transduziert. Die Transduktionen wurden auf Retronektin beschichteten Platten, unter Zentrifugation und in Anwesenheit von 10% autologem Plasma durchgeführt. Es wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem frischem Überstand aus drei unabhängigen Transfektionen transduziert. Drei Tage nach der letzten Transduktion wurden die Zellen durchflußzytometrisch auf die Expression des Transgens EGFP, des Oberflächenmarkers CD4 und der Korezeptoren untersucht. Die

Art und Weise der durchflußzytometrischen Auswertung wird in Abb. 3.14 erklärt. Abb. 3.15 zeigt beispielhaft die durchflußzytometrische Darstellung der CD4-Abhängigkeit der Vektoren bei der Transduktion von PBLs von Donor I. Tab. 3.9 sind die Transduktionsergebnisse für CD4-positive und CD4-negative Zellen aller Donoren zu entnehmen.

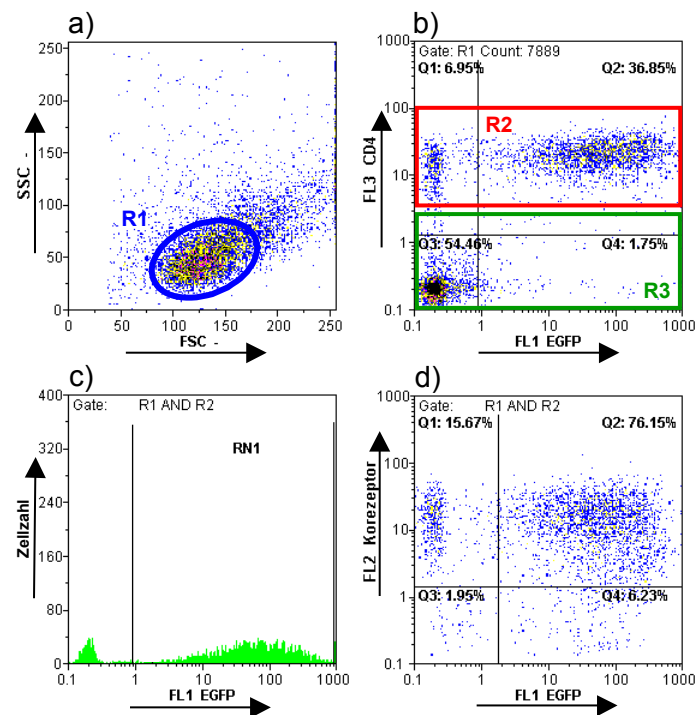


Abb. 3.14 Auswertung der durchflußzytometrischen Analyse transduzierter PBL.

Beispielhaft ist hier die Analyse der PBL von Donor I nach Transduktion mit [MLV(HIV-X4)]-Vektoren gezeigt:

a) Dot-Plot: Es ist die relative Größe der Zellen (FSC, X-Achse) gegen ihre relative Granularität (SSC, Y-Achse) aufgetragen. Die Lymphozytenpopulation wurde eingegrenzt (Gate: R1 - blau).

b) Dot-Plot: Innerhalb der Lymphozytenpopulation (Gate: R1) wird die Expression des Transgens EGFP (X-Achse) gegen die Expression von CD4 (Y-Achse) analysiert. Es ergibt sich der Prozentsatz transduzierter Zellen in Gesamt-PBL (Summe der Quadranten Q2 + Q4). Es werden die CD4-positiven (Gate: R2 - rot) und die CD4-negativen Lymphozyten (Gate: R3 - grün) eingegrenzt.

c) Histogramm: Innerhalb der Lymphozyten (Gate: R1) wird die CD4-positive (Gate: R2) oder die CD4-negative Population (Gate: R3) auf die Expression des Transgens EGFP (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) analysiert. Hier dargestellt ist die CD4-positive Population (R2). Die EGFP-positiven Zellen befinden sich rechts vom Grenzstrich (in RN1).

d) Dot-Plot: Innerhalb der Lymphozyten (Gate: R1) wird die CD4-positive Population (Gate: R2) auf die Expression des Transgens EGFP (X-Achse) in Abhängigkeit von der Expression des Korezeptors, hier CXCR4 (Y-Achse) analysiert.

In den Ansätzen der Pseudotypvektoren mit lentiviralen Hüllproteinen (Abb. 3.15 a bis d) befanden sich die EGFP-positiven Zellen fast ausschließlich im oberen rechten Quadranten (Q2). Die Vektoren sind somit in der Lage, innerhalb der Gesamt-PBMC nur die CD4-positiven Zellen zu transduzieren. Bei der Verwendung von [MLV(MLV-A)]-Vektoren (Abb. 3.15 e) waren sowohl im oberen rechten Quadranten (Q2) als

auch im unteren rechten Quadranten (Q4) EGFP-positive Zellen nachzuweisen. Es wurden sowohl CD4-positive als auch CD4-negative Lymphozyten transduziert.

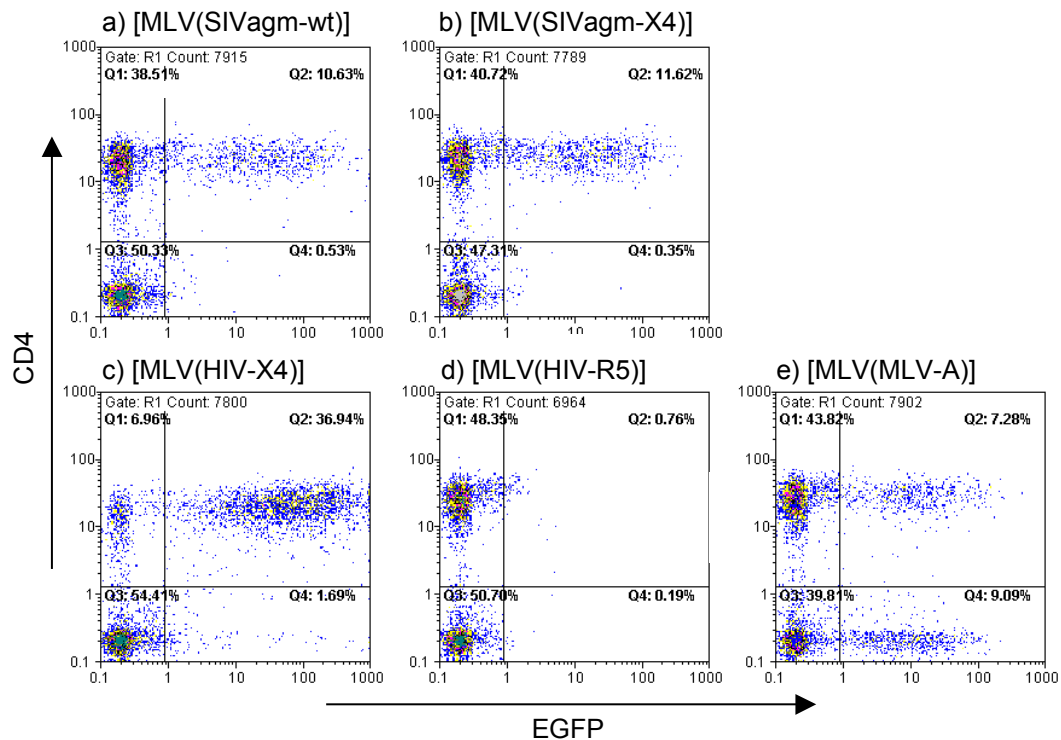


Abb. 3.15 CD4-spezifische Transduktion der PBLs von Donor I.

FACS-Analyse der transduzierten PBL von Donor I. Es ist die Expression des Transgens EGFP (X-Achse) gegen die Expression von CD4 (Y-Achse) innerhalb der Lymphozytenpopulation (Gate: R1) aufgetragen (Auswertung nach Abb. 3.14 b). Die Summe aus Q2 + Q4 gibt den prozentualen Anteil transduzierter Zellen in Gesamt-PBL an.

Pseudotypvektoren											
	[MLV(SIVagm-wt)]		[MLV(SIVagm-X4)]		[MLV(HIV-X4)]		[MLV(HIV-R5)]		[MLV(MLV-A)]		
MOI	*		1		2,8		*		3,2		
EGFP-positive Zellen in %											
Donor	CD4 ⁺	CD4 ⁻	CD4 ⁺	CD4 ⁻	CD4 ⁺	CD4 ⁻	CD4 ⁺	CD4 ⁻	CD4 ⁺	CD4 ⁻	
I	21,7	1,3	22,2	0,7	84,4	3,1	1,6	0,5	14,2	18,4	
II	16,7	0,1	8,3	0,1	84,4	2,9	0,3	0,1	25,7	25,7	
III	32,4	0,2	14,6	0,3	81,8	1,0	0,7	0,2	17,3	21,8	

Tab. 3.9 Abhängigkeit der Transduktion der verschiedenen Pseudotypvektoren von der CD4-Expression auf humanen PBL.

* Der Titer (und die sich ergebende MOI) konnte nicht zuverlässig bestimmt werden.

In Tab. 3.9 ist der durch die FACS-Analyse (Auswertung nach 3.14 c) ermittelte Prozentsatz EGFP-positiver Zellen innerhalb der CD4-positiven bzw. der CD4-negativen PBLs der drei Donoren angegeben. Alle Pseudotypvektoren mit lentiviralen Hüllproteinen transduzierten in Gesamt-PBL selektiv die CD4-positive Population,

während die [MLV(MLV-A)]-Vektoren sowohl CD4-positive, als auch CD4-negative PBL ähnlich effizient transduzierten. Die Transduktionseffizienz war donorspezifisch unterschiedlich. Die höchste Transduktionrate erreichten die [MLV(HIV-X4)]-Vektoren, sie transduzierten im Mittel 83,5% der CD4-positiven Zellen. Es folgen die [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren, die im Mittel 23,6% der CD4-positiven Zellen transduzierten.

Da immer frisch generierte transiente Vektorüberstände eingesetzt wurden, waren die Titer zum Zeitpunkt der Transduktion noch unbekannt. Es konnten deshalb keine identischen MOIs eingesetzt werden. Die tatsächlich zur Transduktion eingesetzte Partikelzahl ergab sich erst nachträglich nach der Auswertung der parallel durchgeführten Titration der Überstände auf Molt4/8-Zellen. Um die Effizienz der Vektoren dennoch vergleichen zu können, wurde angenommen, die Transduktionseffizienz würde sich linear zur insgesamt eingesetzten Partikelzahl verhalten und es wurde so die theoretische Transduktionseffizienz bei einer theoretischen MOI von 1 berechnet. Da die Titer der CCR5-tropen Vektoren nicht bestimmt werden konnten, kann auch keine Angabe über die insgesamt eingesetzte Partikelzahl gemacht werden kann. In Abb. 3.16 ist deshalb nur der Vergleich der CXCR4-tropen Vektoren gezeigt.

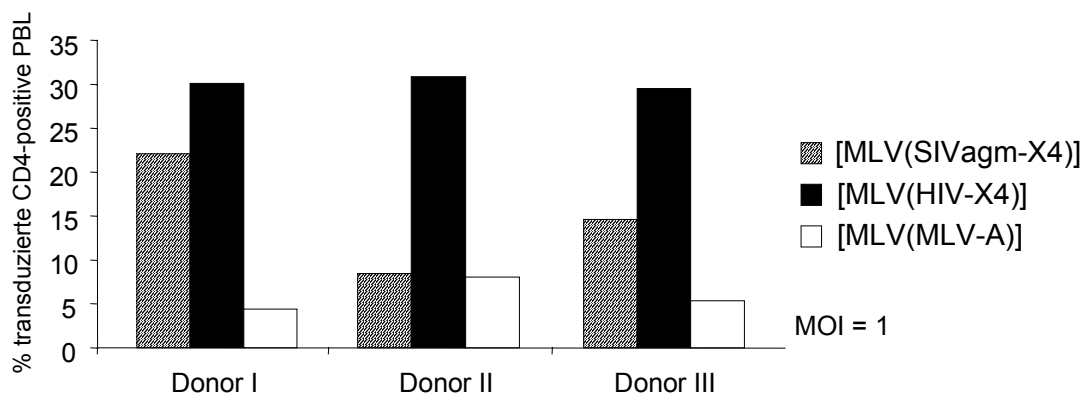


Abb. 3.16 Errechnete Transfektionseffizienz bei einer theoretischen MOI von 1.

Bei einer theoretisch errechneten MOI von 1 erwiesen sich die [MLV(HIV-X4)]-Vektoren (im Mittel 30% transduzierte CD4-positive Zellen) den [MLV(SIV-X4)]-Vektoren bei der Transduktion von CD4-positiven Zellen als überlegen. Die [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren erwiesen sich wiederum in zwei von drei Fällen (22,1 und 14,6 %) den [MLV(MLV-A)]-Vektoren (4,5 und 5,4 %) als überlegen. Im dritten Fall war ihre Effizienz mit den [MLV(MLV-A)]-Vektoren in etwa gleich.

3.1.13.4 Die Korezeptorspezifität bei der Transduktion von PBLs

Um die Korezeptorspezifität der verschiedenen Pseudotypen bei der Transduktion von PBLs zu zeigen, wurden die transduzierten Zellen auf die Expression von EGFP und die Korezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 durchflußzytometrisch analysiert (Auswertung nach Abb. 3.14 d). In Abb. 3.17 sind als Beispiel die FACS-Analysen der CD4-positiven Lymphozyten von Donor II nach Transduktion mit [MLV(HIV-X4)]- und [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren zu sehen.

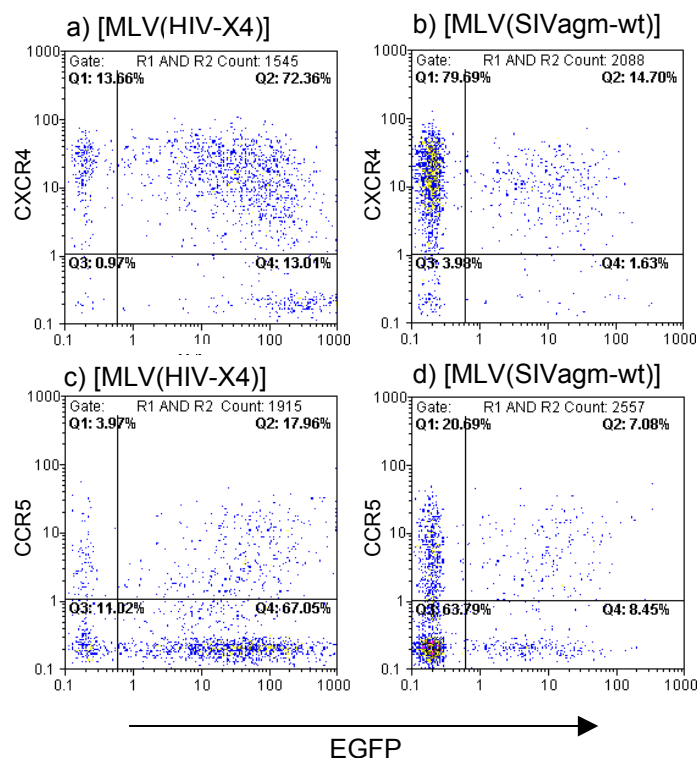


Abb. 3.17 Korezeptorexpressionsmuster der PBL von Donor II drei Tage nach der letzten Transduktion.

FACS-Analyse der mit [MLV(HIV-X4)]- bzw. [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren transduzierten PBL. Es ist die Expression des Transgens EGFP (X-Achse) gegen die Expression von CXCR4 (a und b) bzw. CCR5 (c und d) (Y-Achse) innerhalb der CD4-positiven Zellen (Gate: R2) der Lymphozytenpopulation (Gate: R1) aufgetragen.

Es zeigte sich, daß drei Tage nach der letzten Transduktion mit CXCR4-tropen Vektoren neben den CXCR4-positiven CD4-Zellen sowohl CXCR4-negative, als auch CCR5-positive CD4-Zellen das Markergen exprimierten. Auch nach Transduktion mit dem CCR5-tropen [MLV(SIVagm-wt)]-Vektor sind drei Tage nach Transduktion CXCR4-positive und CCR5-negative CD4-Zellen positiv. [MLV(SIVagm-wt)] könnte neben CCR5 jedoch auch Bonzo zum Zelleintritt genutzt haben. Die fehlende Korrelation zwischen dem Tropismus der Vektoren und der Korezeptorexpression der

transduzierten Zellen ist jedoch am ehesten dadurch zu erklären, daß sich das Expressionsmuster der Korezeptoren in den Tagen zwischen Transduktion und Analyse geändert hat.

Durch die Transduktionen der Pseudotypvektoren auf den verschiedenen GHOST-Linien wurde die korezeptorspezifische Transduktion wiederholt gezeigt. Dies spricht dafür, daß auch die Transduktion der PBL korezeptorspezifisch erfolgt. Sie ist jedoch drei Tage nach der Transduktion aufgrund des geänderten Korezeptorexpressionsmusters nicht mehr darstellbar.

3.2 Konstruktion von MLV/SIVagm und MLV/HIV-1-Hybridviren

3.2.1 Zielsetzung der Konstruktion von Hybridviren aus Onko- und Lentiviren

Prinzipiell besteht in einer Verpackungszelle das Risiko zur Entstehung eines erneut replikationskompetenten Retrovirus ("*replication competent retrovirus*", RCR). Rekombinationen können zwischen Konstrukten für die viralen Proteine, dem Transfervektor und auch endogenen Sequenzen erfolgen.

Die im ersten Teil der Arbeit charakterisierten Pseudotypvektoren werden aus Verpackungszellen entlassen, die nach einer Rekombination der enthaltenen MLV *gag/pol*-Expressionsgene, dem MLV-Transfervektor und den lentiviralen *rev* und *env*-Genen vermehrungsfähige Retroviren des Typs MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-1 bilden könnten. Um das Risiko eines solchen "*worst case*" abzuschätzen, wurde untersucht, ob replikationsfähige Hybridviren dieses Typs durch molekulare Klonierung generiert werden können.

Zur Unterscheidung zwischen Pseudotypvektoren und Hybridviren werden im Folgenden die Hybridviren mit Schrägstrich, z.B. MLV/SIVagm, im Unterschied zu den Pseudotypvektoren mit Klammern, z.B. [MLV(SIVagm)], dargestellt.

3.2.2 Klonierung der Hybridviren

pKA1558LDS kodiert für ein replikationskompetentes ecotropes MLV (Moloney). Das Konstrukt eignete sich durch die günstige Lage der singulären Schnittstellen *Sfi*I und *Cl*aI, welche 5' bzw. 3' im *env*-Leserahmen liegen, zum Austausch des *env*-Gens.

Vor der Insertion der lentiviralen Gene wurde das Start-ATG des MLV Env-Leaderpeptids durch Fusions-PCR (Ho *et al.*, 1998) mutiert, um so die Bildung eines Fusionsproteins mit SIVagm oder HIV-1-Rev zu verhindern. Hierzu wurde in einer PCR auf dem pKA1558LDS-Template ein 635 bp Fragment 5' des Start-ATGs synthetisiert. Der Plusprimer *Sph*MLV5141(+) überspannt die weiter 5' gelegene singuläre Schnittstelle *Sph*I (Position 5141) und durch den rekombinanten Minus-Primer MuATG-GTG(-) erhält das Fragment das zu GTG mutierte ATG. In einem zweiten PCR-Ansatz mit den Primern MuATG-GTG(+) und *Sfi*MLV5903(-) wurde ein 3' des

Start-ATGs liegendes Fragment synthetisiert. Hier enthielt der verwendete Plus-Primer die gewünschte Mutation. Das 3' Fragment reicht bis über die singuläre Schnittstelle *SfiI* (Position 5903) und überspannt eine Länge von 126 bp.

Beide Fragmente wurden äquimolar in die anschließende Fusions-PCR eingesetzt. Sie dienten sich in den ersten Zyklen gegenseitig als Primer, das Fusionsfragment wurde durch die beiden äußeren Primer *Sph*MLV5141(+) und *Sfi*MLV5903(-) amplifiziert. Das entstandene Fusionsfragment war 762 bp groß und wurde nach dem Verdau mit *SphI/SfiI* in das *SphI/SfiI* geöffnete pKA1558LDS-Konstrukt inseriert. Das resultierende Konstrukt pKA1558LDS.ATGm wurde auf seine korrekte Sequenz überprüft. Nach Transfektion in 293T-Zellen wurde im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay keine Expression des ecotropen MLV Env nachgewiesen (nicht gezeigt).

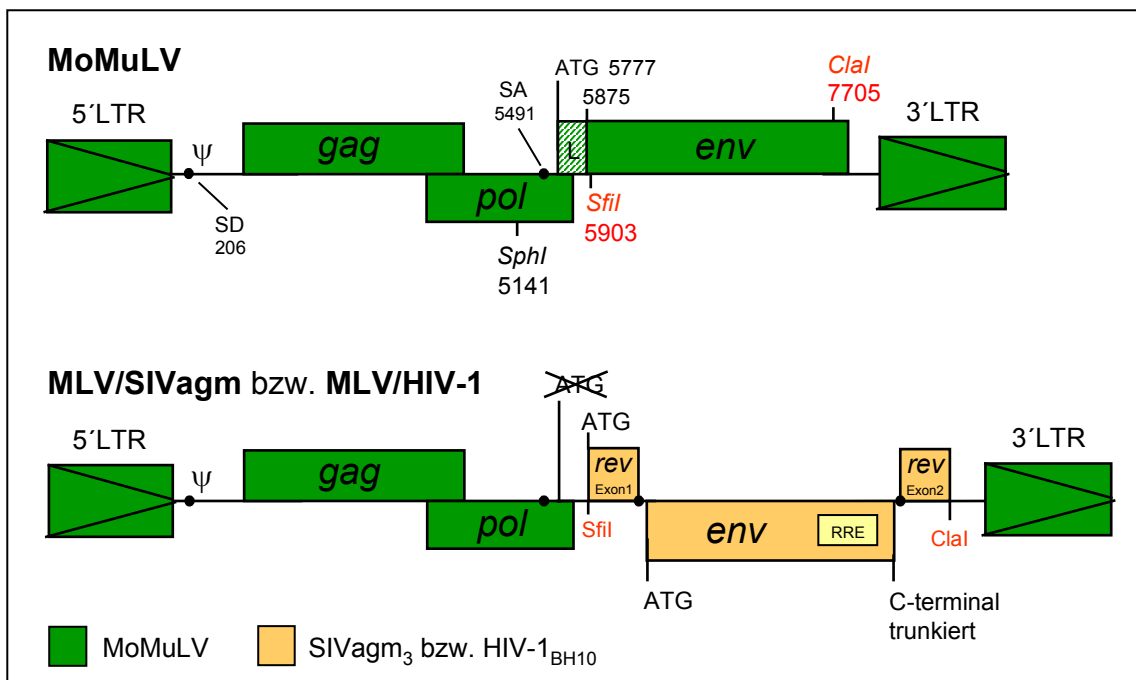


Abb. 3.18 Genomaufbau von MLV und der daraus abgeleiteten Hybridviren MLV/SIVagm und MLV/HIV-1.

Die Lage der zur Klonierung der Hybridviren verwendeten singulären Schnittstellen ist eingezeichnet. Die angegebenen Nukleotidpositionen entsprechen der MoMuLV-Sequenz nach GenBank Accession Nr. J02255. SD - Spleißdonor, SA - Spleißakzeptor, RRE - "rev responsive element"

Durch PCR-Amplifikation der Expressionskonstrukte der truncierten Hüllproteine von SIVagm₃ bzw. dem CXCR4-gängigen HIV-1_{BH10} wurden die Fragmente der lentiviralen *rev* und *env*-Gene generiert. Zur Amplifikation des 2536 bp SIVagm-Fragmentes wurden die Primer *Sfi*agmII(+) und AgmCla(-) verwendet, für das 2703 bp HIV-1-

Fragment die Primer *Sfi*BH10Rev(+) und *Cla*BH10Rev(-). Sie wurden 5' mit einer *Sfi*-Schnittstelle und 3' mit einer *Cla*-Schnittstelle versehen und in das über *Sfi*/*Cla* *env*-deletierte pKA1558LDS.ATGm-Konstrukt inseriert. Es resultierten die Hybridviren MLV/SIVagm und MLV/HIV-1, deren provirale Genomstruktur neben der des Ausgangs-MLV in Abb. 3.18 dargestellt ist.

Durch den Austausch des *Sfi*/*Cla*-Fragmentes von MLV (1763 bp) durch die *env* und *rev*-Gene von SIVagm₃ (2519 bp) bzw. HIV-1_{BH10} (2686 bp) wurde die virale Genomlänge des ecotropen MLV von 8322 bp auf 9078 bp für MLV/SIVagm bzw. 9248 bp für MLV/HIV-1 vergrößert.

3.2.3 Theoretische Spleißmuster der Hybridviren

Die in das MLV-Genom inserierten *env* und *rev*-Gene von SIVagm bzw. HIV-1 unterliegen der Expressionsregulation von MLV. Ihre korrekte Transkription und anschließende Translation könnte jedoch durch die Kombination der Spleißdonor- (SD) und Spleißakzeptor- (SA) Sequenzen beider Viren problematisch sein.

Durch die Insertion des für die HIV-1-Gene *rev* und *env* kodierenden Fragmentes wurde ein zusätzlicher offener Leserahmen von HIV-1 in MLV/HIV-1 inseriert. Er kodiert für das akzessorische Protein Vpu. Das 246 bp umfassende *vpu*-Gen beginnt nach dem ersten *Rev*-Exon und überlappt mit dem 5'-Bereich des HIV-1 *env*-Gens. In HIV-1 ist Vpu zur Freisetzung der Partikel von Bedeutung. Dieses akzessorische Gen existiert im Genom von SIVagm nicht.

In Abb. 3.19 sind alle theoretisch möglichen mRNA-Spleißvarianten, die durch die Nutzung der in den Hybridviren vorhandenen SD- und SA-Sequenzen entstehen könnten, und die sich daraus ergebenden offenen Leserahmen für die einzelnen viralen Proteine zusammengestellt.

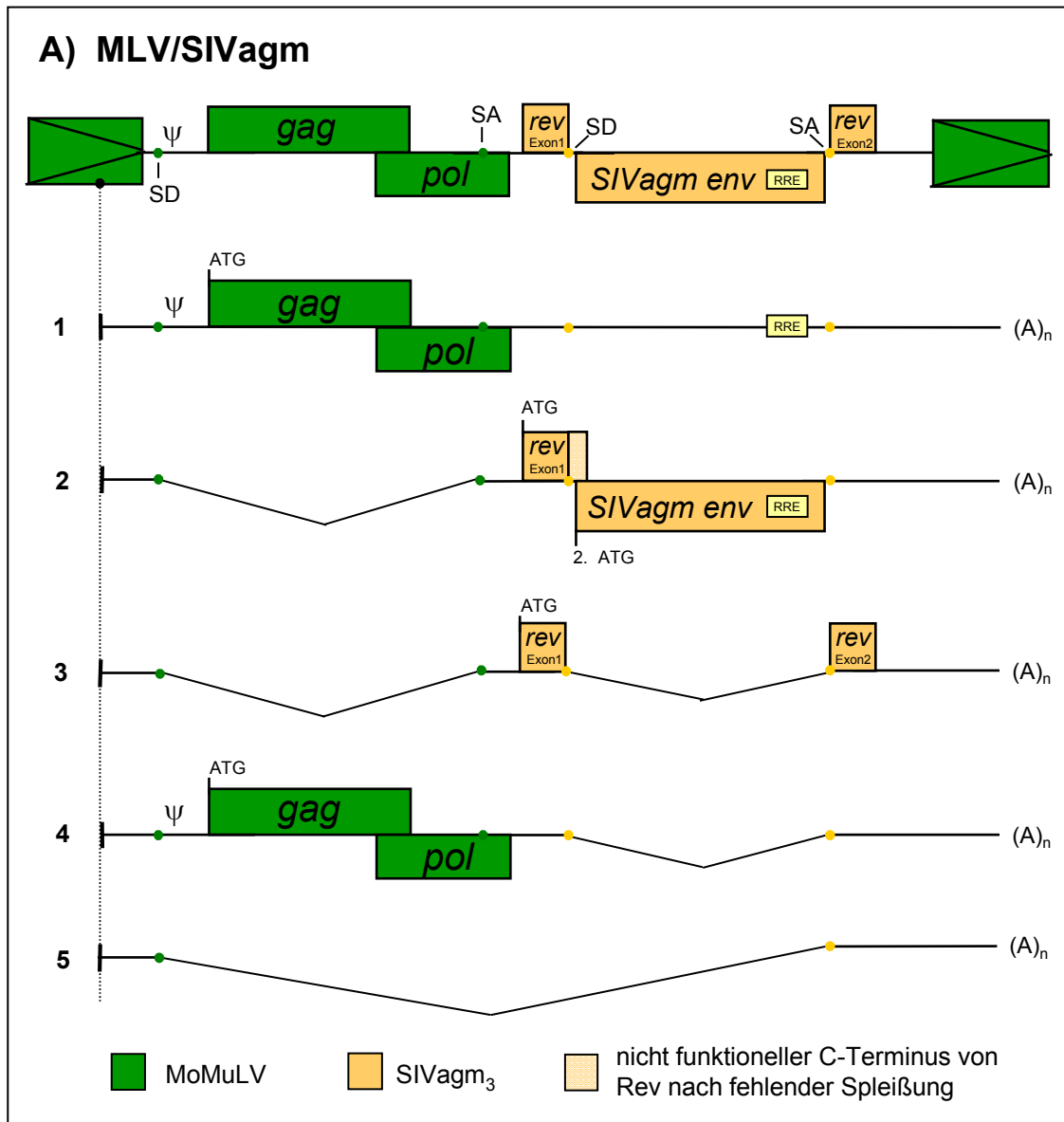


Abb. 3.19 (A) Mögliche Spleiß- und Expressionsvarianten des MLV/SIVagm Hybridvirus.

SD - Spleißdonor; SA - Spleißakzeptor; RRE - "rev responsive element"; Ψ - Psi (Verpackungssignal)

Transkript 1 kodiert für die genomische Vollängen-RNA der Hybridviren. Es wird in die neue Virusgeneration verpackt und dient außerdem als Template für die Strukturproteine Gag und Pol. Transkript 2 ist die mRNA für die Expression von Env. Es handelt sich um eine polycistronische mRNA. Zur Translation von SIVagm Env muß das zweite Start-ATG, für HIV-1 Env sogar das dritte ATG benutzt werden. Wird das erste ATG benutzt, so kommt es wegen der fehlenden Rev-Spleißung zur Bildung von nicht funktionellem Rev. Bei der Nutzung des zweiten ATGs im MLV/HIV-1 Transkript 2 kommt es zur Bildung von Vpu. Das Vorkommen einer bicistronischen mRNA für *rev* und *env* bei SIVagm bzw. *vpu* und *env* bei HIV-1 entspricht der Situation im jeweiligen Wildtypvirus.

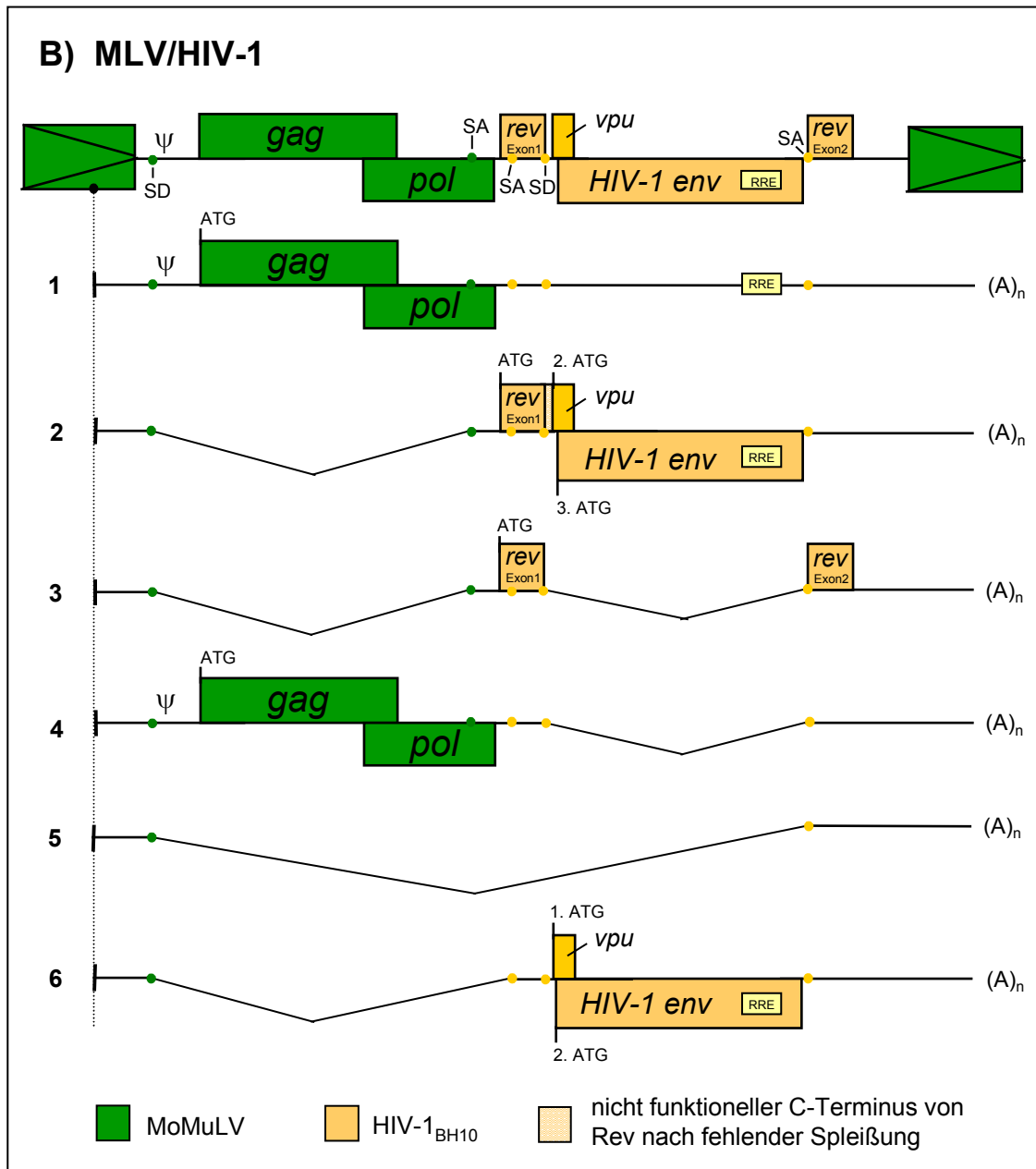


Abb. 3.19 (B) Mögliche Spleiß- und Expressionsvarianten des MLV/HIV-1 Hybridvirus.

SD - Spleißdonor; SA - Spleißakzeptor; RRE - "rev responsive element"; Ψ - Psi (Verpackungssignal)

Die Transkripte 1 und 2 enthalten das sogenannte "rev responsive element" (RRE). Es handelt sich um die Sequenz im *env*-kodierenden Bereich, an die das Rev-Protein binden kann und die entsprechende mRNA aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert, wo sie translatiert wird. Rev sorgt dafür, daß nicht alle mRNAs der kompletten Spleißung unterliegen. Funktionelles Rev kann von Transkript 3 translatiert werden. In Transkript 4 ist die Sequenz des lentiviralen Hüllproteins durch die Spleißung zu funktionellem Rev entfernt. Dieses Transkript besitzt jedoch weiterhin eine Verpackungssequenz.

Durch die Kombination einer von MLV stammenden SD-Sequenz und einer lentiviralen SA-Sequenz könnte für MLV/SIVagm ein weiteres (Transkript 5), für MLV/HIV-1 zwei weitere Transkripte (Transkript 5 und 6) entstehen. Sie können jedoch als irrelevant bezeichnet werden.

3.2.4 Expression der Hybridvirus-kodierten Proteine in Transfektanden

3.2.4.1 Serologischer Nachweis der Expression viraler Proteine

Die Hybridviren wurden auf ihre Fähigkeit, die kodierten viralen Proteine zu exprimieren untersucht. Hierzu wurden die Hybridvirus-kodierenden Konstrukte in 293T-Zellen transfiziert und diese in Parallelansätzen im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay auf MLVp30Gag oder das jeweilige Env gefärbt (Abb. 3.20). MLVp30Gag wurde mit einem polyklonalen Serum aus der Ziege, SIVagm Env mit dem Serum eines SIVagm infizierten Schweinsaffen und HIV-1 Env mit dem Serum eines HIV-1 positiven Spenders nachgewiesen. Untransfizierte 293T-Zellen dienten als Negativkontrolle.

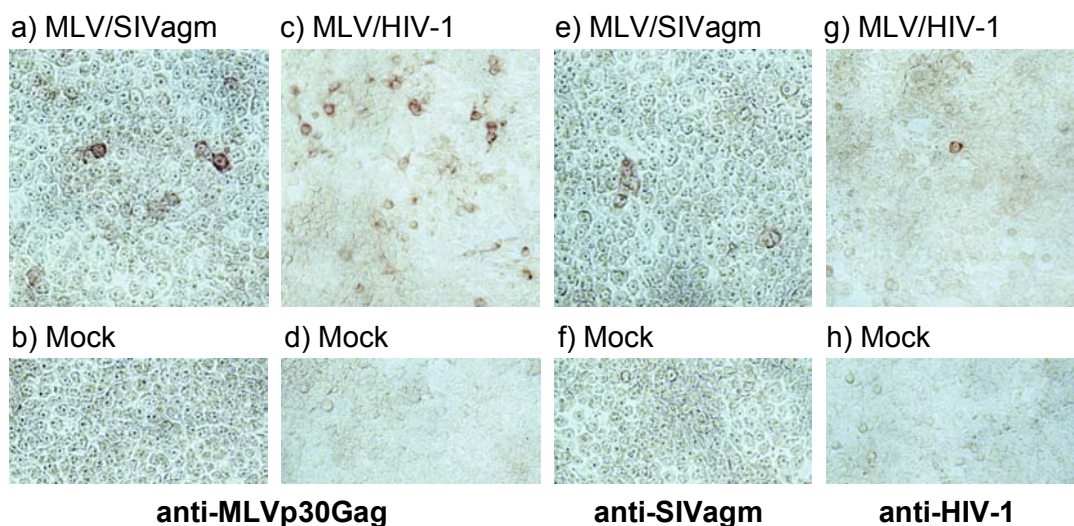


Abb. 3.20 Expression von MLVp30Gag und SIVagm bzw. HIV-1 Env in 293T-Zellen nach Transfektion mit den Hybridviruskonstrukten.

In-situ-Immun-Peroxidase-Färbung

Es wurde die Expression von MLVp30Gag in MLV/SIVagm und MLV/HIV-1-Hybridviruskonstrukt-transfizierten 293T-Kulturen gezeigt. SIVagm Env wurde in der MLV/SIVagm-transfizierten Kultur und HIV-1 Env in der MLV/HIV-1-transfizierten Kultur nachgewiesen. Der Anteil Hüllprotein-positiver Zellen (Abb. 3.20 e und g) war deutlich

geringer als der Anteil MLV Gag-positiver Zellen (Abb. 3.20 a und c) und die Anzahl SIVagm Env exprimierender Zellen war wesentlich größer als die Anzahl HIV-1 Env exprimierender Zellen.

3.2.4.2 Funktionalität der Hybridvirus-kodierten Hüllproteine im Synzytientest

Mit der *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung wird auch intrazellulär vorliegendes, möglicherweise defektes Env nachgewiesen. Die Hüllproteinfunktionalität wurde deshalb im Synzytieninduktionsassay untersucht. Die Fusion von permissiven Zielzellen kann nur durch korrekt prozessierte und auf der Zelloberfläche präsentierte Hüllproteine induziert werden. Die Hybridvirus-kodierenden Konstrukte wurden in 293T-Zellen transfiziert und mit der humanen T-Zelllinie A3.01/CCR5 kokultiviert. Als Positivkontrollen wurden 293T-Zellen mit Expressionskonstrukten für SIVagm₃ Env (pRepΔ10env) bzw. HIV-1_{BH10} Env (pL128) transfiziert. Die Env-Expression in den Kokulturen wurde anschließend im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay überprüft (Abb. 3.21).

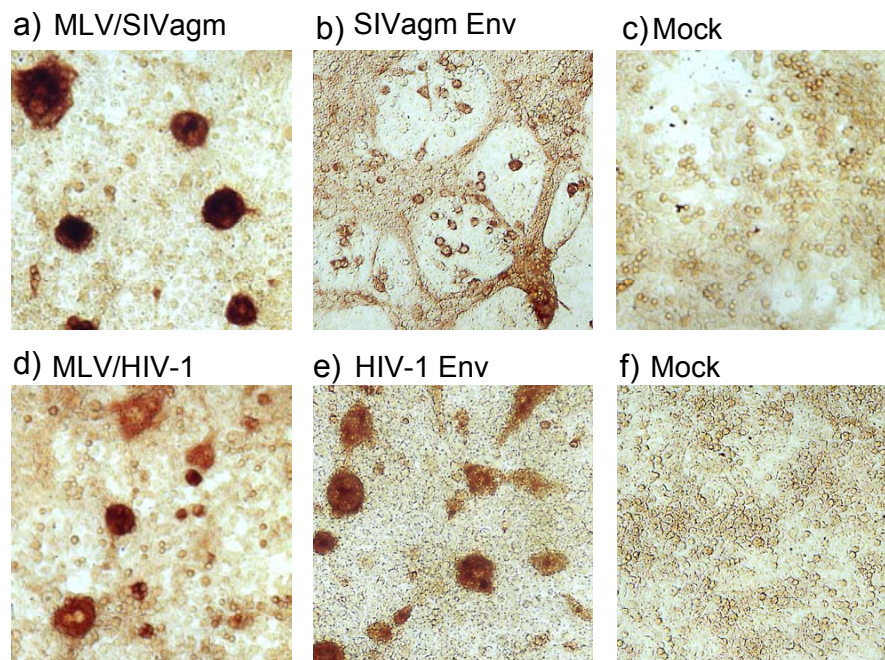


Abb. 3.21 Induktion von Synzytien durch die Hüllproteine der Hybridviren.

In-situ-Immun-Peroxidase-Färbung von 293T-Zellen nach Transfektion mit Hybridvirus-Konstrukten und Kokultivierung mit A3.01/CCR5-Zellen. Verwendete Seren: a) bis c) anti-SIVagm; d) bis f) anti-HIV-1 Serum

In den Kontroll-Ansätzen der Env Expressions-Konstrukte zeigte sich die erwartete Synzytienbildung zwischen 293T- und A3.01/CCR5-Zellen (Abb. 3.21 b und e). In

beiden Hybridvirus-transfizierten Kulturen kam es ebenfalls zur Synzytienbildung (Abb. 3.21 a und d). In der *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung der Kulturen zeigte sich, daß die Hüllproteine vorwiegend in den Synzytien lokalisiert sind. Die Hybridvirus-kodierten Hüllproteine sind offensichtlich funktionell. Untransfizierte 293T-Kulturen in Kokultur mit A3.01/CCR5-Zellen wiesen keine Synzytien auf.

IPA und Synzytieninduktionsassay belegten die Expression und Funktionalität der durch die Hybridviren kodierten Hüllproteine. Offensichtlich werden sie korrekt exprimiert und prozessiert.

3.2.4.3 Expression von Reverser Transkriptase

Die Überstände der Hybridvirus-Transfektanden und untransfizierter 293T-Zellen wurden auf die Aktivität der Reversen Transkriptase (RT) untersucht. Als Positivkontrolle diente der im Kit enthaltene MoMuLV rRT Standard. Der Meßwert des unverdünnten Überstandes lag für beide Hybridviren überhalb des linearen Bereiches zwischen OD und mU RT/ml. Es befand sich deshalb mehr als 264 mU RT/ml im Überstand. Beide Hybridviren sind also in der Lage, funktionelle Reverse Transkriptase zu bilden.

3.2.4.4 Die Rev-Aktivität der Hybridviren

Durch den serologischen Nachweis der Expression von Env wurde auch indirekt der Nachweis der Expression von Rev erbracht, da Rev zur Expression von Env benötigt wird. Rev ist für den bevorzugten Export der genomischen und der *env*-kodierenden mRNA aus dem Kern zur Translation ins Zytoplasma notwendig. Da die Env-Expression der Hybridviren jedoch recht gering war, wurde die Bildung und Funktionalität von Rev in einem anderen Testsystem überprüft.

Es wurde getestet, ob die Rev-Proteine der Hybridviren in der Lage sind, kotransfizierte Env-Expressionskonstrukte mit intaktem RRE, jedoch ohne bzw. mit teilweise deletiertem Leserahmen für Rev korrekt zu exprimieren. Es wurden heterologe Env-Proteine verwendet, um ihre Expression von der Hybridvirus Env-Expression unterscheiden zu können. Es war bereits bekannt, daß das HIV-1 Rev mit dem SIVagm RRE kreuzreagieren kann. Ob Rev von SIVagm jedoch in der Lage ist

das HIV-1 RRE zu binden war bisher nicht untersucht worden. Falls MLV/SIVagm die Expression des HIV-1 Env-Konstruktes nicht unterstützt, kann dies auch auf eine fehlende Kreuzreaktivität zurückzuführen zu sein und sagt nichts über die Aktivität von SIVagm Rev aus.

Das MLV/SIVagm Hybridvirus wurde mit dem Rev-abhängigen HIV-1 Env-Expressionskonstrukt pCMV-NLenv Δ 712 und das MLV/HIV-1-Hybridvirus mit dem Rev-abhängigen SIVagm Env-Expressionskonstrukt pRep Δ 7MLVenv kotransfiziert. In der *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung wurde das jeweils nicht vom Hybridvirus kodierte Env nachgewiesen. Voraussetzung zu diesem Test war die Fähigkeit der zur Färbung verwendeten Seren, zwischen SIVagm und HIV-1 Env zu unterscheiden. Aus früheren Experimenten war bereits bekannt, daß keine Kreuzreaktivität der verwendeten Seren besteht.

Die Zusammenstellung aller Ansätze, inklusive der entsprechenden Kontrollen und eine Ergebniszusammenfassung ist Tab. 3.10 zu entnehmen. Die *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung ist in Abb. 3.22 zu sehen.

Ansatz	Kotransfizierte Plasmide für:			Heterologe Env-Expression *
	Hybridvirus	Heterologes Env	Rev	
a)	–	HIV-1 (Rev-negativ)	–	+/-
b)	–	HIV-1 (Rev-negativ)	HIV-1 Rev	++
c)	MLV/SIVagm	–	–	–
d)	MLV/SIVagm	HIV-1 (Rev-negativ)	–	+/-
e)	–	HIV-1	–	++
f)	-	–	–	–
g)	–	SIVagm (Rev-negativ)	–	+/-
h)	–	SIVagm (Rev-negativ)	HIV-1 Rev	++
i)	MLV/HIV-1	–	–	–
j)	MLV/HIV-1	SIVagm (Rev-negativ)	–	++
k)	–	SIVagm	–	++
l)	-	–	–	–

Tab. 3.10 Expression Rev-negativer Env-Konstrukte nach Kotransfektion mit Hybridvirus-Konstrukten oder einem Rev-Expressionskonstrukt.

In-situ-Immun-Peroxidase-Färbung auf die Expression von HIV-1 Env (a bis f) bzw. SIVagm Env (g bis l): – keine positiven Zellen; +/- einzelne positive Zellen; ++ ca. 10-15% positive Zellen. Die Gesamtmenge der transfizierten DNA in den unterschiedlichen Ansätzen wurde gleich gehalten und bei Bedarf mit pUC18 DNA aufgefüllt.

* Auswertung der *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung von Abb. 3.22

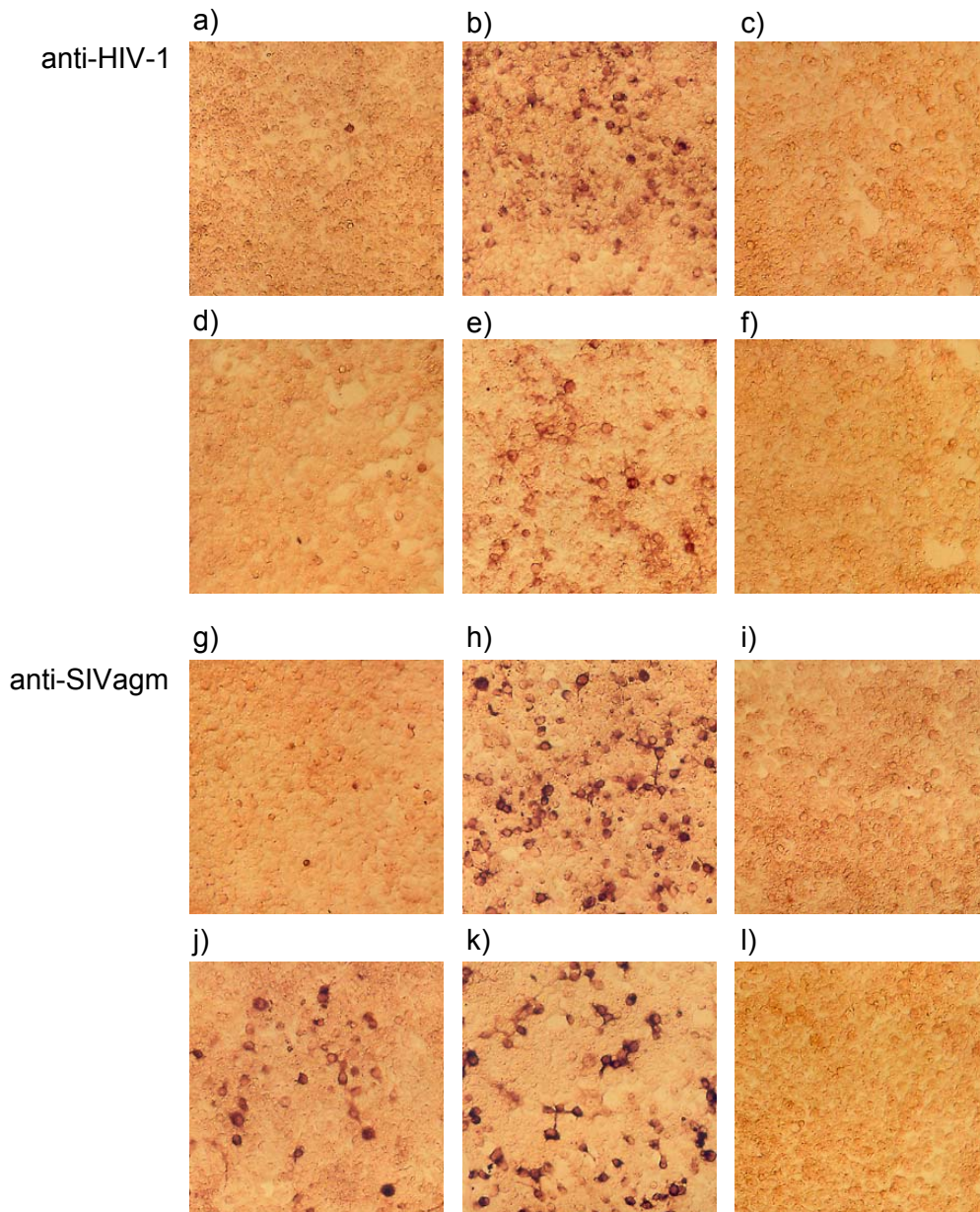


Abb. 3.22 Expression der Hüllproteine von Rev-defekten Konstrukten nach Kotransfektion der Hybridviren in 293T-Zellen: Überprüfung der Rev-Funktion.
In-situ-Immun-Peroxidase-Färbung

Nach der Transfektion der Rev-defekten Env-Expressionskonstrukte (Abb. 3.22 a und g) konnte das entsprechende Env-Protein nur in einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Nach Kotransfektion des HIV-1 Rev-Expressionskonstruktes pCMVrev/hyg wurde sowohl die gesteigerte Expression von HIV-1 Env (Abb. 3.22 b) als auch von SIVagm Env (Abb. 3.22 h) nachgewiesen. Die Ansätze c und i (Abb. 3.22) bestätigten nochmals die fehlende Kreuzreaktivität der verwendeten Seren: Das anti-HIV-1 Serum ist nicht in der Lage das MLV/SIVagm Hybridvirus und das anti-SIVagm Serum das MLV/HIV-1 Hybridvirus nachzuweisen.

Das HIV-1 Rev des MLV/HIV-1 Hybridvirus förderte die Expression des SIVagm Env vom Rev-abhängigen-Expressionskonstrukt (Abb. 3.22 j). Damit wurde die Bildung und Funktionalität von HIV-1 Rev bestätigt. SIVagm Rev, kodiert durch das MLV/SIVagm Hybridvirus (Abb. 3.22 d) zeigte jedoch keine Steigerung der Expression des Rev-abhängigen HIV-1 Env. Wie bereits erwähnt macht ein negativer Befund hier keine Aussage über die Aktivität von SIVagm Rev. Da durch den serologischen Nachweis von SIVagm Env indirekt der Nachweis von SIVagm Rev bereits erbracht wurde (Abb. 3.20 e), ist das negative Ergebnis offensichtlich darauf zurückzuführen, daß SIVagm Rev mit HIV-1 RRE nicht kreuzreagieren kann.

Die Analyse beider Hybridviren auf die Expression ihrer Proteine ergab, daß alle zur Replikation notwendigen Proteine in den Transfektanden gebildet werden. Prinzipiell stehen alle zur Replikation in CD4-positiven Zielzellen benötigten Proteine zur Verfügung. Im weiteren wird deshalb bei der Übertragung der hybridvirushaltigen Überstände von einer Infektion gesprochen.

3.2.5 Fähigkeit der Hybridviren zur Verpackung eines β -Galaktosidase transferierenden MLV-Vektors

Es wurde getestet, ob die Hybridviren in der Lage sind, MLV-Vektoren zu verpacken und entsprechende Zielzellen zu transduzieren. Dazu wurden die Hybridvirus-kodierenden Konstrukte mit dem verpackbaren, für β -Galaktosidase-kodierenden MLV-Transfektor MFGNLS/*acZ* in 293T-Zellen kotransfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Überstände auf GHOST/CXCR4 und GHOST/CCR5-Zellen übertragen. Nach zwei weiteren Tagen wurde die Zielzellen im X-Gal-Test auf die Expression der β -Galaktosidase analysiert (Tab. 3.11). Zur Kontrolle wurden durch Dreifachtransfektion von 293T-Zellen generierte [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(HIV-X4)]-Pseudotypvektoren eingesetzt.

Die Überstände der Kotransfektion mit dem MLV/SIVagm-Hybridvirus führten zur Transduktion von GHOST-Zellen. Es zeigte sich eine SIVagm-korezeptorspezifische Transduktion der CD4/CCR5-positiven GHOST/CCR5-Zellen. Die transduzierten GHOST/CXCR4-Zellen sind auf die bereits bekannte endogene Expression von Bonzo (Edinger *et al.*, 1998) zurückzuführen. Der MLV-Transfektor wurde offensichtlich in die vom Hybridviruskonstrukt gebildeten Viruspartikel verpackt und in die Zielzellen transferiert. Das MLV/SIVagm Hybridvirus ist demnach zur Bildung funktionsfähiger

Partikel in der Lage. Der Überstand der transient hergestellten [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren erreichte den höchsten Titer auf GHOST/CCR5-Zellen und zeigte ebenfalls die Bonzo-vermittelte Transduktion von GHOST/CXCR4-Zellen.

	Titer [i.E./ml] der <i>lacZ</i> -Gen übertragenden			
	Hybridviren		Pseudotypvektoren	
GHOST-Linie	MLV/SIVagm	MLV/HIV-1	[MLV(SIVagm-wt)]	[MLV(HIV-X4)]
/CCR5	$8,1 \times 10^3$	< 1	$2,7 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$
/CXCR4	$1,4 \times 10^2$	< 1	$3,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^5$

Tab. 3.11 Verpackung eines β -Galaktosidase transferierenden MLV-Vektors durch Hybridvirus- oder Vektorpartikel.

Der Überstand der Kotransfektion mit dem MLV/HIV-1-Hybridvirus führte nicht zur Transduktion einer GHOST-Linie, während die [MLV(HIV-X4)]-Pseudotypvektoren die CD4/CXCR4-positiven GHOST/CXCR4-Zellen und aufgrund der endogenen Expression von CXCR4 auch die GHOST/CCR5-Linie transduzierten. Offensichtlich ist das MLV/HIV-1-Hybridvirus nicht in der Lage den MLV-Transfektor zu übertragen.

3.2.6 Replikationskompetenz der Hybridviren bei Passagierung auf permissiven Zielzellen

Zur Überprüfung der Infektiosität und Replikationsfähigkeit wurden hybridvirushaltige Überstände transfizierter 293T-Zellen zur Infektion und Passagierung auf zwei Generationen GHOST/CXCR4 und GHOST/CCR5-Zellen eingesetzt. Nach Infektion der ersten GHOST-Generation (GHOST I) wurde diese für eine Woche kultiviert. Die zweite GHOST-Generation (GHOST II) wurde mit den Überständen der ersten Generation infiziert und ebenfalls für eine Woche kultiviert. Aus den Überständen der 293T-Transfektanden und den GHOST-Zellen beider Generationen wurde die Aktivität der Reversen Transkriptase (RT) bestimmt (3.2.6.1). Die GHOST-Zellen wurden im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay auf MLVp30Gag und die lentiviralen Hüllproteine untersucht (3.2.6.2) und die genomische DNA aus 293T, GHOST I und II-Zellen mittels PCR auf provirale DNA analysiert (3.2.6.3). Die genaue Durchführung des Passagierungsexperimentes ist in Abb. 3.23 zusammengestellt.

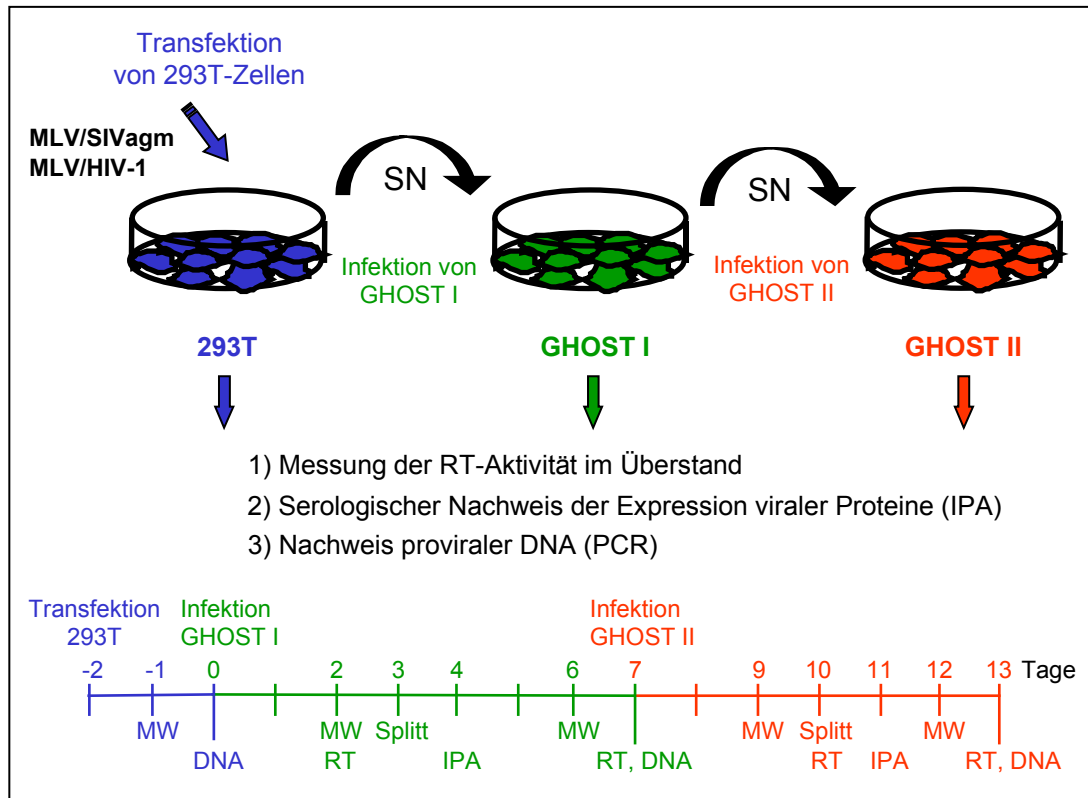


Abb. 3.23 Passagierung hybridvirushaltiger Überstände zur Prüfung ihrer Replikationskompetenz. Verlaufsschema.

SN - Zellfreier Überstand ("supernatant"); MW - Mediumwechsel; RT - Probenahme für Analyse auf RT-Aktivität; Splitt - Expandieren der Kultur; IPA - Fixierung für *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung; DNA - Präparation genomischer DNA für PCR-Analyse

Zur Kontrolle der Hybridvirus-Infektionen wurden die replikationskompetenten Ausgangsviren HIV-1_{NL-4.3} und SIVagm₃ ebenfalls über Transfektion von 293T-Zellen generiert und zur Infektion der beiden GHOST-Linien eingesetzt und analog passagiert. Ca. vier Tage nach der Infektion mit SIVagm begannen die GHOST/CCR5-Zellen der ersten Generation Synzytien zu bilden. Zur gleichen Zeit begannen die HIV-1 infizierten GHOST/CXCR4-Zellen der ersten Generation Synzytien zu zeigen. Nach Übertragung der offensichtlich virushaltigen Überstände der ersten Generation auf die zweite Generation GHOST-Zellen zeigte sich das gleiche Bild. Die Synzytienbildung zeigt die erfolgreiche Übertragung der Infektiösität der Überstände transfizierter 293T-Zellen bis in die zweite GHOST-Generation an. Alle für den Zelleintritt der beiden Lentiviren benötigten Rezeptoren sind auf den verwendeten GHOST-Zellen exprimiert und stehen somit auch den abgeleiteten Hybridviren zur Verfügung.

3.2.6.1 Sezernierung von Reverser Transkriptase (RT) in Hybridvirus-infizierten Kulturen

In Abb. 3.24 ist der Verlauf der RT-Aktivität nach Passagierung der hybridvirushaltigen Überstände und anschließender Kultivierung der GHOST I und II-Zellen gezeigt. Zu Meßzeitpunkt 0 wurde die Aktivität der RT in den zur Infektion der GHOST I-Zellen eingesetzten 293T Transfektanden-Überständen bestimmt. Neben den Hybridviren wurde das ecotrope Ausgangs-MLV (MoMuLV) mitgeführt, welches ebenfalls durch Transfektion von 293T-Zellen generiert wurde.

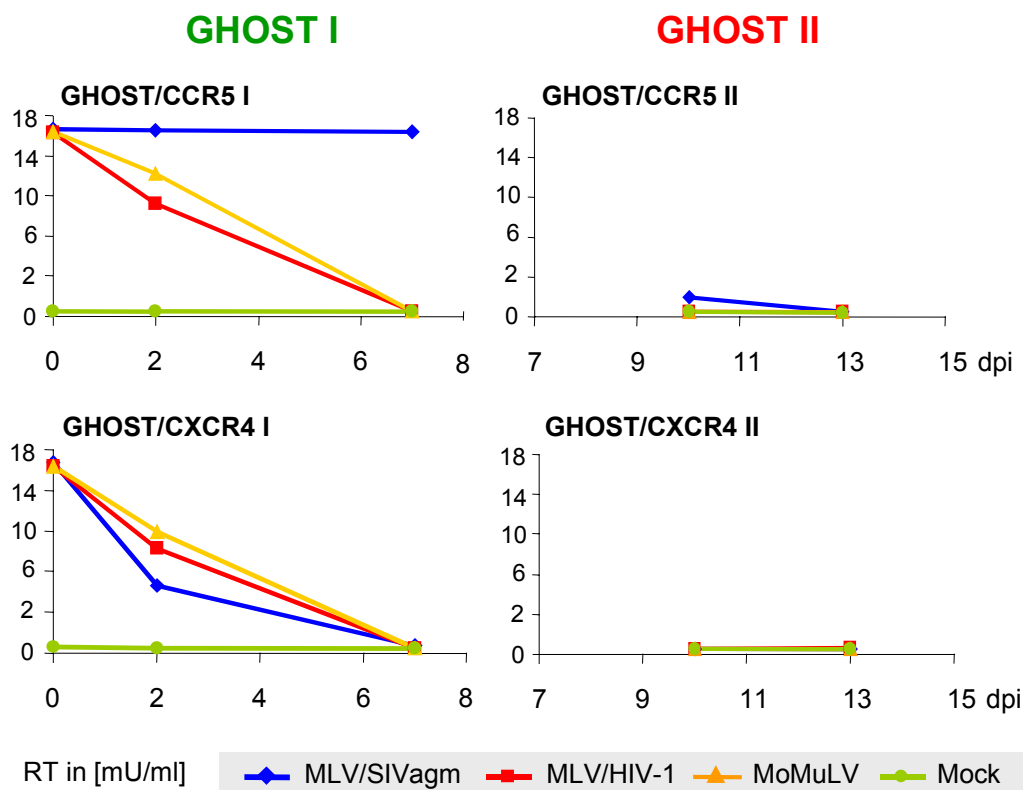


Abb. 3.24 Verlauf der RT-Aktivität im Überstand von GHOST-Zellen nach Infektion mit den Hybridviren bzw. MoMuLV.

X-Achse: Tage nach Infektion ("days post infection" - dpi); Y-Achse: mU RT/ml

Die GHOST-Zellen wurden 48 Stunden mit den hybridvirushaltigen Überständen inkubiert. Zwei Tage nach Infektion wurde in allen Ansätzen noch übertragene RT-Aktivität nachgewiesen.

MoMuLV kann auf humanen Zellen nicht replizieren, weshalb der RT-Wert mit der Zeit wie erwartet abnahm (gelbe Linie). Sieben Tage nach Infektion und nach zweifachem Mediumwechsel konnte in den MoMuLV infizierten Ansätzen der ersten und zweiten GHOST-Generation keine RT-Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Sieben Tage nach Infektion wurde im Überstand der MLV/SIVagm-infizierten GHOST/CCR5 I-Zellen (blaue Linie) aktive RT nachgewiesen. Es handelt sich um eine SIVagm-korezeptorspezifische Infektion, da im Überstand der MLV/SIVagm-infizierten GHOST/CXCR4 I-Zellen keine RT-Aktivität gefunden wurde. Der Überstand der MLV/SIVagm infizierten GHOST I-Zellen führte jedoch nicht zur Infektion der zweiten Generation GHOST-Zellen (GHOST II).

Nach der Infektion durch MLV/HIV-1 (rote Linie) konnte nach Abfallen der übertragenen RT-Aktivität kein RT-Anstieg im Überstand der GHOST/CXCR4 und GHOST/CCR5-Zellen der ersten und zweiten Generation (GHOST I und II) nachgewiesen werden.

3.2.6.2 Expression viraler Proteine in Hybridvirus-infizierten GHOST-Zellen

Die Hybridvirus-infizierten GHOST I und GHOST II-Kulturen wurden 4 Tage nach Infektion auf die Expression von MLVp30Gag und SIVagm bzw. HIV-1 Env im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay analysiert (Abb. 3.25). Als Positiv-Kontrollen wurden die mit Synzytien durchzogenen Kulturen HIV-1 und SIVagm infizierter GHOST-Zellen verwendet (nicht gezeigt). In den Hybridvirus-Ansätzen konnte keine Synzytieninduktion beobachtet werden.

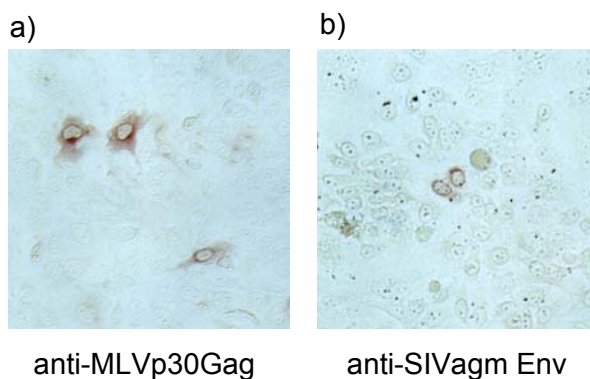


Abb. 3.25 Expression von MLVp30Gag und SIVagm Env in GHOST/CCR5 I-Zellen nach Infektion mit MLV/SIVagm. *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbung

MLVp30Gag und SIVagm Env wurden in den MLV/SIVagm infizierten GHOST/CCR5-Zellen der ersten Generation nachgewiesen. In den GHOST/CXCR4-Zellen der ersten Generation und in beiden Linien der GHOST II-Zellen konnten keine viralen Proteine von MLV/SIVagm nachgewiesen werden.

Proteine des MLV/HIV-1-Hybridvirus konnten weder in GHOST I noch in GHOST II-Zellen beider Korezeptoren nachgewiesen werden.

3.2.6.3 Nachweis proviraler DNA in Hybridvirus-infizierten Zielzellen

Aus den transfizierten 293T-Zellen wurde zwei Tage nach Transfektion und aus den infizierten GHOST-Kulturen (GHOST I und II) jeweils eine Woche nach Infektion die genomische DNA isoliert. Sie wurde mittels PCR auf das Vorkommen proviraler DNA untersucht. Dazu wurde ein Plusprimer im MLV *pol*-Bereich und ein Minusprimer im *env*-Gen des jeweils nachzuweisenden Hybridvirus verwendet. Für das MLV/SIVagm-Hybridvirus entsteht ein 301 bp Fragment, für MLV/HIV-1 ein 420 bp Fragment. Die Mock-infizierten Kulturen waren mit Überstand von uninfizierten 293T bzw. uninfizierten GHOST I-Kulturen inkubiert worden. Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen und der Qualität der präparierten genomischen DNA wurde im gleichen PCR-Ansatz ein Haushaltsgen, die humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (huGAPDH; 570 bp-Fragment) nachgewiesen. Für den Kontrollansatz K wurde statt genomischer DNA Wasser eingesetzt (Abb. 3.26).

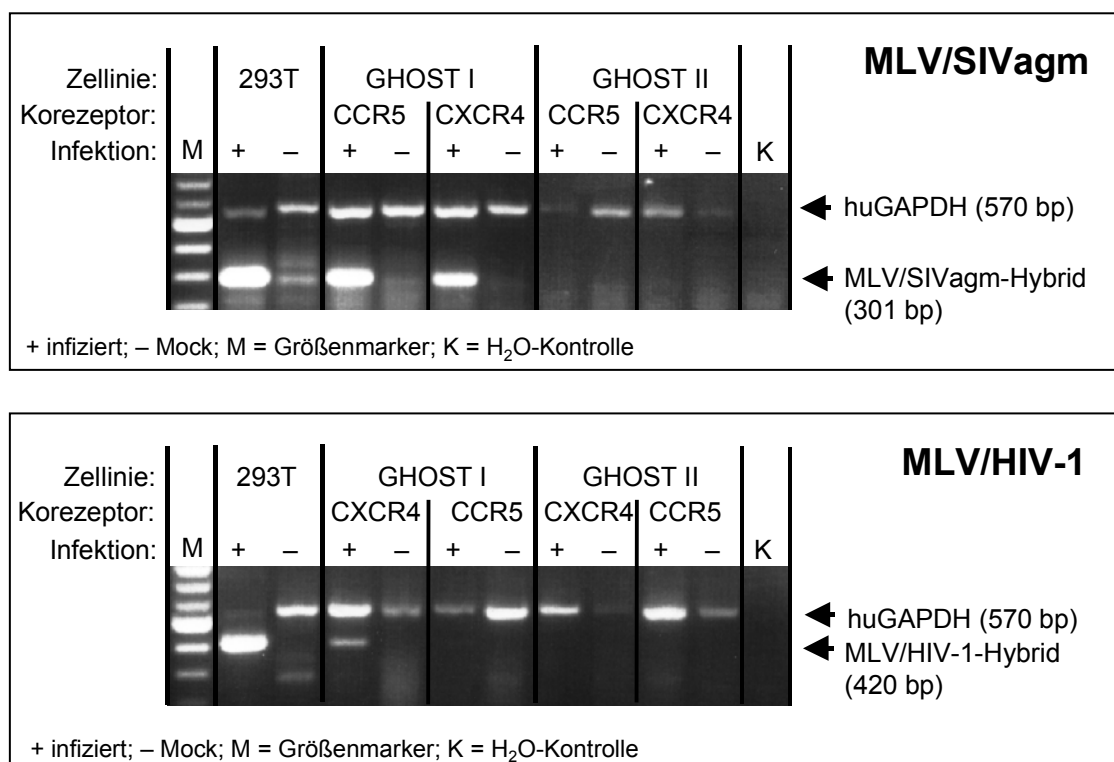


Abb. 3.26 Amplifikate proviraler DNA aus transfizierten 293T und Hybridvirus-infizierten GHOST-Zellen.

Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte in einem 2%igen Agarosegel.

Die provirale DNA des MLV/SIVagm-Hybridvirus konnte in 293T-Transfektanden und GHOST-Zellen der ersten Generation (GHOST/CCR5 I und GHOST/CXCR4 I) nachgewiesen werden. Offensichtlich erlaubte die bereits gezeigte "low level"-

Expression des Korezeptors Bonzo die Infektion der GHOST/CXCR4-Zellen durch MLV/SIVagm.

Die provirale DNA des MLV/HIV-1 Hybridvirus konnte in den 293T-Transfektanden und in den GHOST/CXCR4-Zellen der ersten Generation nachgewiesen werden. Doch selbst nach 40 PCR-Zyklen wurde nur eine relativ schwache Bande erhalten.

In den Zellen der zweiten Generation (GHOST II) wurde weder für MLV/SIVagm, noch für MLV/HIV-1 ein hybridvirusspezifisches PCR-Signal detektiert.

3.2.7 Hybridvirus-Infektion der humanen T-Zelllinie Molt4/8

Humane CD4-positive T-Zellen sind die potenziellen Zielzellen einer Infektion mit MLV/SIVagm und MLV/HIV-Hybridviren. Deshalb wurde nochmals die Replikationskompetenz der Hybridviren in der humanen T-Zelllinie Molt4/8 untersucht.

Die Hybridviren MLV/SIVagm und MLV/HIV-1 wurden durch Transfektion von 293T-Zellen generiert. Zur Kontrolle wurde ein amphotropes MLV generiert. Nach der vierstündigen Infektion wurden die Zellen mehrmals gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Sie wurden wöchentlich gesplittet und alle 2-3 Tage wurde eine Probe für die RT-Analyse genommen. Abb. 3.27 zeigt den Verlauf der RT-Aktivität nach Infektion über einen Zeitraum von vier Wochen.

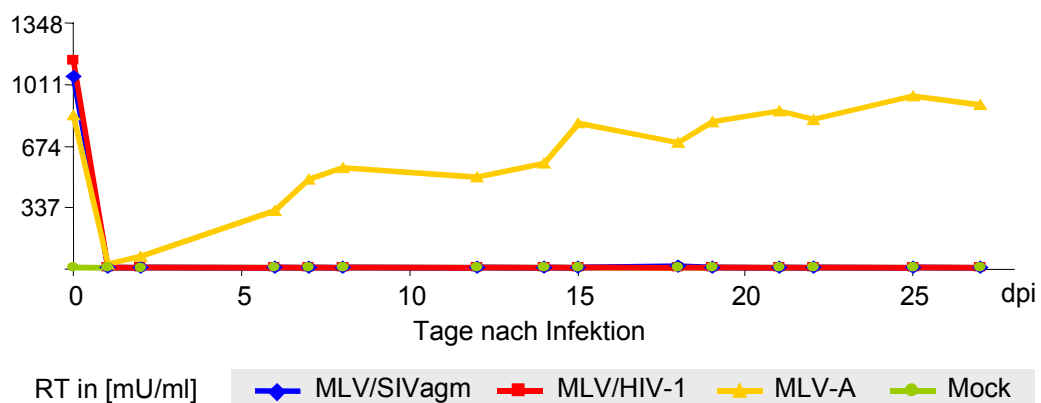


Abb. 3.27 RT-Aktivität im Überstand von Molt4/8-Zellen nach Infektion mit MLV/SIVagm, MLV/HIV-1 oder MLV-A.

X-Achse: Tage nach Infektion ("days post infection" - dpi); Y-Achse: mU RT/ml

Der Meßwert an Tag 0 zeigt die RT-Aktivität des zur Infektion eingesetzten virushaltigen Überstandes aus den 293T-Transfektionen. Weder in der MLV/SIVagm noch in der MLV/HIV-1 infizierten Molt4/8-Kultur konnte während der Kulturdauer ein

Anstieg der RT-Aktivität festgestellt werden. Der RT-Wert für MLV-A stieg dagegen stetig an, das Virus infizierte die Molt4/8-Kultur durch.

Die provirale DNA beider Hybridviren konnte mittels PCR 14 Tage nach Infektion nachgewiesen werden (Abb. 3.28). Es wurde ein 301bp Fragment für MLV/SIVagm mit den Primern MLV5753(+) und SIV6054(-) bzw. ein 288bp Fragment für MLV/HIV-1 mit dem entsprechenden HIV-Minusprimer (HIV6041(-)) erhalten. Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen wurde im gleichen PCR-Ansatz das Gen der humanen GAPDH nachgewiesen. Zur Amplifikationskontrolle wurde Plasmid-DNA (pKASIV bzw. pKAHIV) der Hybridviren verwendet und eine Wasserkontrolle durchgeführt.

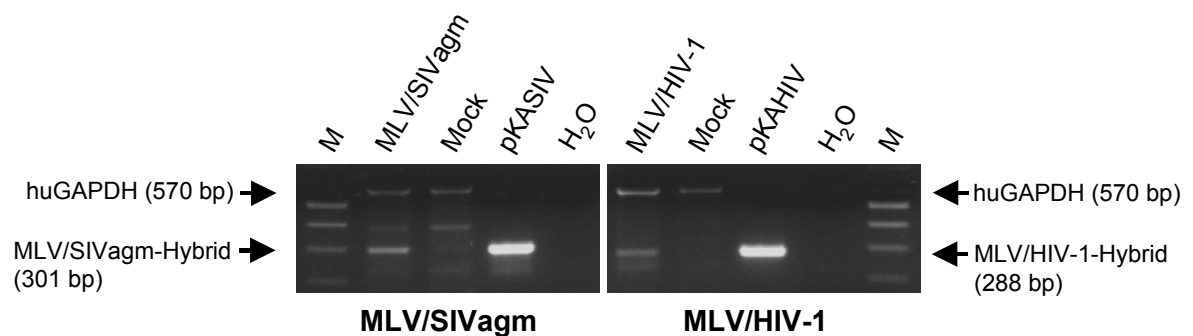


Abb. 3.28 Amplifikate proviraler DNA aus Hybridvirus-infizierten Molt4/8-Zellen.
Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte in einem 2%igen Agarosegel.
M = DNA-Fragmentgrößenmarker

Weder MLV/SIVagm noch MLV/HIV-1 ist in der Lage geeignete Zielzellen produktiv zu infizieren. Es konnte keine Virus-Replikation festgestellt werden. Die Ergebnisse weisen jedoch auf ein vorhandenes "Transduktionspotential" hin.

4 Diskussion

Für eine zukünftige *In-vivo*-Gentherapie der Immunschwäche AIDS werden Vektoren benötigt, die selektiv CD4-positive Zellen des peripheren Blutes transduzieren können. Dazu eignen sich mit HIV-1 Env pseudotypisierte Vektoren. Schnierle *et al.* (1997) haben jedoch gezeigt, daß bei Anwendung von [MLV(HIV-1)]-Vektoren in HIV-1-positiven Patienten eine rasche Neutralisierung durch HIV-1-spezifische Antikörper zu erwarten ist. Diese Vektoren sind aber für eine prophylaktische intrazelluläre Immunisierung gegen die HIV-Infektion in HIV-1-negativen Individuen denkbar. [MLV(SIVagm-wt)]-Pseudotypvektoren erfüllen neben der Zellspezifität eine weitere wichtige Voraussetzung, die für *In-vivo*-Anwendungen in HIV-1-positiven Patienten unerlässlich ist: Sie werden nicht durch HIV-1-spezifische Antikörper neutralisiert (Stitz *et al.*, 2000a).

Neben der CD4-Spezifität zeigen die Pseudotypvektoren auch die Korezeptorspezifität des verwendeten lentiviralen Hüllproteins. Die bisher in der Literatur beschriebenen [MLV(HIV)]-Vektoren nutzen den Korezeptor CXCR4 (Mammano *et al.*, 1997; Lodge *et al.*, 1998 und Höhne *et al.*, 1999), während [MLV(SIV)]-Vektoren hauptsächlich CCR5 nutzen (Indraccolo *et al.*, 1998; Stitz *et al.*, 2000a).

Das Expressionsmuster der einzelnen Korezeptoren ist auf den verschiedenen Populationen der peripheren Blutlymphozyten unterschiedlich. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten durchflußzytometrischen Messungen im Vollblut humaner Spender bestätigten weitgehend die Literaturangaben: Während CXCR4 auf 70 bis 95% der CD4-positiven Zellen vorkommt, wird CCR5 nur auf etwa 3 bis 15% der CD4-positiven Zellen exprimiert (Ostrowski *et al.*, 1998; Vassiliadou *et al.*, 1999). Nach Lee *et al.* (1999) wird CCR5 präferentiell auf Memory-Zellen (CD45RO⁺) und CXCR4 dagegen auf naiven, unstimulierten T-Zellen (CD45RO⁻) exprimiert. Pseudotypvektoren, die entweder nur CXCR4 oder nur CCR5 nutzen, können demnach völlig unterschiedliche Subpopulationen innerhalb der Blutlymphozyten transduzieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Entwicklung eines möglichst effizienten CD4/CXCR4-spezifischen Vektors zur Transduktion peripherer Blutlymphozyten, der zudem auch für die Anwendung in HIV-1-positiven Patienten geeignet ist. Dies sollte durch V3-Loop-Austausch im Wildtyp-SIVagm Hüllprotein erreicht werden.

4.1 Die Bedeutung des V3-Loops für die Korezeptornutzung

Aus einer Reihe von Studien zur Korezeptornutzung von SIV geht hervor, daß der Hauptanteil der bisher beschriebenen Isolate CCR5 und mit geringerer Effizienz meist einen weiteren Korezeptor, wie Bob oder Bonzo (Deng *et al.*, 1997; Marcon *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997), jedoch kein CXCR4 zum Zelleintritt nutzen. Neben dem von Schols *et al.* (1998) beschriebenen CXCR4-nutzenden SIV-Isolat (SIVmnd, GB-1) beschrieb Owen *et al.* (2000) gleich mehrere primäre CXCR4-nutzende SIV-Isolate. Die Daten von Owen *et al.* überzeugen jedoch nicht, da die Effizienz der CXCR4-Nutzung im Vergleich zur CCR5-Nutzung und im Vergleich zu einem CXCR4-nutzenden HIV-2 Isolat sehr gering war. Außerdem führte die Verwendung des CXCR4 Liganden SDF-1, ein monoklonaler Antikörper gegen CXCR4 oder der Einsatz von zwei CXCR4-Antagonisten (T-22 und AMD3100, De Clercq *et al.*, 1999) in Konzentrationen, die den Zelleintritt von HIV-1 bereits komplett blocken, nur teilweise zu einer Blockierung. Owen *et al.* vermuten daraufhin, daß die Interaktion zwischen SIV Env und CXCR4 in einer völlig anderen Art und Weise stattfindet, als bei HIV-1 und CXCR4. Aufgrund des fehlenden V3-Loop-Konsensusmotifs für die CXCR4-Nutzung dieser Isolate gehen sie weiter davon aus, daß der zu HIV-1 homologe V3-Loop-Bereich von SIV keinen Einfluß auf die Korezeptorwahl hat. Im Gegensatz zu HIV-1 ist die V3-Loop-homologe Sequenz von SIV auch nur wenig variabel (Almond *et al.*, 1992; Kirchhoff *et al.*, 1997). Ihr Einfluß auf die Nutzung des Korezeptors ist daher unklar.

Bereits mehrere Gruppen haben durch Veränderungen im HIV-1 homologen V3-Loop-Bereich von SIVmac₂₃₉ dessen Einfluß auf die Korezeptornutzung untersucht. Die Arbeitsgruppe um Frank Kirchhoff hat durch den Austausch von einzelnen Aminosäuren innerhalb des V3-Loops die Korezeptornutzung dahingehend beeinflusst, daß neben CCR5 der Korezeptor Bob für den Zelleintritt genutzt werden konnte (Kirchhoff *et al.*, 1994 und 1997; Pohlmann *et al.*, 1999). Durch die Insertion des V3-Loops eines CXCR4-gängigen HIV-1 Isolates wurde gezielt versucht, den Tropismus von SIVmac auf die Nutzung von CXCR4 umzustellen. Die Versuche zweier Gruppen führten jedoch nicht zum Erfolg (Mamounas *et al.*, 1995; Kirchhoff *et al.*, 1994). Ein hoher Anteil basischer Aminosäuren im V3-Loop von HIV-1 korreliert mit der Nutzung von CXCR4 (De Jong *et al.*, 1992; Fouchier *et al.*, 1992; Okada *et al.*, 1994). Das Einführen basischer Aminosäuren, zur Herstellung einer insgesamt positiven Nettoladung des V3-Loops von SIVmac führten jedoch nicht zur Nutzung von CXCR4

(Meister *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit ist es demnach erstmalig gelungen, durch Austausch der zu HIV-1 homologen V3-Loop-Sequenz in einem CCR5-nutzenden SIV Env die Nutzung von CXCR4 zu bewirken.

Der dem HIV-1 V3-Loop-homologe Bereich in SIVagm gp140-SU wurde zuerst durch einen Aminosäuresequenzvergleich identifiziert. Der Austausch dieses Bereiches gegen den 36 Aminosäuren umfassenden V3-Loop des CXCR4-tropen HIV-1_{BH10} führte tatsächlich zur Bildung der CXCR4-nutzenden SIVagm Env-Variante SIVagm-X4. Die erfolgreiche Änderung des Tropismus deutet die Äquivalenz des V3-Loop-homologen Bereiches von SIVagm und HIV-1 in Bezug auf die Korezeptorbindung an, obwohl die Sequenzhomologie der ausgetauschten Aminosäuren nur bei 33% lag.

Die Insertion des V3-Loops des CCR5-gängigen HIV-Isolates HIV-1_{SF162} führte jedoch nicht zur Bildung einer funktionellen Env-Variante. Ob nur die Bindung an den Korezeptor oder auch die Bindung an CD4 betroffen ist, ist nicht bekannt. Das CD4-Molekül bindet hauptsächlich an eine Aminosäurenabfolge im konstanten Bereich C4, im Zusammenspiel mit einzelnen Aminosäuren in C2 und C3. Die Ursache für die fehlende Funktionalität könnte eine Fehlfaltung des Env-Proteins sein, ausgelöst durch Ladung oder sterische Hinderung des zwischen C2 und C3 inserierten V3-Loops. Nach Hoffman *et al.* (1998) ist für die Bindung an CXCR4 hauptsächlich der V3-Loop verantwortlich, für die Bindung an andere Korezeptoren wie CCR5 und CCR3 ist das Zusammenspiel mit weiteren in die Korezeptorbindung involvierter Bereiche, wie V1 und V2, notwendig. Möglicherweise wäre durch die zusätzliche Insertion dieser Bereiche aus dem HIV-1_{SF162}-SU die Bindung von CCR5 möglich geworden.

Während es beim Menschen im Laufe der Infektion und mit voranschreitender Krankheit zu einer Verschiebung der Korezeptornutzung von CCR5 zu CXCR4 und anderen Korezeptoren kommt (Connor *et al.*, 1997; Scarlatti *et al.*, 1997), scheint die Korezeptornutzung der SIV-Isolate stabil zu bleiben. Mittlerweile gelang in unserer Arbeitsgruppe durch den identischen V3-Loop-Austausch die Generation eines replikationskompetenten CXCR4-tropen SIVagm (König *et al.*, in Vorbereitung). Ob die Änderung der Korezeptornutzung einen Einfluß auf das Replikationsverhalten oder die Pathogenität im natürlichen Wirt hat, wird derzeit untersucht.

Bei der Benutzung des GHOST-Zellpanels für die Bestimmung der Korezeptornutzung CXCR4-troper Env-Varianten muß man die endogene Expression von CXCR4 berücksichtigen (Edinger *et al.*, 1998). Hierdurch kam es zu einer "Hintergrundtransduktion" aller Zellen des Panels. CXCR4 konnte dennoch eindeutig als

Hauptkorezeptor der [MLV(SIVagm-X4)]- und [MLV(HIV-X4)]-Vektoren bestimmt werden. Die Transduktionseffizienz für CCR8 bzw. V28-positive GHOST-Zellen war noch höher als für GHOST/parental-Zellen. Dies kann auf die klonale Entstehung der verschiedenen Linien, die zu unterschiedlich hoher endogener Expression an CXCR4 geführt haben kann, aber auch auf echte Nutzung dieser beiden Korezeptoren zurückzuführen zu sein.

4.2 Etablierung stabiler Verpackungszelllinien

Stabile Verpackungszelllinien haben den Vorteil, unabhängig von der Transfektionseffizienz relativ einfach große Mengen an Vektor produzieren zu können. Die erreichten Titer liegen zudem meist höher als die aus transienter Vektorproduktion. Daher wurden auf Basis der Env-negativen TELCeB6-Verpackungszellen stabile Linien für die Produktion von [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren entwickelt. Die Titer der stabilen Verpackungszelllinien sind offensichtlich von der Expressionsstärke der lentiviralen Hüllproteine in der Kultur abhängig. *In-situ*-Immun-Peroxidase-Färbungen und durchflußzytometrische Analysen zeigten, daß ein Großteil der Zellen innerhalb einer Verpackungszellkultur die Expression der Hüllproteine abgeschaltet hatten. Der Titer konnte durch die Anreicherung Hüllprotein-positiver Zellen gesteigert werden. Es gelang die Generierung eines Verpackungszellklones für die Produktion von [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren mit einem Titer von $7,6 \times 10^5$ i.E./ml auf GHOST/CCR5-Zellen. Der Titer ist gegenüber dem der bereits etablierten Linie (Δ 0Mix; Stitz *et al.*, 2000a) um eine Größenordnung höher. Für die Produktion von [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren wurde eine Linie mit 6×10^3 i.E./ml auf GHOST/CXCR4-Zellen generiert.

Außer den von unserer Gruppe etablierten stabilen Linien wurden alle bisher verwendeten [MLV(SIV)]- und [MLV(HIV)]-Vektoren transient in 293T-Zellen hergestellt (Mammano *et al.*, 1997; Indraccolo *et al.*, 1998; Lodge *et al.*, 1998 und Höhne *et al.*, 1999). Möglicherweise wirken die lentiviralen Hüllproteine in einer bestimmten Konzentration zytotoxisch auf die exprimierenden Zellen. Hill *et al.* (1993) haben gezeigt, daß gp120-SU von HIV-1 einen starken zytotoxischen Effekt auf Neuronen *in vitro* hat. Die zur Etablierung der stabilen Verpackungszelllinien verwendete TELCeB6-Linie ist von einem Tumor des Rückenmarks abgeleitet. Vielleicht besteht hier ein Zusammenhang zu den Problemen bei der Generierung von stabilen Verpackungszelllinien. Die Verwendung induzierbarer Expressionssysteme, wie sie für die rein

lentiviralen Vektoren eingesetzt werden (Kafri *et al.*, 1999), könnten eventuell zur Produktion hochtitriger Vektorstocks von Vorteil sein.

Mit Hilfe der vorliegenden stabilen Verpackungszelllinien konnte erstmals die Inkorporation der SIVagm-Hüllproteine in die Kapsidpartikel des MLV gezeigt werden. Stitz *et al.* (2000a) spekulierten, daß ein starkes "shedding" (Spies *et al.*, 1993) der Oberflächenhüllproteine von SIVagm vorliegen müßte, da es ihnen nicht gelungen war, die Inkorporation in MLV-Partikel im Westernblot zu zeigen. Neben gp140-SU konnte in dieser Arbeit auch das um 135 Aminosäuren trunkeerte TM-Protein nachgewiesen werden. Die im Blot bestimmte Größe von ca. 29 kD entspricht dem erwarteten Molekulargewicht.

4.3 Konzentrierung von Pseudotypvektoren

Für die Verwendung der [MLV(SIVagm)]-Vektoren in späteren klinischen Anwendungen müssen große Vektormengen und hohe Titer routinemäßig herstellbar sein. Hierzu können die Überstände von etablierten Verpackungszellen noch konzentriert werden. Die Ultrafiltration eignete sich zur Anreicherung der Vektoren nur bedingt, da neben den Vektoren auch andere Bestandteile des Mediums angereichert wurden. Diese führten zu Schädigungen oder gar zu einem Wachstumsstillstand der transduzierten Zellen. Es konnten 38% der ursprünglich enthaltenen Vektoren nachgewiesen werden. Bei der Konzentrierung durch Ultrazentrifugation verliert man oft Infektiosität durch physikalische Schädigung der Partikel (Yee *et al.*, 1994). Die [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren erwiesen sich jedoch als stabil genug, um über Ultrazentrifugation konzentriert zu werden. Es wurden Wiedergewinnungsraten von ca. 43% erreicht. Die Ultrazentrifugation erwies sich deshalb gegenüber der Ultrafiltration, auch in Bezug auf die Handhabung und den Grad der Volumenreduktion, für die Konzentrierung der Pseudotypen als überlegen. In Einzelfällen konnten durch Ultrazentrifugation [MLV(SIVagm-wt)]-Vektorstocks mit Titern bis 10^8 i.E./ml hergestellt werden. Die Titer erreichen damit fast die Größenordnung der besonders stabilen [MLV(VSV)]-Pseudotypvektoren. Diese erzielten Titer von 10^9 i.E./ml bei einer Wiedergewinnungsrate von fast 95% (Yee *et al.*, 1994).

Die routinemäßige Produktion großer Mengen hochtitriger [MLV(SIVagm)]-Vektorstocks wird mit den vorliegenden Verpackungszellen wegen der geringen

Partikelzahl pro ml jedoch nicht mehr im Labormaßstab zu bewältigen sein. Für die Produktion von Vektoren im "Large scale" -Maßstab stehen spezielle Bioreaktoren zur Verfügung. Hier können die Verpackungszellen auf geeigneten Trägermaterialien in Suspension angezüchtet und der vektorhaltige Überstand in großen Mengen geerntet werden (Pan *et al.*, 1999; Pizzato *et al.*, 2001). Falls der Titer dadurch weiter gesteigert werden kann, könnte eventuell die verlustreiche Konzentrierung durch Ultrazentrifugation sich erübrigen.

4.4 Neutralisierungsresistenz der [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren gegenüber HIV-1-spezifischen Antikörpern

Schon wenige Wochen nach HIV-Exposition sind im Blut von infizierten Individuen virusspezifische Antikörper nachweisbar, die sich hauptsächlich gegen die Strukturproteine Gag und Env richten (Graham *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1994). Unter den gebildeten Antikörpern befinden sich auch neutralisierende Antikörper. Env-spezifische Antikörper mit neutralisierender Aktivität erkennen in der Regel konservierte oder variable Epitope in der Nähe der Rezeptorbinderegionen (Wyatt *et al.*, 1998). Man unterscheidet zwischen Antikörpern, die direkt die Bindung von CD4 blockieren, und Antikörpern, die nach der Bindung von CD4 und der anschließenden Konformationsänderung im gp120-SU die Bindung des Korezeptors verhindern. Die variable V3-Region des HIV-1 Env ist für die Bildung von gp120-SU Isolat-spezifischen Antikörpern verantwortlich (Sattentau *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 1997). Die Insertion des V3-Loops von HIV-1 Env in SIVagm Env hätte also dazu führen können, daß die resultierenden [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren wie die [MLV(HIV-X4)]-Vektoren durch HIV-1-spezifische Antikörper neutralisiert werden. Das Neutralisierungsexperiment zeigte jedoch, daß die [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren immer noch resistent sind. Möglicherweise liegt das inserierte HIV-1 V3-Loop-Peptid in einer anderen Konformation als im HIV-1 Env vor und entgeht so der Erkennung durch die vorhandenen neutralisierenden Antikörper. Diese erkennen wahrscheinlich nicht das lineare V3-Loop-Peptid, sondern richten sich gegen räumliche Epitope.

Die Seren HIV-1 infizierter Spender reduzierten den Titer der [MLV(MLV-A)]-Vektoren im Vergleich zu den Seren nicht infizierter Spender um 22%. Diese unspezifische Neutralisierung kann nur durch eine allgemein größere Reaktivität der Seren HIV-1-Infizierter erklärt werden. Die Neutralisierung der [MLV(SIVagm-wt)]- und der neu entwickelten [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren war sogar etwas geringer als die der

[MLV(MLV-A)]-Vektoren (19% und 6%). Der Unterschied liegt im Bereich der Standardabweichung. Damit sind die [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren auch nach der Insertion des HIV-1 V3-Loops für eine Anwendung in HIV-1 positiven Patienten geeignet. Um die Sensitivität der [MLV(SIVagm-wt)]- bzw. der [MLV(SIVagm-X4)]-Pseudotypvektoren besser beurteilen zu können, müßten die Neutralisierungsexperimente mit einer größeren Anzahl an HIV-positiven Seren durchgeführt werden. Denkbar wäre auch eine individuelle Prüfung der Seren der jeweiligen Patienten vor einer geplanten Therapie.

4.5 Gentransfer in humane periphere Blutlymphozyten

Bei der Transduktion adhärenter Zellen durch [MLV(SIVagm)]- oder [MLV(HIV)]-Pseudotypvektoren wurde im Gegensatz zu [MLV(MLV-A)]-Vektoren bei hoher MOI die Bildung von Synzytien zwischen den Transduktanden beobachtet. Für eine klinische Anwendung der Vektoren sind Synzytien nicht erwünscht. Da es jedoch bei der Transduktion der in Suspension kultivierten T-Zelllinien Molt4/8 und A3.01/CCR5 und bei der Anwendung der Vektoren auf ihren späteren Zielzellen, nämlich auf humanen peripheren Blutlymphozyten, nicht zur Synzytienbildung kam, stellt dieses Phänomen für eine spätere *In-vivo*-Anwendung kein Problem dar.

Für die Analyse des Gentransfers in humane periphere Blutlymphozyten wurden Pseudotypvektoren verwendet, die anstelle des *lacZ*-Gens das *egfp*-Gen transferierten. Mittels dieser Vektoren gelang es, eine schnelle und zeitgleiche Analyse der transduzierten Zellpopulation und ihrer Rezeptorexpression zu erstellen. Zugunsten der durchflußzytometrischen Analyse wurden die niedrigen Titer transient hergestellter Vektoren in Kauf genommen. Der Vektortiter aus transientscher Produktion ist von der jeweiligen Transfektionseffizienz, dem jeweiligen Env-Expressionskonstrukt (Promotorstärke) und der allgemeinen Fähigkeit der unterschiedlichen Hüllproteine zur Pseudotypisierung von MLV abhängig. Er wurde parallel zur PBMC-Transduktion auf der humanen T-Zelllinie Molt4/8 bestimmt. Nachträglich hat sich die Wahl der Referenzlinie Molt4/8 zur Titration der CCR5-gängigen Vektoren als ungünstig herausgestellt. Da sie nur sehr gering CCR5 exprimiert, ist sie zur Titration CCR5-gängiger Vektoren nicht geeignet.

Die Transduktionen wurden nach einem in unserer Arbeitsgruppe optimiertem PBL-Transduktionsprotokoll auf Retronektin-beschichteten Platten, unter Zentrifugation, in

drei aufeinanderfolgenden Transduktionsrunden und in Gegenwart von autologem Plasma durchgeführt (Schmitt *et al.*, in Vorbereitung). Durch diese Optimierungen war die Transduktionsrate auf PBLs erheblich steigerbar.

4.5.1 CD4-spezifische Transduktion

Es wurde die erfolgreiche Transduktion von humanen PBLs dreier Donoren mit [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Pseudotypvektoren gezeigt. Die [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren transduzierten zwischen 8,3% und 22,2% der CD4-positiven Zellen, [MLV(SIVagm-wt)] zwischen 16,7% und 32,4%. Die erzielten Transduktionseffizienzen waren bedeutend höher als die von Indraccolo *et al.* (1998) mit [MLV(SIVmac)]-Pseudotypvektoren erzielten Ergebnisse. Diese hatten in Kokulturrexperimenten zwischen Verpackungszellen und PBLs die Transduktion von 1-2% der CD4-positiven Lymphozyten gezeigt.

Die durchflußzytometrische Analyse der transduzierten Zellen bestätigte die strikte CD4-Spezifität der Pseudotypvektoren im Zell-Gemisch. Die [MLV(MLV-A)]-Vektoren transduzierten dagegen zwischen 14,2 und 25,7% der CD4-positiven und der CD4-negativen Zellen.

Die Effizienz verschiedener Pseudotypvektoren kann nur nach Transduktion mit identischen MOIs verglichen werden. Da hier aufgrund der transienten Herstellung der Vektoren keine identischen MOIs eingesetzt werden konnten, konnten die Ergebnisse nicht direkt in Bezug gesetzt werden. Aus den Titern der drei einzelnen Transduktionen wurde die insgesamt zur Transduktion eingesetzte Partikelzahl berechnet und in Bezug zur Zellzahl gesetzt (MOI). Unter der Annahme eines linearen Zusammenhanges zwischen sich ergebender MOI und der erfolgten Transduktion wurde versucht, die Effizienz der einzelnen Pseudotypen miteinander zu vergleichen. Da für die CCR5-gängigen Vektoren kein Titer bestimmt werden konnte, wurden die [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(HIV-R5)]-Vektoren nicht mit einbezogen. Nach diesen theoretischen Berechnungen erwiesen sich die [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren (im Mittel 15%) bei einer theoretischen MOI von 1 den amphotropen Vektoren (im Mittel 6%) überlegen. Die [MLV(HIV-X4)]-Pseudotypen erzielten die beste Transduktionseffizienz (im Mittel 30%). Die Werte können jedoch nur als Tendenz gesehen werden. Für einen realen Vergleich müßte die Transduktion mit vortitrierten Vektorstocks und festgelegten identischen MOIs durchgeführt werden. Das Problem zu niedriger Titer könnte durch die Verwendung von stabilen Verpackungszelllinien für die *egfp*-

transferierenden Pseudotypvektoren ausgeglichen werden. Solche Linien sind für [MLV(SIVagm-wt)]- und [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren noch zu etablieren, für die [MLV(HIV-X4)]- und [MLV(HIV-R5)]-Vektoren existieren sie bereits (Schmitt *et al.*, in Vorbereitung). Sie erreichen einen Titer von 2×10^5 i.E./ml auf CD4-positiven T-Zellen.

4.5.2 Korezeptorspezifität der Vektoren

Die Korezeptorspezifität der eingesetzten Pseudotypvektoren spiegelte sich im Unterschied zur CD4-Spezifität in den transduzierten Zellen nicht wieder. Allerdings entspricht die drei Tage nach der letzten Transduktion, also sechs Tage nach der ersten Transduktion gemessene Expression der Korezeptoren nicht mehr der Ausgangssituation am jeweiligen Transduktionstag. Es ist bereits bekannt, daß die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 im Gegensatz zur konstitutiven CD4-Expression stark reguliert wird (Bleul *et al.*, 1997; Weissman *et al.*, 2000). Durchflußzytometrische Analysen bestätigten die Fluktuation des Expressionsmusters der Chemokinrezeptoren auf PBLs zwischen Vollblutanalyse, nach unterschiedlichen Stimulierungsbedingungen und Kultivierungszeiten, bzw. allein durch die Transduktionsprozedur (Daten nicht gezeigt). Wang *et al.* (1998) und Chenine *et al.* (2000) haben außerdem die Internalisierung von CCR5 und CXCR4 nach der Bindung an HIV-1 Env beschrieben. Möglicherweise dauert dieser Effekt nach Transduktion durch [MLV(SIVagm)]- bzw. [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren noch bis zum Tag der durchflußzytometrischen Auswertung an und verschiebt so das ursprüngliche Korezeptorexpressionsmuster.

Obwohl die Korezeptorspezifität der Pseudotypen nach der Transduktion der PBL nicht gezeigt werden konnte, ist aufgrund der Ergebnisse mit den stabilen GHOST-Linien von einer korezeptorspezifischen Transduktion der PBLs auszugehen.

Neben den [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren steht nun mit der Entwicklung der [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren ein gutes Vektorsystem zur Transduktion CD4-positiver T-Lymphozyten in Gegenwart von HIV-1-spezifischen Antikörpern zur Verfügung. [MLV(SIVagm-X4)] ist zudem in der Lage die größere Population an CD4/CXCR4-positiven Zellen innerhalb der primären Blutlymphozyten zu transduzieren und ist prinzipiell zur Anwendung in HIV-1-infizierten Patienten geeignet. Die Verwendung von MLV-abgeleiteten Vektoren hat jedoch allgemein den großen Nachteil, daß nur sich teilende Zellen transduziert werden können. *In vivo* befindet sich der größte Anteil humaner CD4-positiver Zellen in Ruhe. Die Kombination der SIVagm-X4 Env-Variante

mit einem lentiviralen Vektor wäre hier sinnvoll. Bei der Verwendung komplett von SIVagm₃-abgeleiteter Vektoren würde der gentherapeutische Einsatz als weniger bedenklich angesehen werden als die Verwendung von Vektoren, die vollständig von HIV abgeleitet sind, da SIVagm₃ als apathogen gilt (Baier *et al.*, 1989). In diesem Fall ist allerdings die Frage der Sicherheit von Vektoren, die fast vollständig von einem Virus abgeleitet sind, im Hinblick auf die Rekombinationsfähigkeit zu erneut replikationskompetenten Viren zu untersuchen.

4.6 Die Sicherheit von [MLV(SIVagm)]- und [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren

Neben der Verbesserung der Effizienz ist die Sicherheit neuer Vektorsysteme von entscheidender Bedeutung. Pseudotypvektoren gelten als relativ sicher, da nur geringe Sequenzhomologien für eine Rekombination zu einem erneut replikationskompetenten Retrovirus (RCR) bestehen. Sollte es in Verpackungszellen zu einer Rekombination zwischen Anteilen verschiedener Virustypen kommen, so ist die Replikationsfähigkeit eines daraus resultierenden Hybridvirus unklar. Bisher ist keine natürlich aufgetretene Rekombination zwischen C-Typ-Viren und Lentiviren nachgewiesen worden.

Im Hinblick auf die mögliche Rekombination von lentiviralen Vektoren und Fremdhüllproteinsequenzen hat die Gruppe um Klaus Überla im Genom von SIVmac₂₃₉ das SIV *env*-Gen gegen das *env*-Gen des amphotropen MLV (4070A) ausgetauscht (Reiprich *et al.*, 1997). Dieser Ansatz führte zur Generation eines replikationskompetenten Hybridvirus, dessen Tropismus auf CD4-negative Zellen erweitert ist. Es kann unter *In-vitro*-Bedingungen auf PBMC zu höheren Virustitern replizieren als das Ausgangsvirus.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Unterschied zum Ansatz von Reiprich *et al.* ein MLV mit dem Hüllprotein von SIVagm bzw. HIV-1 konstruiert. Mit der Klonierung der MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-1 Hybridviren, wie sie in den Verpackungszellen für die entsprechenden Pseudotypvektoren entstehen könnten, sollte getestet werden, ob die Replikation eines solchen Hybridvirus prinzipiell möglich ist. Um möglichst nah an einer tatsächlich möglichen Rekombination zu bleiben, wurden für die Konstruktion der Hybridviren nur Sequenzen der wirklich in den vorliegenden Verpackungszellen enthaltenen Konstrukte verwendet. Sollten sich die konstruierten Hybridviren als replikativ erweisen, sollte ihre Pathogenität untersucht werden.

4.7 Proteinexpression der Hybridviren

Die Hybridviren wurden nach Transfektion in 293T-Zellen in verschiedenen Tests auf die Bildung und Funktionalität der einzelnen kodierten viralen Proteine untersucht. Die Überstände beider Hybridviren wiesen Reverse Transkriptase-Aktivität auf. Im *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay wurde die Expression von MLVp30Gag und SIVagm bzw. HIV-1 Env nachgewiesen. Es zeigte sich, daß die lentiviralen Hüllproteine nach Insertion in das MLV-Genom transkribiert und translatiert werden. Die Hüllproteine wurden jedoch in einem wesentlich geringeren Anteil transfizierter Zellen nachgewiesen als das MLV Gag-Protein. HIV-1 Env wurde im Vergleich zu SIVagm Env in weniger Zellen der Kultur und in geringerer Expressionsstärke exprimiert.

Obwohl die Funktion von Rev bereits durch den serologischen Nachweis von Env bewiesen war, wurde durch einen weiteren funktionellen Test die Bildung und Funktion von HIV-1 Rev gezeigt. HIV-1 Rev unterstützte die Expression von SIVagm Env, das von einem Rev-defekten, jedoch RRE-positiven-Konstrukt kodiert wurde. SIVagm Rev aus dem MLV/SIVagm Hybridvirus unterstützte dagegen die Expression von HIV-1 Env von einem Rev-defekten, RRE-positiven Konstrukt nicht. Da nicht bekannt war, ob SIVagm Rev mit dem HIV-1 RRE wechselwirken kann, wäre nur ein positiver serologischer Nachweis von HIV-1 Env aussagekräftig gewesen. Die deutliche Expression von SIVagm Env nach Transfektion des MLV/SIVagm Hybridvirus in 293T-Zellen zeigt jedoch die Bildung von ausreichend funktionellem SIVagm Rev an. Wie es für andere SIV-Stämme bereits gezeigt wurde (Berchtold *et al.*, 1994), scheint keine Kreuzreaktivität des SIVagm Rev-Proteins mit dem HIV-1 RRE vorzuliegen. Insgesamt betrachtet werden demnach alle zur Replikation benötigten viralen Proteine durch die Hybridviren gebildet.

4.8 Möglicher Einfluß der SD- und SA-Sequenzen auf die Env-Expression

Eine mögliche Erklärung für die geringe Expression der inserierten lentiviralen Hüllproteine könnten die Spleißmuster für die Transkripte zur Produktion der Env-Proteine sein: Für die Bildung des SIVagm *env*-kodierenden Transkriptes muß der MLV-Spleißakzeptor vor dem SIVagm *rev*-Leseraster benutzt werden (Abb. 3.19A). Es kommt zur Bildung einer bicistronischen mRNA, und die Translation von Env steht in Konkurrenz zur Translation des nicht funktionellen Rev-Proteins (Transkript 2). Die Umgebung der Start-ATGs regelt das Verhältnis der Translation der beiden Proteine.

Dies entspricht in etwa der Situation im SIVagm Wildtypvirus. Hier werden mehrere bicistronische mRNAs für Rev und Env gebildet, die sich durch die Nutzung weiterer Spleißdonoren und Spleißakzeptoren geringfügig in den enthaltenen nicht zu translatierenden Sequenzbereichen unterscheiden (Reinhart *et al.*, 1996). Die Regulation und Bedeutung der unterschiedlichen Spleißvarianten ist bisher unbekannt.

Im MLV/HIV-1 Hybridvirus ist das Spleißen der mRNA durch den zusätzlichen Leserahmen des nur bei HIV vorkommenden Vpu-Proteins komplexer. Vpu ist mit für die Herabregulierung von CD4 auf der Oberfläche von infizierten Zellen verantwortlich, indem es zur Degradation von CD4/HIV-Env-Komplexen beiträgt (Chen *et al.*, 1993). Außerdem wirkt Vpu positiv auf die HIV-1-Partikelfreisetzung, es unterstützt den Transport der Gag-Proteine an die Zelloberfläche, dem Ort der Viruszusammensetzung (Deora *et al.*, 2000). Für die MLV/HIV-1 Hybridvirusbildung könnte es von Bedeutung sein, da es nicht nur die Freisetzung von HIV-1 Gag sondern auch von MLV Gag unterstützt (Göttlinger *et al.*, 1993).

Das *vpu*-Gen befindet sich zwischen dem ersten Exon des *rev*-Gens und dem HIV-1 *env*-Gen. Es entsteht eine polycistronische mRNA für Rev, Vpu und Env. Zur Translation von Env muß das dritte Start-ATG benutzt werden. Aufgrund der Daten von Schubert *et al.* (1999) könnte eine Mutation des Vpu-Startkodons die Translation von Env verstärken. Das von ihnen beschriebene HIV-1 Isolat AD8 trägt eine Mutation im Vpu-Startkodon und zeigt eine stärkere Env-Expression als die Vpu-exprimierende isogene Variante.

Transkript 4 der Hybridviren (Abb. 3.19) enthält kein RRE und würde wahrscheinlich zum größten Teil zu Transkript 3 weiterspleißt werden. Sollte es nicht gespleißt werden, könnte die Psi-positive, aber *env*-negative RNA in der transfizierten Zelle zwar verpackt werden, würde in der infizierten Zelle jedoch als replikationsdefektes Virus vorliegen.

Ob es zu einer Kombination von Spleißdonor- und Spleißakzeptorsequenzen beider Virentypen und damit zur Bildung der Transkripte 5 und 6 (Abb. 3.19) kommt ist unklar. Von Transkript 5 kann kein funktionelles Protein translatiert werden, da kein reguläres Start-ATG vorhanden ist.

Möglicherweise ist das Spleißmuster also nicht optimal für die Expression der viralen Gene. Es ist sicherlich auch nicht zu erwarten, daß nach Zusammenfügung zweier Viren unterschiedlicher Genera die RNA-Prozessierung gleich gut funktioniert wie in

einem Wildtypvirus. Da die viralen Strukturgene und auch das *rev*-Gen, wenn auch in unterschiedlichen Mengenverhältnissen, funktionell exprimiert werden, sollten prinzipiell replikationsfähige MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-1 Hybridviren gebildet werden können. Die prinzipielle Möglichkeit der Pseudotypisierung von MLV mit SIVagm bzw. HIV-1 Env ist durch die Pseudotypvektoren ja bereits gezeigt worden.

4.9 Replikationskompetenz der Hybridviren

Nachdem Expression und Funktionalität der viralen Proteine bestätigt waren, wurde durch Verpackung eines MLV-Transfervektors und anschließender Transduktion von Zielzellen die Bildung infektiöser Hybridviruspartikel analysiert. Nur MLV/SIVagm war in der Lage, den MLV-Transfervektor zu verpacken und korezeptorspezifisch Zielzellen zu transduzieren.

Um die Replikationskompetenz der Hybridviren zu überprüfen, wurden die Korezeptor-exprimierenden GHOST-Linien mit Überstand der Hybridvirus-transfizierten 293T-Zellen infiziert und nach einer Woche der Überstand dieser Kulturen auf eine weitere Generation GHOST-Zellen übertragen. Die Analyse des Infektionsverlaufs wurde in drei verschiedenen Assays untersucht. Es wurden übereinstimmende Ergebnisse erhalten: MLV/SIV kann zwar in einer Art "*single-round*"-Infektion sein Genom auf eine erste Generation von Zielzellen übertragen, in denen das Genom auch exprimiert wird, ist aber nicht in der Lage, wie ein replikationskompetentes Virus erneut infektiöse Partikel zu bilden und eine weitere Zellgeneration zu infizieren. IPA und RT-Analyse zeigten eine korezeptorspezifische Infektion der ersten GHOST-Zellgeneration.

MLV/HIV-1 kann sein Genom ebenfalls in die erste Zellgeneration übertragen, was allerdings nur über PCR nachgewiesen werden konnte. Die schwache PCR-Bande trotz hoher Amplifikationsrate deutet auf eine sehr geringe Provirusmenge hin. Da nur in CXCR4-positiven Zellen das Provirusgenom nachgewiesen wurde, beweist dies die tatsächliche Infektion dieser Zellen. Bei einem Nachweis von übertragener DNA aus den Überständen der 293T-Transfektanden wäre auch in den CCR5-positiven Zellen ein Signal sichtbar.

Für MLV/HIV-1 war keine Replikation zu erwarten, da die Verpackung des Transfervektors und anschließende Transduktion von Zielzellen nicht zu einem positiven Ergebnis geführt hatte. Für MLV/SIVagm ist dagegen unverständlich, warum

keine Replikation erfolgen kann. MLV/SIVagm ist zwar in der Lage eine erste Zielzellgeneration effektiv zu infizieren, es findet jedoch keine erneute Infektion einer weiteren Generation statt. Möglich ist, daß die vom integrierten Provirus der ersten infizierten Zellgeneration gebildete Menge an lentiviralem Hüllprotein für eine erneute Partikelbildung nicht ausreichend ist. Dieses Problem tritt eventuell in transfizierten Zellen nicht auf, da durch die Transfektion eine Vielzahl des Konstruktes pro Zelle vorliegt und die kodierten Proteine in entsprechend größerer Menge exprimiert werden. Es könnte ein bestimmter Schwellenwert an Hüllprotein auf der Oberfläche der Zelle zur Partikelbildung benötigt werden. Im Milz-Nekrose-Virus ("*spleen necrosis virus*" - SNV)-System gelang die Produktion infektiöser Vektoren mit Wildtyp-SNV Env und einem T-Zellspezifischen scFv ausschließlich in stabilen Linien (Engelstädter *et al.*, 2000). Hier wurde spekuliert, daß ein ganz bestimmtes Verhältnis von Kapsidprotein zu Wildtyp-SNV Env und scFv notwendig ist, um infektiöse Partikel zu erhalten, welches bei transientscher Herstellung nicht gegeben ist.

Um auszuschließen, daß in den von humanen Osteosarkom-Zellen abgeleiteten GHOST-Zellen ein Replikationsblock besteht, wurde die CD4-positive T-Zelllinie Molt4/8 mit den Hybridviren infiziert. Von dieser Linie ist bekannt, daß sie sich gut zur Anzucht von HIV-1 und SIVagm eignet. Weder für MLV/SIVagm noch MLV/HIV-1 konnte nach Infektion ein Anstieg der RT-Aktivität gemessen werden. Das amphotropes MLV konnte dagegen uneingeschränkt replizieren. Beide Proviren wurden jedoch mittels PCR nachgewiesen. Es handelt sich um keinen Zelltyp-spezifischen Replikationsblock, sondern um einen Zelltyp-unabhängigen Replikationsdefekt der Hybridviren.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die fehlende Replikationskompetenz der Hybridviren könnten Probleme bei der Verpackung der verlängerten genomischen RNAs sein. Das Hybridvirusgenom ist um ca. 0,8 bis 1 kb größer als das Wildtyp-MLV Genom. Sollte dies der Fall sein, so könnte nicht einmal die Infektion einer ersten Zielzellgeneration stattfinden. MLV/SIVagm ist jedoch eindeutig in der Lage eine "*single-round*"-Infektion durchzuführen. Dagegen spricht auch die Arbeit von Shin *et al.* (2000). Diese zeigt, daß für MLV kein Verpackungskapazitätslimit existiert und die Effizienz der Verpackung größerer Genome im Vergleich zum Wildtyp-Genom lediglich herabgesetzt ist. Es ist deshalb eher unwahrscheinlich, daß ein eventuelles Überschreiten der Verpackungskapazität die Ursache für die fehlende Replikationskompetenz ist.

4.10 Sind [MLV(SIVagm)]- bzw. [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren sicher?

Bisher wurde keine spontane Bildung von RCRs durch Rekombination von MLV und SIVagm bzw. HIV-1 beobachtet. Nun ist es auch nicht gelungen, durch molekulare Klonierung replikationskompetente Hybridviren zu generieren. Offensichtlich ist die Bildung von MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-1-Hybridviren unwahrscheinlich. Die vorhandenen Pseudotypvektoren können deshalb in Bezug auf die Gefahr, die von einem RCR ausgeht, als "relativ sicher" angesehen werden.

Es ist jedoch darüber nachzudenken, ob bei einer Veränderung der in den Verpackungszellen enthaltenen Konstrukte erneut eine Überprüfung der Replikationskompetenz möglicher Hybridviren durchgeführt werden muß. Sollte zum Beispiel ein Rev-unabhängiges lentivirales Hüllproteinkonstrukt durch die Verwendung des CTE ("*constitutive transport element*") des Simianen Retrovirus (SRV-1; Zolotukhin *et al.*, 1994) eingebracht werden, so könnten die im Moment vorhandenen Probleme der Spleißung und Translation zwischen *rev* und *env*-Genen wegfallen und eventuell zur Replikationskompetenz der Hybridviren führen.

Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß durch weitere Modifikationen RCRs gebildet werden könnten. Deshalb ist die Überprüfung der Verpackungszellen und der Vektorstocks vor dem klinischen Einsatz dringend erforderlich. Der PCR-Nachweis von RCRs (Allan *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1999) ist insofern schwierig, da mit festgelegten Primerkombinationen nicht alle möglichen Rekombinationen zwischen viralen Genen und eventuellen endogenen Genen nachweisbar sind. Deshalb ist die Überprüfung von Vektorstocks in sogenannten "Rescuetests" auf speziell etablierten Indikatorlinien sinnvoll (Chen *et al.*, 2001).

4.11 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind sichere CD4- und korezeptorspezifisch transduzierende Vektoren entwickelt worden, die speziell für den *In-vivo*-Einsatz gedacht sind. Bisher wurden sie jedoch nur in *In vitro*-Experimenten charakterisiert. Vor ihrem Einsatz in der Gentherapie am Menschen müssen die Vektoren im Tierversuch getestet werden. Dafür eignen sich z.B. transgene Mäuse, die stabil humanes CD4 und die humanen Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5 tragen (Sawada *et al.*, 1998; LaCasse *et al.*, 1999). Sie werden durch einen vorgesetzten

CD4-Promotor nur in den CD4-positiven Zellen des murinen Blutsystems exprimiert, was der Situation im Menschen nahe kommt. An diesen Mäusen kann der geeignetste Applikationsweg, verschiedene Titerdosen, die Spezifität der Vektoren *in vivo*, die Neutralisierung durch das Komplementsystem, sowie Probleme bei wiederholter Vektorgabe untersucht werden. Zusätzlich kann die eventuelle Bildung replikationskompetenter Retroviren *in vivo* untersucht werden. Sollte es durch neue Klonierungsstrategien gelingen, doch noch replikationskompetente Hybridviren des Typs MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-1 zu entwickeln, kann ihr Replikationsvermögen und ihre Pathogenität in diesem Mausmodell untersucht werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Entwicklung und Charakterisierung von [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren

Für eine zukünftige Gentherapie der Immunschwächekrankheit AIDS ist ein effizienter, spezifischer und sicherer Gentransfer in CD4-positive Zellen des peripheren Blutes erforderlich. Hierzu bieten sich vom murinen Leukämievirus (MLV) abgeleitete retrovirale Pseudotypvektoren an, die das Hüllprotein (Env) des HIV-1 oder des simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (SIVagm) tragen und daher einen selektiven Gentransfer in CD4-positive Zielzellen bewirken (Transduktion).

[MLV(SIVagm)]-Vektoren haben gegenüber [MLV(HIV-1)]-Vektoren den Vorteil, daß sie von Seren HIV-1-positiver Patienten nicht neutralisiert werden und daher auch in HIV-1-infizierten Patienten angewendet werden könnten. Jedoch kann aufgrund des Tropismus von SIVagm mit [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren nur die kleine Subpopulation der CCR5-positiven Zellen innerhalb der humanen CD4-positiven Lymphozyten (3 bis 15%) transduziert werden. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, den Tropismus des SIVagm Env so zu modifizieren, daß auch die Mehrzahl der CD4-positiven Lymphozyten, die den CXCR4-Korezeptor exprimieren (70 bis 95%), transduziert werden kann. Hierzu wurde die putativ für die Korezeptorbindung verantwortliche V3-Loop-Region im Env des SIVagm durch die homologe Region eines CXCR4-tropen HIV-1-Stammes ersetzt. Mit diesem modifizierten Env gelang es, [MLV(SIVagm-X4)]-Pseudotypvektoren herzustellen, die spezifisch CD4/CXCR4-positive Zellen transduzieren können. Neben der Bedeutung für die Generation neuer Vektoren für die Gentherapie beweist dieses Ergebnis die bisher nicht gezeigte Äquivalenz der V3-Loops der Hüllproteine von HIV-1 und SIVagm für die Korezeptornutzung.

Um die neuen [MLV(SIVagm)]-Vektoren charakterisieren zu können und für eine spätere Anwendung weiterzuentwickeln, wurden stabile Zelllinien etabliert, die große Vektormengen mit Titern zwischen 6×10^3 und $7,6 \times 10^5$ i.E./ml produzierten. Mittels Ultrazentrifugation konnten Vektorpräparationen mit Titern bis zu 10^8 i.E./ml hergestellt werden. Die neu generierten [MLV(SIVagm-X4)]-Vektoren erwiesen sich wie die [MLV(SIVagm-wt)]-Vektoren als resistent gegenüber der Neutralisierung durch Seren HIV-1-infizierter Spender und könnten damit *in vivo* angewendet werden.

In Experimenten zur Bestimmung der Transduktionseffizienz in primären peripheren Blutlymphozyten humaner Spender konnte der selektive Gentransfer mittels [MLV(SIVagm)]-Vektoren in CD4-positive Zellen gezeigt werden, während

herkömmliche, amphotrope Vektoren CD4-positive und -negative Lymphozyten gleichermaßen transduzierten. Beide [MLV(SIVagm)]-Vektoren erlaubten im Vergleich zu den eingesetzten amphotropen MLV-Vektoren eine höhere Transduktionseffizienz in CD4-positiven Zellen.

5.2 Konstruktion von MLV/SIVagm bzw. MLV/HIV-1-Hybridviren

Neben Zielzell-Spezifität und Effizienz ist die Sicherheit neuer Vektorsysteme entscheidend für die Anwendbarkeit in der humanen Gentherapie. Eine Übertragung replikationskompetenter Retroviren (RCR) gilt hierbei als das Hauptrisiko bei der Nutzung retroviraler Vektoren. Auch bei der Herstellung von [MLV(HIV-1)]- oder [MLV(SIVagm)]-Pseudotypvektoren könnten durch Rekombinationsereignisse in den Verpackungszellen replikationsfähige Hybridviren entstehen. Bei der Untersuchung dieser Vektorsysteme wurde allerdings bisher keine spontane Bildung von RCR nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch molekulare Klonierung gezielt derartige Hybridviren zu generieren, um zu klären, ob solche Onko/Lenti-Hybridviren replikationsfähig sein können, zudem sollte gegebenenfalls das pathogene Potential dieser Viren untersucht werden. Dazu wurden die vollständigen Leserahmen des *rev*- und des *env*-Gens des HIV-1 bzw. SIVagm anstelle des MLV *env*-Gens in das Genom eines infektiösen molekularen Klon des MLV inseriert. Die Klonierungsstrategie wurde dabei so gewählt, daß alle notwendigen mRNAs gebildet werden konnten. Die Hybridvirusklone waren nach Transfektion in 293T-Zellen tatsächlich in der Lage, neben den MLV-Genen auch HIV-1 bzw. SIVagm *env* und *rev* funktionell zu exprimieren. Es konnten infektiöse Partikel nachgewiesen werden, die das Hybridvirusgenom auf Zielzellen übertragen konnten. In den infizierten Zielzellen wurde jedoch nur die Expression von MLV/SIVagm nachgewiesen werden. Keines der beiden Hybridviren erwies sich als replikationskompetent. Dies deutet darauf hin, daß die Bildung replikationskompetenter Onko/Lenti-Hybridviren unwahrscheinlich ist.

Mit den [MLV(SIVagm)]-Vektoren steht somit ein Vektorsystem zur Verfügung, das sich für *In-vivo*-Anwendungen im HIV-infizierten Patienten eignet. Es konnte gezeigt werden, daß humane CD4-positive Lymphozyten mittels [MLV(SIVagm)]-Vektoren spezifisch, aber auch effizienter und sicherer transduziert werden als unter Verwendung bisher beschriebener amphotroper MLV-Vektoren.

6 Literatur

A

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

AKKINA, R.K., WALTON, R.M., CHEN, M.L., LI, Q.X., PLANELLES, V., AND CHEN, I.S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J. Virol.* **70**, 2581-5.

ALKHATIB, G., COMBADIÈRE, C., BRODER, C.C., FENG, Y., KENNEDY, P.E., MURPHY, P.M., AND BERGER, E.A. (1996). CC CKR5: A RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-8.

ALLAN, D.S., DE KOVEN, A., WILD, A., KAMEL-REID, S., AND DUBE, I.D. (1996). Endogenous murine leukemia virus DNA sequences in murine cell lines: implications for gene therapy safety testing by PCR. *Leuk. Lymphoma* **23**, 375-381.

ALMOND, N., JENKINS, A., SLADE, A., HEATH, A., CRANAGE, M., AND KITCHIN, P. (1992). Population sequence analysis of a simian immunodeficiency virus (32H reisolate of SIVmac251): a virus stock used for international vaccine studies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**, 77-88.

ANAZODO, M.I., SALOMON, H., FRIESEN, A.D., WAINBERG, M.A., AND WRIGHT, J.A. (1995). Antiviral activity and protection of cells against human immunodeficiency virus type-1 using an antisense oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate complementary to the 5'-LTR region of the viral genome. *Gene* **166**, 227-32.

B

BAIER, M., WERNER, A., CICHUTEK, K., GARBER, C., MÜLLER, C., KRAUS, G., FERDINAND, F.J., HARTUNG, S., PAPAS, T.S., AND KURTH, R. (1989). Molecularly cloned simian immunodeficiency virus SIVagm3 is highly divergent from other SIVagm isolates and is biologically active in vitro and in vivo. *J. Virol.* **63**, 5119-5123.

BAIER, M., GARBER, C., MULLER, C., CICHUTEK, K., AND KURTH, R. (1990). Complete nucleotide sequence of a simian immunodeficiency virus from African green monkeys: a novel type of intragroup divergence. *Virology* **176**, 216-221.

BARRE-SINOUSSE F. (1996). HIV as the cause of AIDS. *Lancet* **348**, 31-5.

BELL, E.J., AND BRICKELL, P.M. (1997). Replication-competent retroviral vectors for expressing genes in avian cells in vitro and in vivo. *Mol. Biotechnol.* **7**, 289-98.

BERCHTOLD, S., RIES, J., HORNUNG, U., AND AEPINUS, C. (1994). Exchange of functional domains between Rev proteins of HIV-1 and SIVmac239 results in a dominant negative phenotype. *Virology* **204**, 436-41.

BERGER, E.A., MURPHY, P.M., AND FARBER, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 57-700.

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

BLEUL, C.C., WU, L., HOXIE, J.A., SPRINGER, T.A., AND MACKAY, C.R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1925-30.

BUCHHOLZ, C.J., STITZ, J., AND CICHUTEK, K. (1999). Retroviral cell targeting vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1**, 613-21.

BURNS, J.C., FRIEDMANN, T., DRIEVER, W., BURRASCANO, M., AND YEE, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8033-7.

BURTON, D.R., AND MONTEFIORI, D.C. (1997). The antibody response in HIV-1 infection. *AIDS* **11**, Suppl. A, 87-98.

C

CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., YATES, F., DE VILLARTAY, J.P., LE DEIST, F., AND FISCHER, A. (2001). Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J. Gene Med.* **3**, 201-6.

CHAN, D.C., FASS, D., BERGER, J.M., AND KIM, P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-73.

CHEN, J., REEVES, L., SANBURN, N., CROOP, J., WILLIAMS, D.A., AND CORNETTA, K. (2001). Packaging cell line DNA contamination of vector supernatants: implication for laboratory and clinical research. *Virology* **282**, 186-97.

CHEN, M.Y., MALDARELLI, F., KARCZEWSKI, M.K., WILLEY, R.L., AND STREBEL, K. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: The cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *J. Virol.* **67**, 3877-3884.

CHEN, Z., ZHOU, P., HO, D.D., LANDAU, N.R., AND MARX, P.A. (1997). Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *J. Virol.* **71**, 2705-2714.

CHEN, Z., KWON, D., JIN, Z., MONARD, S., TELFER, P., JONES, M.S., LU, C.Y., AGUILAR, R.F., HO, D.D., AND MARX, P.A. (1998). Natural infection of a homozygous delta24 ccr5 red-capped mangabey with an r2b-tropic simian immunodeficiency virus. *J. Exp. Med.* **188**, 2057-65.

CHENG-MAYER, C., QUIROGA, M., TUNG, J.W., DINA, D., AND LEVY, J.A. (1990). Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 t-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J. Virol.* **64**, 4390-4398.

CHENINE, A.L., SATTENTAU, Q., AND MOULARD, M. (2001). Selective HIV-1-induced downmodulation of CD4 and coreceptors. *Arch. Virol.* **145**, 455-71.

CHOE, H., FARZAN, M., SUN, Y., SULLIVAN, N., ROLLINS, B., PONATH, P.D., WU, L., MACKAY, C.R., LAROSA, G., NEWMAN, W., GERARD, N., GERARD, C., AND SODORSKI, J. (1996). The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.

CHONG, H., AND VILE, R.G. (1996). Replication-competent retrovirus produced by a 'split-function' third generation amphotropic packaging cell line. *Gene Ther.* **3**, 624-9.

CHONG, H., STARKEY, W., AND VILE, R.G. (1998). A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences. *J. Virol.* **72**, 2663-70.

CHRISTODOULOPOULOS, I., AND CANNON, P.M. (2001). Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J. Virol.* **75**, 4129-38.

CHU, T.H., MARTINEZ, I., SHEAY, W.C., AND DORNBURG, R. (1994). Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody-envelope fusion proteins. *Gene Ther.* **1**, 292-9.

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

CONNOR, R.I., SHERIDAN, K.E., CERADINI, D., CHOE, S., AND LANDAU, N.R. (1997). Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* **185**, 621-8.

COSSET, F.-L., TACKEUCHI, Y., BATTINI, J.-L., WEISS, R.A., AND COLLINS, M.K.I. (1995). High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.* **69**, 7430-7436.

CULVER, K.W., OSBORNE, W.R., MILLER, A.D., FLEISHER, T.A., BERGER, M., ANDERSON, W.F., AND BLAESE, R.M. (1991). Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer. *Transplant Proc.* **23**, 170-171.

D

DANIEL, M.D., LI Y., NAIDU, Y.M., DURDA, P.J., SCHMIDT, D.K., TROUP, C.D., SILVA, D.P., MACKEY, J.J., KESTLER, H.W. 3RD, SEHGAL, P.K., ET AL. (1988). Simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *J. Virol.* **62**, 4123-8.

DE CLERCQ E. (1999). The emerging role of fusion inhibitors in HIV infection. *Drugs R. D.* **2**, 321-31.

DE JONG, J.J., DE RONDE, A., KEULEN, W., TERSMETTE, M., AND GOUDSMIT, J. (1992). Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J. Virol.* **66**, 6777-80.

DEJUCQ, N., SIMMONS, G., AND CLAPHAM, P.R. (1999). Expanded tropism of primary human immunodeficiency virus type 1 R5 strains to CD4(+) T-cell lines determined by the capacity to exploit low concentrations of CCR5. *J. Virol.* **73**, 7842-7847.

DENG, H.K., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHART, M., DIMARZIO, P., MARMON, S., SUTTON, R.E., HILL, C.M., DAVIS, C.B., PEIPER, S.C., SCHALL, T.J., LITTMAN, D.R., AND LANDAU, N.R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666.

DENG, H.K., UNUTMAZ, D., KEWAL-RAMANI, V.N., AND LITTMAN, D.R. (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296-300.

DEORA, A., SPEARMAN, P., AND RATNER, L. (2000). The N-terminal matrix domain of HIV-1 Gag is sufficient but not necessary for viral protein U-mediated enhancement of particle release through a membrane-targeting mechanism. *Virology* **269**, 305-312.

DOMS, R.W., AND PEIPER, S.C. (1997). Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* **235**, 179-90.

DONAHUE, R.E., KESSLER, S.W., BODINE, D., MCDONAGH, K., DUNBAR, C., GOODMAN, S., AGRICOLA, B., BYRNE, E., RAFFELD, M., MOEN, R., ET AL. (1992). Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* **176**, 1125-35.

DRAGIC, T., LITWIN, V., ALLAWAY, G.P., MARTIN, S.R., HUANG, Y., NAGASHIMA, K.A., CAYANAN, C., MADDON, P.J., KOUP, R.A., MOORE, J.P., AND PAXTON, W.A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-73.

DUMONCEAUX, J., NISOLE, S., CHANEL, C., QUIVET, L., AMARA, A., BALEUX, F., BRIAND, P., AND HAZAN, U. (1998). Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J. Virol.* **72**, 512-9.

E

EDINGER, A.L., MANKOWSKI, J.L., DORANZ, B.J., MARGULIES, B.J., LEE, B., RUCKER, J., SHARRON, M., HOFFMAN, T.L., BERSON, J.F., ZINK, M.C., HIRSCH, V.M., CLEMENTS, J.E., AND DOMS, R.W. (1997). CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14742-7.

EDINGER, A.L., HOFFMAN, T.L., SHARRON, M., LEE, B., O'DOWD, B., AND DOMS, R.W. (1998). Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* **249**, 367-378.

ENDRES, M.J., CLAPHAM, P.R., MARSH, M., AHUJA, M., TURNER, J.D., MCKNIGHT, A., THOMAS, J.F., STOEBAU-HAGGARTY, B., CHOE, S., VANCE, P.J., WELLS, T.N., POWER, C.A., SUTTERWALA, S.S., DOMS, R.W., LANDAU, N.R., AND HOXIE, J.A. (1996). CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**, 745-56.

ENGELSTÄDTER, M., BOBKOVA, M., BAIER, M., STITZ, J., HOLTkamp, N., CHU, T.H., KURTH, R., DORNBURG, R., BUCHHOLZ, C.J., AND CICHUTEK, K. (2000). Targeting human T cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. *Hum. Gene Ther.* **11**, 293-303.

F

FEHSE, B., SCHADE, U.M., ZHIXIONG, L., UHDE, A., KOCH, S., GOLLER, B., RÜGER, R., FEHSE, N., STOCKSCHLÄDER, M., AND ZANDER, A.R. (1998). Highly-efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin. *British Journal of Haematology* **102**, 566-574.

FENG, Y., BRODER, C.C., KENNEDY, P.E., AND BERGER, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-7.

FERRY, N., DUPLESSIS, O., HOUSSIN, D., DANOS, O., AND HEARD, J.M. (1991). Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8377-8381.

FOUCHIER, R.A., GROENINK, M., KOOTSTRA, N.A., TERSMETTE, M., HUISMAN, H.G., MIEDEMA, F., AND SCHUITMAKER, H. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* **66**, 3183-7.

G

GÖTTLINGER, H.G., DORFMAN, T., COHEN, E.A., AND HASELTINE, W.A. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7381-7385.

GRAHAM, B.S. (1994). Serological responses to candidate AIDS vaccines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10** Suppl. 2, 145-8.

H

HANENBERG, H., XIAO, X.L., DILLOO, D., HASHINO, K., KATO, I., AND WILLIAMS, D.A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* **2**, 876-82.

HILL, J.M., MERVIS, R.F., AVIDOR, R., MOODY, T.W., AND BRENNEMAN, D.E. (1993). HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates. *Brain Res.* **603**, 222-233.

HILL, C.M., DENG, H., UNUTMAZ, D., KEWALRAMANI, V.N., BASTIANI, L., GORNY, M.K., ZOLLA-PAZNER, S., AND LITTMAN, D.R. (1997). Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor. *J. Virol.* **71**, 6296-304.

HIRSCH, V.M., AND JOHNSON, P.R. (1994a). Pathogenic diversity of simian immunodeficiency viruses. *Virus Res.* **32**, 183-203.

HIRSCH, V.M., MARTIN, J.E., DAPOLITO, G., ELKINS, W.R., LONDON, W.T., GOLDSTEIN, S., AND JOHNSON, P.R. (1994b). Spontaneous substitutions in the vicinity of the V3 analog affect cell tropism and pathogenicity of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**, 2649-61.

HO, S.N., HUNT, H.D., HORTON, R.M., PULLEN, J.K., AND PEASE, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-9.

HOFFMAN, T., STEPHENS, E., NARAYAN, O., AND DOMS, R. (1998). HIV type 1 envelope determinants for use of the CCR2b, CCR3, STRL33, and APJ coreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 11360-11365.

HÖHNE, M., THALER, S., DUDDA, J.C., GRONER, B., AND SCHNIERLE, B.S. (1999). Truncation of the Immunodeficiency Virus-type-2 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Murine Leukemia Virus retroviral vector particles. *Virology* **261**, 70-78.

HORTON, R.M., HUNT, H.D., HO, S.N., PULLEN, J.K., AND PEASE, L.R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-68.

HOXIE, J.A., LABRANCHE, C.C., ENDRES, M.J., TURNER, J.D., BERSON, J.F., DOMS, R.W., AND MATTHEWS, T.J. (1998). CD4-independent utilization of the CXCR4 chemokine receptor by HIV-1 and HIV-2. *J. Reprod. Immunol.* **41**, 197-211.

HWANG, S.S., BOYLE, T.J., LYERLY, H.K., AND CULLEN, B.R. (1991). Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**, 71-74.

I

INDRACCOLO, S., MINUZZO, S., FEROLI, F., MAMMANO, F., CALDERAZZO, F., CHIECOBIANCHI, L., AND AMADORI, A. (1998). Pseudotyping of Moloney leukemia virus-based retroviral vectors with simian immunodeficiency virus envelope leads to targeted infection of human CD4⁺ lymphoid cells. *Gene Therapy* **5**, 209-217.

ISAKA, Y., SATO, A., MIKI, S., KAWAUCHI, S., SAKAIDA, H., HORI, T., UCHIYAMA, T., ADACHI, A., HAYAMI, M., FUJIWARA, T., AND YOSHIE, O. (1999). Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology* **264**, 237-43.

J

JANSSON, M., BACKSTROM, E., BJORNDAL, A., HOLMBERG, V., ROSSI, P., FENYO, E.M., POPOVIC, M., ALBERT, J., AND WIGZELL, H. (1999). Coreceptor usage and RANTES sensitivity of non-syncytium-inducing HIV-1 isolates obtained from patients with AIDS. *J. Hum. Virol.* **2**, 325-338.

JOHNSON, P.R., AND HIRSCH, V.M. (1992). Genetic variation of simian immunodeficiency viruses in nonhuman primates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**, 367-72.

K

KAFRI, T., VAN PRAAG, H., OUYANG, L., GAGE, F.H., AND VERMA, I.M. (1999). A packaging cell line for lentivirus vectors. *J. Virol.* **73**, 576-84.

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

KIM, J. W., CLOSS, E. I., ALBRITTON, L. M., AND CUNNINGHAM, J. M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* **352**, 725-728.

KIRCHHOFF, F., MORRISON, H.G., MURRAY, M.G., RENNERT, P., AND DESROSIERS, R.C. (1994). SIVmac expressing hybrid envelope proteins containing HIV-1 V3 and/or C4 sequences is not competent for replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**, 309-13.

KIRCHHOFF, F., POHLMANN, S., HAMACHER, M., MEANS, R.E., KRAUS, T., UBERLA, K., AND DI MARZIO, P. (1997). Simian immunodeficiency virus variants with differential T-cell and macrophage tropism use CCR5 and an unidentified cofactor expressed in CEMx174 cells for efficient entry. *J. Virol.* **71**, 6509-16.

KLEIN, R.S., WILLIAMS, K.C., ALVAREZ-HERNANDEZ, X., WESTMORELAND, S., FORCE, T., LACKNER, A.A., AND LUSTER, A.D. (1999). Chemokine receptor expression and signaling in macaque and human fetal neurons and astrocytes: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J. Immunol.* **163**, 1636-46.

KOITO, A., STAMATATOS, L., AND CHENG-MAYER, C. (1995). Small amino acid sequence changes within the V2 domain can affect the function of a T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120. *Virology* **206**, 878-84.

L

LABRANCHE, C.C., HOFFMAN, T.L., ROMANO, J., HAGGARTY, B.S., EDWARDS, T.G., MATTHEWS, T.J., DOMS, R.W., AND HOXIE, J.A. (1999). Determinants of CD4 independence for a human immunodeficiency virus type 1 variant map outside regions required for coreceptor specificity. *J. Virol.* **73**, 10310-9.

LACASSE, R.A., FOLLIS, K.E., TRAHEY, M., SCARBOROUGH, J.D., LITTMAN, D.R., AND NUNBERG, J.H. (1999). Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV. *Science* **283**, 357-362.

LAVI, E., KOLSON, D.L., ULRICH, A.M., FU, L., AND GONZALEZ-SCARANO, F. (1998). Chemokine receptors in the human brain and their relationship to HIV infection. *J. Neurovirol.* **4**, 301-11.

LEE, B., SHARRON, M., MONTANER, L.J., WEISSMAN, D., AND DOMS, R.W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5215-5220.

LINDEMANN, D., BOCK, M., SCHWEIZER, M., AND RETHWILM, A. (1997). Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J. Virol.* **71**, 4815-20.

LODGE, R., SUBBRAMANIAN, R.A., FORGET, J., LEMAY, G., AND COHEN, E.A. (1998). MuLV-based vectors pseudotyped with truncated HIV glycoproteins mediate specific gene transfer in CD4⁺ peripheral blood lymphocytes. *Gene Therapy* **5**, 655-664.

LONG, Z., LU, P., GROOMS, T., MYCHKOVSKY, I., WESTLEY, T., FITZGERALD, T., SHARMA-CHIBBER, S., SHAND, N., MCGARRITY, G., AND OTTO, E. (1999). Molecular evaluation of biopsy and autopsy specimens from patients receiving in vivo retroviral gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **10**, 733-740.

M

MAMMANO, F., SALVATORI, F., INDRACCOLO, S., DE ROSSI, A., CHIECO-BIANCHI, L., AND GÖTTLINGER, H. (1997). Truncation of the Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney Murine Leukemia Virus particles and gene transfer into CD4⁺ cells. *J. Virol.* **71**, 3341-3345.

MAMOUNAS, M., LOONEY, D.J., TALBOTT, R., AND WONG-STAAAL, F. (1995). An infectious chimeric human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) expressing the HIV-1 principal neutralizing determinant. *J. Virol.* **69**, 6424-9.

MANN, R., MULLIGAN, R. C., AND BALTIMORE, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**, 153-159.

MARCON, L., CHOE, H., MARTIN, K.A., FARZAN, M., PONATH, P.D., WU, L., NEWMAN, W., GERARD, N., GERARD, C., AND SODROSKI, J. (1997). Utilization of C-C chemokine receptor 5 by the envelope glycoproteins of a pathogenic simian immunodeficiency virus, SIVmac239. *J. Virol.* **71**, 2522-7.

MARKOWITZ, D., GOFF, S., AND BANK, A. (1988a). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* **62**, 1120-1124.

MARKOWITZ, D., GOFF, S., AND BANK, A. (1988b). Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* **167**, 400-406.

MARX, P.A., AND CHEN, Z. (1998). The function of simian chemokine receptors in the replication of SIV. *Semin. Immunol.* **10**, 215-23.

MCLACHLIN, J.R., CORNETTA, K., EGLITIS, M.A., AND ANDERSON, W.F. (1990). Retroviral-mediated gene transfer. *Proc. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **38**, 91-135.

MEISTER, S., OTTO, C., PAPPALLA, A., KRUMBIEGEL, M., POHLMANN, S., AND KIRCHHOFF, F. (2001). Basic amino acid residues in the v3 loop of simian immunodeficiency virus envelope alter viral coreceptor tropism and infectivity but do not allow efficient utilization of cxcr4 as entry cofactor. *Virology* **284**, 287-96.

MILLER, A.D., GARCIA, J.V., VON SUHR, N., LYNCH, C.M., WILSON, C., AND EIDEN, M.V. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* **65**, 2220-4.

MILLER, D. G., EDWARDS, R. H., AND MILLER, A. D. (1994). Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 78-82.

MOORE, J.P., THALI, M., JAMESON, B.A., VIGNAUX, F., LEWIS, G.K., POON, S.W., CHARLES, M., FUNG, M.S., SUN, B., DURDA, P.J., ET AL. (1993). Immunochemical analysis of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: probing the structure of the C4 and V4 domains and the interaction of the C4 domain with the V3 loop. *J. Virol.* **67**, 4785-96.

MOORE, J.P., MCCUTCHAN, F.E., POON, S.W., MASCOLA, J., LIU, J., CAO, Y., AND HO, D.D. (1994). Exploration of antigenic variation in gp120 from clades A through F of human immunodeficiency virus type 1 by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* **68**, 8350-64.

MUENCHAU, D.D., FREEMAN, S.M., CORNETTA, K., ZWIEBEL, J.A., AND ANDERSON, W.F. (1990). Analysis of retroviral packaging lines for generation of replication-competent virus. *Virology* **176**, 262-5.

MULLER, M.C., SAKSENA, N.K., NERRIENET, E., CHAPPEY, C., HERVE, V.M., DURAND, J.P., LEGAL-CAMPODONICO, P., LANG, M.C., DIGOUTTE, J.P., GEORGES, A.J., ET AL. (1993). Simian immunodeficiency viruses from central and western Africa: evidence for a new species-specific lentivirus in tantalus monkeys. *J. Virol.* **67**, 1227-35.

MÜLLER, PETER (1999). Antiretrovirale Therapie begleitende Surrogatmarker und [MLV(HIV-1)]-vermittelter Gentransfer. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt/M.

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

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

MURAKAMI, T., AND YAMAMOTO, N. (2000). Roles of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection. *Int. J. Hematol.* **72**, 412-7.

N

NAVIAUX, R.K., AND VERMA, I.M. (1992). Retroviral vectors for persistent expression *in vivo*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **3**, 540-7.

O

OKADA, T., PATTERSON, B.K., OTTO, P.A., AND GURNEY, M.E. (1994). HIV type 1 infection of CD4+ T cells depends critically on basic amino acid residues in the V3 domain of envelope glycoprotein 120. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**, 803-11.

OLSEN, J.C., AND SECHELSKI, J. (1995). Use of sodium butyrate to enhance production of retroviral vectors expressing CFTR cDNA. *Hum. Gene Ther.* **6**, 1195-202.

OSTROWSKI, M.A., JUSTEMENT, S.J., CATANZARO, A., HALLAHAN, C.A., EHLER, L.A., MIZELL, S.B., KUMAR, P.N., MICAN, J.A., CHUN, T.W., AND FAUCI, A.S. (1998). Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J. Immunol.* **161**, 3195-201.

OVERBAUGH, J., RUDENSEY, L.M., PAPPENHAUSEN, M.D., BENVENISTE, R.E., AND MORTON, W.R. (1991). Variation in simian immunodeficiency virus env is confined to V1 and V4 during progression to simian AIDS. *J. Virol.* **65**, 7025-7031.

OWEN, S.M., ELLENBERGER, D., RAYFIELD, M., WIKTOR, S., MICHEL, P., GRIECO, M.H., GAO, F., HAHN, B.H., AND LAL, R.B. (1998). Genetically divergent strains of human immunodeficiency virus type 2 use multiple coreceptors for viral entry. *J. Virol.* **72**, 5425-32.

OWEN, S.M., MASCIOTRA, S., NOVEMBRE, F., YEE, J., SWITZER, W.M., OSTYULA, M., AND LAL, R.B. (2000). Simian immunodeficiency viruses of diverse origin can use CXCR4 as a coreceptor for entry into human cells. *J. Virol.* **74**, 702-708.

P

PAGE, K.A., LANDAU, N.R., AND LITTMAN, D.R. (1990). Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J. Virol.* **64**, 5270-6.

PALU, G., PAROLIN, C., TAKEUCHI, Y., AND PIZZATO, M. (2000). Progress with retroviral gene vectors. *Rev. Med. Virol.* **10**, 185-202.

PAN, D., AND WHITLEY, C.B. (1999). Closed hollow-fiber bioreactor: a new approach to retroviral vector production. *J. Gene Med.* **1**, 433-440.

PIZZATO, M., MERTEN, O.W., BLAIR, E.D., AND TAKEUCHI, Y. (2001). Development of a suspension packaging cell line for production of high titre, serum-resistant murine leukemia virus vectors. *Gene Ther.* **8**, 737-745.

POHLMANN, S., STOLTE, N., MUNCH, J, TEN HAAFT, P., HEENEY, J.L., STAHL-HENNIG, C., AND KIRCHHOFF, F. (1999). Co-receptor usage of BOB/GPR15 in addition to CCR5 has no significant effect on replication of simian immunodeficiency virus in vivo. *J. Infect. Dis.* **180**, 1494-502.

R

REINHART, T.A., ROGAN, M.J., AND HAASE, A.T. (1996). RNA splice site utilization by simian immunodeficiency viruses derived from sooty mangabey monkeys. *Virology* **224**, 338-344.

REIPRICH, S., GUNDLACH, B.R., FLECKENSTEIN, B., AND ÜBERLA, K. (1997). Replication-competent chimeric lenti-oncovirus with expanded host cell tropism. *J. Virol.* **71**, 3328-31.

RIZVI, T.A., AND PANGANIBAN, A.T. (1992). Simian immunodeficiency virus vectors: replication and pseudotyping. *J. Med. Primatol.* **21**, 69-73.

RUSSELL, S.J., HAWKINS, R.E., AND WINTER, G. (1993). Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1081-5.

RUSSELL, S.J., AND COSSET, F.L. (1999). Modifying the host range properties of retroviral vectors. *J. Gene. Med.* **1**, 300-11.

S

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

SANES, J. R., RUBENSTEIN, J. L. R., AND NICOLAS, J.-F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* **5**, 3133-3142.

SATO, H., KATO, K., AND TAKEBE, Y. (1999). Functional complementation of the envelope hypervariable V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by the subtype E V3 loop. *Virology* **257**, 491-501.

SATTENTAU, Q.J., AND MOORE, J.P. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J. Exp. Med.* **182**, 185-96.

SAWADA, S., GOWRISHANKAR, K., KITAMURA, R., SUZUKI, M., SUZUKI, G., TAHARA, S., AND KOITO, A. (1998). 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**, 1439-1449.

SCARLATTI, G., TRESOLDI, E., BJORNDAL, A., FREDRIKSSON, R., COLOGNESI, C., DENG, H.K., MALNATI, M.S., PLEBANI, A., SICCARDI, A.G., LITTMAN, D.R., FENYO, AND E.M., LUSSO, P. (1997). In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.* **3**, 1259-65.

SCHMIDT, M., AND RETHWILM, A. (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* **210**, 167-78.

SCHNIERLE, B.S., STITZ, J., BOSCH, V., NOCKEN, F., MERGET-MILLITZER, H., ENGELSTÄDTER, M., KURTH, R., AND CICHUTEK, K. (1997). Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 8640-8645.

SCHOLS, D., AND DE CLERCQ, E. J. (1998). The simian immunodeficiency virus mnd (GB-1) strain uses CXCR4, not CCR5, as coreceptor for entry in human cells. *Gen. Virol.* **79**, 2203-5.

SCHUBERT, U., BOUR, S., WILLEY, R.L., AND STREBEL, K. (1999). Regulation of virus release by the macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 AD8 isolate is redundant and can be controlled by either Vpu or Env. *J. Virol.* **73**, 887-896.

SHIN, N.H., HARTIGAN-O'CONNOR, D., PFEIFFER, J.K., AND TELESNITSKY, A. (2000). Replication of lengthened Moloney murine leukemia virus genomes is impaired at multiple stages. *J. Virol.* **74**, 2694-702.

SHINNICK, T.M., LERNER, R.A., AND SUTCLIFFE, J.G. (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* **293**, 543-548.

SHIODA, T., LAVY, J.A., AND CHENG-MAYER, C. (1992). Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9434-9438.

SKOV, H., AND ANDERSEN, K.B. (1993). Mutational analysis of Moloney murine leukaemia virus surface protein gp70. *J. Gen. Virol.* **74**, 707-14.

SONEOKA, Y., CANNON, P.M., RAMSDALE, E.E., GRIFFITHS, J.C., ROMANO, G., KINGSMAN, S.M., AND KINGSMAN, A.J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high-titer retroviral vectors. *Nucl. Acids Res.* **23**, 628-633.

SPECK, R.F., WEHRLY, K., PLATT, E.J., ATCHISON, R.E., CHARO, I.F., KABAT, D., CHESEBRO, B., AND GOLDSMITH, M.A. (1997). Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J. Virol.* **71**, 7136-9.

SPIES, C.P., AND COMPANS, R.W. (1993). Alternate pathways of secretion of simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* **67**, 6535-41.

STAMATATOS, L., WISKERCHEN, M., AND CHENG-MAYER, C. (1998). Effect of major deletions in the V1 and V2 loops of a macrophage-tropic HIV type 1 isolate on viral envelope structure, cell entry, and replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 1129-39.

STITZ, JÖRN (1998). Entwicklung retroviraler Pseudotypvektoren für den spezifischen Gentransfer in humane CD4⁺-Zellen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt/M.

STITZ, J., MÜLLER, P., MERGET-MILLITZER, H., AND CICHUTEK, K. (1998). High-titer retroviral pseudotype vectors for the specific targeting of human CD4-positive cells. *Biogen. Amin.* **14**, 407-424.

STITZ, J., STEIDL, S., MERGET-MILLITZER, H., KÖNIG, R., MÜLLER, P., NOCKEN, F., ENGELSTÄDTER, M., BOBKOVA, M., SCHMITT, I., KURTH, R., BUCHHOLZ, C.J., AND CICHUTEK, K. (2000a). MLV-derived retroviral vectors selective for CD4-expressing cells and resistant to neutralisation by sera from HIV-infected patients. *Virology* **267**, 229-236.

STITZ, J., BUCHHOLZ, C.J., ENGELSTÄDTER, M., UCKERT, W., BLOEMER, U., SCHMITT, I., AND CICHUTEK, K. (2000b). Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273**, 16-20.

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

T

TAKEUCHI, Y., COSSET, F.L., LACHMANN, P.J., OKADA, H., WEISS, R.A., AND COLLINS, M.K. (1994). Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J. Virol.* **68**, 8001-7.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., AND GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

TRKOLA, A., DRAGIC, T., ARTHOS, J., BINLEY, J.M., OLSON, W.C., ALLAWAY, G.P., CHENG-MAYER, C., ROBINSON, J., MADDON, P.J., AND MOORE, J.P. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**, 184-7.

U

UNUTMAZ, D., XIANG, W., SUNSHINE, M.J., CAMPBELL, J., BUTCHER, E., AND LITTMAN, D.R. (2000). The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. *J. Immunol.* **165**, 3284-92.

V

VALSESIA-WITTMANN, S., DRYNDA, A., DELEAGE, G., AUMAILLEY, M., HEARD, J.M., DANOS, O., VERDIER, G., AND COSSET, F.L. (1994). Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J. Virol.* **68**, 4609-19.

VAN ZEIJL, M., JOHANN, S. V., CLOSS, E., CUNNINGHAM, J., EDDY, R., SHOWS, T. B., AND O'HARA, B. (1994). A human amphotropic retrovirus receptor is the second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 1168-1172.

VASSILIADOU, N., TUCKER, L., AND ANDERSON, D.J. (1999). Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expression on peripheral blood mononuclear cells correlates with reduced HIV-1 infectability in vitro. *J. Immunol.* **162**, 7510-8.

VIGNA, E., AND NALDINI, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene Med.* **2**, 308-16.

VON KALLE, C., KIEM, H.P., GOEHLE, S., DAROVSKY, B., HEIMFELD, S., TOROK-STORB, B., STORB, R., AND SCHUENING, F.G. (1994). Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector. *Blood* **84**, 2890-7.

W

WANG, H., KAVANAUGH, M. P., NORTH, R. A., AND KABAT, D. (1991). Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* **352**, 729-731.

WANG J.M., UEDA, H., HOWARD, O.M., GRIMM, M.C., CHERTOV, D., GONG, X., GONG, W., RESAU, J.H., BRODER C.C., EVANS, G., ARTHUR, L.O., RUSCETTI, F.W., AND OPPENHEIM, J.J. (1998). HIV-1 envelope gp120 inhibits the monocyte response to chemokines through CD4 signal-dependent chemokine receptor down-regulation. *J.Immunol.* **161**, 4309-17.

WEISSENHORN, W., DESSEN, A., HARRISON, S.C., SKEHEL, J.J., AND WILEY, D.C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-30.

WEISSMAN, D., DYBUL, M., DAUCHER, M.B., DAVEY, R.T. JR., WALKER, AND R.E., KOVACS, J.A. (2000). Interleukin-2 up-regulates expression of the human immunodeficiency virus fusion coreceptor CCR5 by CD4+ lymphocytes in vivo. *J. Infect. Dis.* **181**, 933-8.

WILK, T., PFEIFER, T., AND BOSCH, V. (1992). Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology* **189**, 167-177.

WILSON, C., REITZ, M. S., OKAYAMA, H., AND EIDEN, M. V. (1989). Formation of infectious hybrid virions with gibbon ape leukemia virus and human T-cell leukemia virus retroviral envelope glycoproteins and the gag and pol proteins of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* **63**, 2374-2378.

WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C., CHANG, N.T., GHAYEB, J., PAPAS, T.S., LAUTENBERGER, J.A., PEARSON, M.L., PETTEWAY, S.R.JR., IVANOFF, L., BAUMEISTER, K., WHITEHORN, E.A., RAFALSKI, J.A., DORAN, E.R., JOSEPHS, S.J., STARCICH, B., LIVAK, K.J., PATARCA, R., HASELTINE, W.A., AND RATNER, L. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**, 277-284.

WU, L., GERARD, N.P., WYATT, R., CHOE, H., PAROLIN, C., RUFFING, N., BORSETTI, A., CARDOSO, A.A., DESJARDIN, E., NEWMAN, W., GERARD, C., AND SODROSKI, J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-83.

WU, L., PAXTON, W.A., KASSAM, N., RUFFING, N., ROTTMAN, J.B., SULLIVAN, N., CHOE, H., SODROSKI, J., NEWMAN, W., KOUP, R.A., AND MACKAY, C.R. (1997). CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J. Exp. Med.* **185**, 1681-91.

WYATT, R., AND SODROSKI, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-8.

X

XIAO, L., OWEN, S.M., GOLDMAN, I., LAL, A.A., DEJONG, J.J., GOUDSMIT, J., AND LAL, R.B. (1998). CCR5 coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage. *Virology* **240**, 83-92.

XU, L., YEE, J.K., WOLFF, J.A., AND FRIEDMANN, T. (1989). Factors affecting long-term stability of Moloney murine leukemia virus-based vectors. *Virology* **171**, 331-41.

Y

YEE, J.K., FRIEDMANN, T., AND BURNS, J.C. (1994). Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* **43** Pt A, 99-112.

Z

ZAVADA, J., AND ROSENBERGOVA, M. (1972). Phenotypic mixing of vesicular stomatitis virus with fowl plague virus. *Acta. Virol.* **16**, 103-14.

ZHANG, L., HE, T., TALAL, A., WANG, G., FRANKEL, S.S., AND HO, D.D. (1998). In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J. Virol.* **72**, 5035-45.

ZHAO-EMONET, J.C., MARODON, G., PIOCHE-DURIEU, C., COSSET, F.L., AND KLATZMANN, D. (2000). T cell-specific expression from Mo-MLV retroviral vectors containing a CD4 mini-promoter/enhancer. *J. Gene Med.* **2**, 416-25.

ZOLOTUKHIN, A.S., VALENTIN, A., PAVLAKIS, G.N., AND FELBER, B.K. (1994). Continuous propagation of RRE(-) and Rev(-)RRE(-) human immunodeficiency virus type 1 molecular clones containing a cis-acting element of simian retrovirus type 1 in human peripheral blood lymphocytes. *J. Virol.* **68**, 7944-7952.

LEHRBÜCHER

WALTER H. GÜNZBURG UND BRIAN J. SALMONS (1997). Gentransfer in Säugetierzellen. Spektrum Akad. Verlag; ISBN 3827400317

SUSANNE MODROW UND DIETRISCH FALKE (1997). Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Verlag; ISBN 3860252747

7 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glataminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

Einheiten

k = Kilo- (10^3) m = Milli- (10^{-3}) μ = Mikro- (10^{-6}) n = Nano- (10^{-9})

A	Ampere	m	Meter
°C	Grad Celsius	min	Minute(n)
D	Dalton	M	Molar
g	Gramm	s	Sekunde(n)
h	Stunde	U	Unit
l	Liter	V	Volt

Abkürzungen

293T	humane Nierenzelllinie, transformiert durch das "Large T-Antigen" des SV40
4070A	murines Leukämie-Virus mit amphotropem Wirtszelltropismus
aa	Aminosäure ("aminoacid")
AAV	Adenoassoziierte Viren
Abb.	Abbildung
agm	Afrikanische Grüne Meerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i>)
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom ("acquired immunodeficiency syndrom")

BLV	Rinder-Leukämie-Virus
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR5	G-Protein-gekoppelter Chemokin-Rezeptor, dient als Korezeptor für Primatenlentiviren
CD	zelluläres Membranprotein (" <i>cellular marker of differentiation</i> ")
cDNA	komplementäre DNA (" <i>complementary DNA</i> ")
CMV	Cytomegalievirus
C-terminal	Carboxy-terminal
CXCR4	G-Protein-gekoppelter Chemokin-Rezeptor, dient als Korezeptor für Primatenlentiviren
DMEM	" <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i> "
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (" <i>desoxyribonucleic acid</i> ")
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dpi	Tage nach Infektion (" <i>days post infection</i> ")
ECL	gesteigerte Chemolumineszenz (" <i>enhanced chemoluminescence</i> ")
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	" <i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i> "
env	" <i>envelope</i> "; für das externe Hüllprotein (SU) und das Transmembranprotein (TM) eines Retrovirus kodierende Gen
Env	Hüllproteine TM und SU, Genprodukte des <i>env</i> -Gens
<i>gag</i>	virales Strukturgen für Nukleokapsid und Kernproteine
Gag	Kapsidproteine, Genprodukte des <i>gag</i> -Gens
gp	Glykoprotein (" <i>glycoprotein</i> ")
FACS	" <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> "
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	fötales Kälberserum
G418	Geneticinsulfat; Gentamycin-Derivat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GHOST	" <i>human osteo sarcoma</i> "-abgeleitete Zelllinie; exprimiert stabil humanes CD4 und trägt ein HIV-2 LTR-getriebenes hGFP-Konstrukt; stabil mit verschiedenen Korezeptoren
HIV	humanes Immunschwächevirus (" <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ")
HIV-X4	CXCR4-gängiges HIV-1 Env
HIV-R5	CCR5-gängiges HIV-1 Env

hu	human
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
hyg	Hygromycinresistenzgen
i.E.	infektiöse Einheiten
IgG	Immunglobulin Klasse G
IL	Interleukin
IPA	<i>In-situ</i> -Immun-Peroxidase-Assay
lacZ	für die bakterielle β -Galaktosidase kodierendes Gen
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LDS	Linker delta <i>Sfil</i>
LNGFR	schwach affiner Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>"Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor"</i>)
log ₂ ND ₅₀	Verdünnung eines Antiserums als Exponent zur Basis 2, mit der bei Mehrfachbestimmungen bei 50% der Versuche 10 infektiöse Viruseinheiten in einem Volumen von 10 μ l neutralisiert werden können (ND ₅₀ = neutralisierende Dose 50% „ <i>end-point</i> “)
LTR	<i>"long terminal repeat"</i>
MACS	<i>"Magnetic Cell Sorting"</i>
mc	Molekularklon
MLV	murines Leukämie-Virus
MLV/HIV-1	Hybridvirus aus MLV und HIV-1
MLV/SIVagm	Hybridvirus aus MLV und SIVagm
[MLV(HIV-1)]	mit HIV-1 Env pseudotypisierter MLV-Vektor
[MLV(MLV-A)]	mit 4070A MLV-Env pseudotypisierter MLV-Vektor
[MLV(SIVagm)]	mit SIVagm Env pseudotypisierter MLV-Vektor
MOI	Multiplizität der Infektion <i>"multiplicity of infection"</i> , Verhältnis Viruspartikelzahl zu Zielzellzahl
MoMuLV	<i>"Moloney Murine Leukemia Virus"</i> , ecotrop
mRNA	Boten-RNA (<i>"messenger RNA"</i>)
NaB	Sodiumbutyrat
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
OD	optische Dichte
p(A)	Polyadenylierungssequenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (<i>"peripheral blood mononuclear cells"</i>)
PBL	periphäre Blutlymphozyten

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (" <i>Phosphat buffered saline</i> ")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (" <i>polymerase chain reaction</i> ")
PFA	Paraformaldehyd
PE	R-Phycoerythrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
Primer	Oligonukleotid
<i>pol</i>	virales enzymatisches Gen (Protease, RT, Ribonuklease H und Integrase)
poly (A)	Polyadenylierungssequenz
Psi (ψ)	Verpackungssignalsequenz
RCR	replikationskompetentes Retrovirus (" <i>replication competent retrovirus</i> ")
<i>rev</i>	regulatorisches Gen der Lentiviren
Rev	Genprodukt des <i>rev</i> -Gens
RNA	Ribonukleinsäure (" <i>ribonucleic acid</i> ")
rpm	Umdrehungen pro Minute (" <i>rounds per minute</i> ")
RPMI	Kulturmedium aus dem " <i>Roswell Park Memorial Institute</i> "
RRE	" <i>rev response element</i> "
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
RSV	Rous Sarkom-Virus
SA	Spleißakzeptor
scFv	einkettiges Antikörperfragment der variablen Regionen (" <i>single chain fragment of variability</i> ")
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat (" <i>sodiumdodecylsulfate</i> ")
SIVagm	" <i>Simian Immunodeficiency Virus</i> " isoliert aus der Afrikanischen Grünen Meerkatze
SIVagm-wt	SIVagm Env, wildtyp
SIVagm-X4	SIVagm Env-Variante mit V3-Loop eines CXCR4-gängigen HIV-1
SIVagm-R5	SIVagm Env-Variante mit V3-Loop eines CCR5-gängigen HIV-1
SU	Oberflächenhüllprotein (" <i>surface</i> ")
SV40	Affenvirus 40 (" <i>Simian Virus 40</i> ")
Tab.	Tabelle
TM	Transmembranhüllprotein
TMR	Transmembranregion
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

V1 bis V5	variable Aminosäuresequenz im SU von Primatenlentiviren
VSV	" <i>Vesicular Stomatitis Virus</i> "
wt	Wildtyp (" <i>wild type</i> ")
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Teilergebnisse dieser Arbeit sind in nachfolgenden Publikationen veröffentlicht worden:

J. STITZ, S. STEIDL, H. MERGET-MILLITZER, R. KÖNIG, P. MÜLLER, F. NOCKEN, M. ENGELSTÄDTER, M. BOBKOVA, I. SCHMITT, R. KURTH, C.J. BUCHHOLZ, AND K. CICHUTEK (2000). MLV-derived retroviral vectors selective for CD4-expressing cells and resistant to neutralisation by sera from HIV-infected patients. *Virology* **267**, 229-236

M. ENGELSTÄDTER, C.J. BUCHHOLZ, M. BOBKOVA, S. STEIDL, H. MERGET-MILLITZER, R.A. WILLEMSSEN, J. STITZ AND K. CICHUTEK (2001). Targeted gene transfer to lymphocytes using murine leukaemia virus vectors pseudotyped with spleen necrosis virus envelope proteins. *Gene Ther.* **8**, 1202-1206

J. STITZ, M.D. MÜHLEBACH, U. BLÖMER, M. SCHERR, M. SELBERT, P. WEHNER, S. STEIDL, I. SCHMITT, R. KÖNIG, M. SCHWEIZER AND K. CICHUTEK (2001). A Novel Lentivirus Vector Derived from Apathogenic Simian Immunodeficiency Virus. *Virology* **291**, 191-197

S. STEIDL, J. STITZ, I. SCHMITT, R. KÖNIG, E. FLORY, M. SCHWEIZER AND K. CICHUTEK. Coreceptor Switch of [MLV(SIVagm)] Pseudotype Vectors by V3-loop Exchange. Eingereicht bei *Virology*, Dezember 2001

R. KÖNIG, E. FLORY, S. STEIDL, S. HOLZAMMER, E. HOLZNAGEL, C. COULIBALY, S. NORLEY AND K. CICHUTEK. Engineered CD4/CXCR4-tropic Simian Immunodeficiency Virus from African Green Monkeys is Neutralization Sensitive and Replicates in non-stimulated Lymphocytes. Eingereicht bei *J. Virol.*, April 2002

I. SCHMITT, S. STEIDL, J. STITZ, P. MÜLLER, M. SCHWEIZER AND K. CICHUTEK. Efficient and specific transduction of primary human CD4⁺ T-lymphocytes by [MLV(HIV-1)] pseudotype vectors. *Gene Therapy*, in Vorbereitung

Teile dieser Arbeit wurden als Posterpräsentation auf verschiedenen Kongressen vorgestellt:

S. STEIDL, J. STITZ, P. MÜLLER, R. KÖNIG, I. SCHMITT, J. NEUMANN, R. KURTH AND K. CICHUTEK. Targeted transduction of CD4⁺ human cells using SIVagm-derived envelope mutants. 7th Meeting of the European Gene Therapy Society, München, 26.-28.11.1999

S. STEIDL, J. STITZ, R. KÖNIG, I. SCHMITT AND K. CICHUTEK. Generation of MLV-based pseudotype vectors for transduction of human T-Cells using SIVagm-derived envelope mutants with altered tropism. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien, Österreich, 26.-29.04.2000

S. STEIDL, J. STITZ, R. KÖNIG, I. SCHMITT AND K. CICHUTEK. Generation of MLV-based pseudotype vectors for transduction of human T-Cells using SIVagm-derived envelope mutants with altered tropism. 3rd Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Denver, Colorado, USA, 31.05.-04.06.2000

S. STEIDL, J. STITZ, I. SCHMITT, M. SCHWEIZER UND K. CICHUTEK. Konstruktion und Analyse von MLV/HIV- und MLV/SIV- Hybridviren. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14.-17.03.2001

S. STEIDL, J. STITZ, M. SCHWEIZER UND K. CICHUTEK. MLV/HIV-1 and MLV/SIVagm hybrid viruses are not replication competent. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 08.-11.04.2002

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Reinhard Kurth und Herrn Professor Dr. Johannes Löwer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut/Langen.

Herrn Professor Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Überlassung des Themas, sowie die wissenschaftliche Anleitung bei der Durchführung dieser Arbeit, die in seiner Abteilung "Medizinische Biotechnologie" entstand.

Herrn Professor Dr. Bernd Ludwig vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität/Frankfurt danke ich für die freundliche und fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Matthias Schweizer danke ich für die Betreuung während der Fertigstellung dieser Arbeit, insbesondere für die Mühe und Sorgfalt bei der Durchsicht.

Isabel Schmitt, Dr. Jörn Stitz, Renate Wenig und Renate König danke ich für ihre Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung bei der Bewältigung der experimentellen Probleme im Laboralltag. Herrn Dipl.-Ing. Martin Selbert danke ich für die Durchführung aller Sequenzierarbeiten und Herrn Herbert Bartel für die fototechnischen Arbeiten. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe 6/2 danke ich für einen problemlosen Wissens-, Material- und Methodentransfer.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Fachgebiete 6/01, 6/1 und 6/2, ganz besonders Isabel Schmitt und Renate Wenig, die mich die letzten drei Jahre begleitet und unterstützt haben. Durch ihren Witz und Humor sorgten sie stets für ein sehr angenehmes Arbeitsklima. Sie alle haben dadurch dazu beigetragen, daß die vorliegende Arbeit zustande gekommen ist.

Ich danke ganz besonders den Menschen, die mir nahe stehen und mich in einer Weise unterstützt haben, die weit über fachliche Diskussionen und technische Hilfe hinaus geht: meinen Eltern, meinen Freunden und meinem Freund Marc Fischlin.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefanie Steidl
Geburtstag	19.06.1973
Geburtsort	Hanau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildungsdaten

Schule	1979 - 1983	Grundschule (Friedrich-Ebert-Schule/Klein-Auheim)
	1983 - 1985	Förderstufe (Friedrich-Ebert-Schule/Klein-Auheim)
	1985 - 1992	Gymnasium (Karl-Rehbein-Schule/Hanau) Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Studium	1992 - 1998	Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main Studienschwerpunkte: Humangenetik und Anthropologie, Biochemie, Mikrobiologie
Diplom	05/97	Diplomhauptprüfung in Biologie
	07/97 bis 03/98	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: <i>"Versuche zur Pseudotypisierung retroviraler Vektoren"</i> am Paul-Ehrlich-Institut/Langen, in der Abteilung "Medizinische Biotechnologie" unter Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek Abschluß: Diplom-Biologin; Gesamtnote: "sehr gut"
Promotion	ab 05/98	Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Thema: <i>"Entwicklung und Charakterisierung sicherer CD4-spezifischer retroviraler Vektoren des Typs [MLV(SIVagm)] für die Gentherapie des Immunschwäche-Syndroms AIDS"</i> am Paul-Ehrlich-Institut/Langen, in der Abteilung "Medizinische Biotechnologie" unter Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Dissertation über die *“Entwicklung und Charakterisierung sicherer CD4-spezifischer retroviraler Vektoren des Typs [MLV(SIVagm)] für die Gentherapie des Immunschwäche-Syndroms AIDS”* selbstständig angefertigt, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Langen, den 16.12.2001



Stefanie Steidl