

Herstellung und Evaluierung transdominant negativ wirksamer Varianten des HIV-1 gruppenspezifischen Antigens als Basiskomponente einer HIV-1-Gentherapie

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR.RER.NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III -BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN- DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Diana Hammer
aus Landsberg am Lech
April 2006

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Juli 2002 und April 2006 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 12. April 2006

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. G. Hauska

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. R. Wagner

Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Prof. Dr. E. Tamm

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig, ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

.....

Diana Hammer

Meinen Eltern

1. EINLEITUNG	9
1.1. HIV UND AIDS	9
1.1.1 DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZ VIRUS (HIV)	9
1.1.1.1 Die Replikation von HIV-1	10
1.1.1.2 Latenz von HIV-1	14
1.1.2 IMMUNANTWORT UND GENPOLYMORPHISMEN IN DER HIV-1 INFektION	14
1.1.2.1 Der Verlauf der HIV-1 Infektion	14
1.1.2.2 Zelluläre Immunantwort	15
1.1.2.3 Humorale Immunantwort	16
1.1.3 DIE WIRTSGENETIK IN DER HIV-1 INFektION	17
1.1.3.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex, MHC</i>)	17
1.1.3.2 HIV-1 Korezeptoren	17
1.2. ANTIRETROVIRALE THERAPIE	18
1.2.1 GENTHERAPIE	19
1.2.1.1 Vektoren und Vektorsysteme	19
1.2.1.2 Retrovirale Transfersysteme	19
1.2.2 HIV GENTHERAPIE	20
1.2.2.1 Entwicklung potenter anti-HIV-1 Transgene	22
1.2.2.2 Protein-Strategien	23
1.2.2.3 RNA Strategien	24
1.2.2.4 Inhibition der Infektion der Zelle	24
1.2.3 PROBLEME DER HIV GENTHERAPIE	25
1.2.4 HIV-GENTHERAPIE: STATUS QUO	27
1.3. ZIEL DER ARBEIT	28
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1. REAGENZIEN	30
2.2. GENTECHNISCHE ARBEITSMETHODEN	30
2.3. ZELLKULTURTECHNIKEN UND ZELLINNEN	31
2.3.1 ALLGEMEINE ZELLKULTURTECHNIKEN	31

2.3.2 TRANSFEKTION UND TRANSDUKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN	32
2.3.2.1 CaHPO ₄ ⁻ -Transfektion eukaryontischer Zellen	33
2.3.2.2 Transfektion zur Herstellung stabiler Zelllinien durch Lipofektion	33
2.3.2.3 Transiente Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren	34
2.3.2.4 Transduktion von Suspensionszellen mit retrovirusalen Partikeln	34
2.3.2.5 FACS-Anreicherung	34
2.3.3 HERSTELLUNG REPLIKATIONSKOMPETENTER HIV-VIREN UND TITRATION DES VIRUSSTOCKS	35
2.3.4 INFektION DER ZELLlinIEN MIT HIV-1	35
2.4. ANALYSE DER PROTEINEXPRESSION	36
2.4.1 GEWINNUNG VON ZELLlysATEN	36
2.4.2 BESTIMMUNG DER GESAMTPROTEINMENGE	36
2.4.3 BESTIMMUNG DER HALBWERTSZEIT (HWZ) EXPRIMIERTER PROTEINE <i>IN VIVO</i>	36
2.4.4 BESTIMMUNG DER PROTEASOMALEN DEGRADATION EXPRIMIERTER PROTEINE <i>IN VIVO</i>	36
2.4.5 ANALYSE DER PROTEINEXPRESSION: SDS-PAGE UND WESTERN BLOT ANALYSE	37
2.4.6 QUANTIFIZIERUNG DER P24-CA KONZENTRATION IM ELISA	38
2.5. RNA METHODEN	39
2.5.1 ALLGEMEINE ARBEITSTECHNIKEN	39
2.5.2 AUFREINIGUNG DER RNA	39
2.5.3 RT-PCR UND LIGHTCYCLER	40
2.5.4 ANALYSE DER RNA: NORTHERN BLOT	40
2.6. IMMUNISIERUNG DER VERSUCHSTIERE UND ALLGEMEINE IMMUNOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN	42
2.6.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNG	42
2.6.2 PRÄPARATION ENDOTOXIN-FREIER PLASMID-DNA	42
2.6.3 IMMUNISIERUNG DER MÄUSE	42
2.6.4 BESTIMMUNG DER HUMORALEN IMMUNANTWORT	42
2.6.4.1 Gewinnung von Serum	42
2.6.4.2 Bestimmung der spezifischen Gesamt-Ig Antikörpertiter	43
2.6.5 BESTIMMUNG DER ZELLULÄREN IMMUNANTWORT	43
2.6.5.1 Kultivierung primärer Splenozytenkulturen	43
2.6.5.2 Präparation der Milz und Isolierung der Splenozyten	44
2.6.5.3 Verwendete Peptide	44

2.6.5.4 <i>In vitro</i> Restimulation der Splenozyten: Quantifizierung der IFN γ -Sekretion (ELISA)	45
2.6.5.5 ELISPOT-Assay: Quantifizierung IFN γ -sezernierender Zellen	45
2.6.5.6 Intrazelluläre IFN γ –Färbung und FACS-Analyse	46
2.6.5.7 Bestimmung der CD8 $^{+}$ zytotoxischen T-Zellantwort: LDH-Freisetzungstest (CytoTox96 $^{\circledR}$)	46
2.6.5.8 Bestimmung der <i>in vivo</i> Zytotoxizität	48
3. ERGEBNISSE	49
3.1. INHIBITION DER HIV-1-REPLIKATION DURCH INDUZIERBARE TRANSDOMINANT NEGATIVE GAG-GENE (TDGAG)	49
3.1.1 STRATEGIEN ZUR HIV-1-ABHÄNGIGEN INDUKTION DER EXPRESSION TRANSDOMINANTER GAG-MUTANTEN	49
3.1.2 KONSTRUKTION UND BESCHREIBUNG DER TDGAG EXPRESSIONSPLASMIDE	50
3.1.2.1 Herstellung der induzierbaren <i>TDgag</i> -Expressionskonstrukte	52
3.1.3 EINFLUSS DER INDUZIERBARKEIT AUF DIE EXPRESSION DER GAG-KONSTRUKTE	53
3.1.3.1 Nachweis der Rev- oder Tat-abhängigen Induktion der Expression von TDGag	53
3.1.3.2 Nachweis der Rev/Tat-abhängigen Induktion der Expression von TDgag	54
3.1.4 INHIBITION DER HIV-1-REPLIKATION DURCH TDGAG-KONSTRUKTE	55
3.1.4.1 Hemmung der Virusfreisetzung in transienten Transfektionsstudien	55
3.1.4.2 Inhibition der HIV-1-Replikation in stabil TDGag Δ 2-exprimierenden Jurkat Zellen	57
3.1.4.3 Inhibition der HIV-1-Replikation in transduzierten PM1 Zellen	58
3.1.5 ZUSAMMENFASSUNG	60
3.2. EINFLUSS EINES 24 AMINOSÄUREN GLYCIN-ALANIN-BEREICHS AUF DIE FUNKTIONALITÄT UND STABILITÄT VON TRANSDOMINANTEM GAG UND DIE EIGENSCHAFTEN	61
3.2.1 WIRKUNG DES GLYCIN-ALANIN (GA) BEREICH VON EBNA-1	61
3.2.2 HERSTELLUNG DER GA-GAG EXPRESSIONSKONSTRUKTE	61
3.2.3 EINFLUSS VON GA AUF DIE INHIBITORISCHEN EIGENSCHAFTEN VON TD Δ SYNGAG	63
3.2.4 EINFLUSS VON GA AUF DIE MOLEKULARBIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN	65
3.2.4.1 Nachweis der Expression von Gag und TDGag mit Gly-Ala	65

3.2.4.2 Synthese und Export Gag-spezifischer RNA	66
3.2.4.3 Bestimmung der Halbwertszeit <i>in vivo</i> exprimierter Gag und GAGag Proteine	67
3.2.5 UNTERSUCHUNGEN DER IMMUNOGENEN EIGENSCHAFTEN DER GA-FUSIONSKONSTRUKTE	68
3.2.5.1 Induktion einer Gag-spezifischen humoralen Immunantwort	68
3.2.5.2 Induktion einer Gag-spezifischen zellulären Immunantwort	69
3.2.5.3 Bestimmung der spezifischen Lyse Gag- und GAGag-exprimierender Zellen	71
3.2.5.4 Bestimmung der <i>in vivo</i> Zytotoxizität von GAGag-exprimierender Zellen	72
3.2.6 ZUSAMMENFASSUNG	75
3.3. INHIBITION DER HIV-1-REPLIKATION DURCH GAG BASIERTE MINIGENE MIT MINIMALER POTENIELLER IMMUNOGENITÄT	76
3.3.1 MINIGENE ALS INHIBITOREN DER HIV-REPLIKATION	76
3.3.2 HERSTELLUNG DER MINIGEN-PLASMID KONSTRUKTE	76
3.3.3 HEMMWIRKUNG DER MINIGENE AUF VIRUSFREISETZUNG UND INFELKTÖSITÄT DER NACHKOMMENVIREN	79
3.3.3.1 Inhibitorische Eigenschaften der Minigene, der Minigen-Kombinationen und der Einfluss von GA	80
3.3.3.2 Hemmung der HIV-Freisetzung durch Tat-induzierbare Minigenkombinationen	80
3.3.4 UNTERSUCHUNGEN ZU DEN IMMUNOGENEN EIGENSCHAFTEN DER MINIGAG-FUSIONSKONSTRUKTE	82
3.3.4.1 Bestimmung der spezifischen zellulären Immunantworten	82
3.3.5 INHIBITORISCHE EIGENSCHAFTEN DER MINIGAG-KONSTRUKTE	83
3.3.5.1 Inhibitionsstudien in transduzierten PM1 Zellen	83
3.3.6 ZUSAMMENFASSUNG	85
4. DISKUSSION	86
4.1. HIV GENTHERAPIE	86
4.2. HEMMUNG DER HIV-1-REPLIKATION DURCH INDUZIERBARE TRANSDOMINANTE GAG-MUTANTEN	87

4.3. EINFLUSS EINER 24 AMINOSÄUREN GLYCIN-ALANIN DOMÄNE AUF FUNKTION, UND STABILITÄT TRANSDOMINANTER PROTEINE UND DEREN ERKENNUNG DURCH SPEZIFISCHE CTL	91
4.4. INHIBITION DER HIV-1-REPLIKATION DURCH MINIGENE	95
<u>5. RESUMEE / AUSBLICK</u>	99
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	101
<u>7. LITERATURVERZEICHNIS</u>	103
<u>CURRICULUM VITAE</u>	122
<u>PUBLIKATIONEN</u>	124
<u>DANKSAGUNG</u>	126
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	127

1. Einleitung

1.1. HIV und AIDS

Seit ihrem Bekanntwerden im Jahr 1981 hat die Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) mehr als 25 Millionen Todesopfer gefordert und ist damit eine der schlimmsten Epidemien in der Geschichte der Menschheit. Trotz des in jüngster Zeit verbesserten Zugangs zu antiretroviraler Behandlung und Pflege in zahlreichen Regionen der Welt forderte die AIDS-Epidemie im Jahr 2005 3,1 Millionen Todesopfer, darunter mehr als eine halbe Million Kinder. Die Gesamtzahl der HIV-Positiven erreichte einen neuen Höchststand: Schätzungen zufolge leben 40,3 Millionen Menschen mit dem HI-Virus. Im Jahr 2005 kam es zu fast 5 Millionen Neuinfektionen (www.unaids.org).

1.1.1 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)

Reife HI-Virionen (Abb. 1-1 A) haben eine sphärische Morphologie von 100-120 nm Durchmesser und bestehen aus einer Lipid-Doppelmembran, die ein konisch geformtes Nukleokapsid umgibt. Im Nukleokapsid (*core*) befinden sich neben den genetischen RNA Molekülen die virale Protease (PR), die Reverse Transkriptase (RT), die Integrase (IN), die Proteine Vpu (virales Protein U), Vif (viraler Infektiositätsfaktor), und Nef (negativer Faktor) sowie einige Wirtszell Faktoren (Hirsch, 1990).

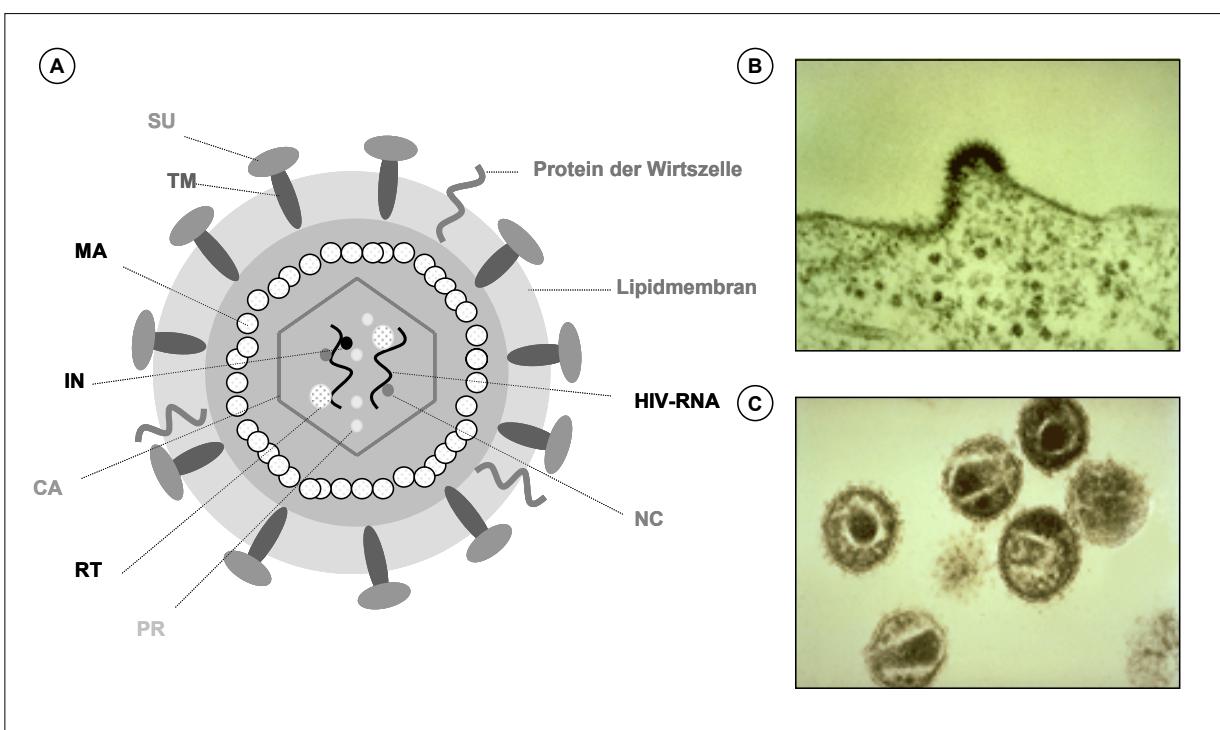


Abbildung 1-1: Die Morphologie reifer HIV-1 Viruspartikel. (A) Schematische Darstellung des reifen HI-Virions. (MA = Matrixprotein p17; CA = Kapsidprotein p24; NC = Nukleokapsidprotein p7; RT = Reverse Transkriptase p51; PR = Protease p11; IN = Integrase p32; TM = Transmembranprotein gp41; SU = Hüllprotein gp120) (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines HI-Virions beim *budding* aus der Zelle (C) In der elektronenmikroskopischen Aufnahme infektiöser Viruspartikel ist deutlich das von einer Hüllmembran umgebene, konische Kapsid zu erkennen.

Das HIV-1 Genom im Virion besteht aus zwei identischen, 9,2 kb langen, einzelsträngigen RNA Molekülen, wohingegen die persistierende Form des HIV-1 Genoms in infizierten Zellen provirale, doppelsträngige DNA ist.

Auf dem komplexen RNA-Genom sind neben den viralen Enzymen und Strukturproteinen auch regulatorische und akzessorische Proteine kodiert (Abb. 1-2).

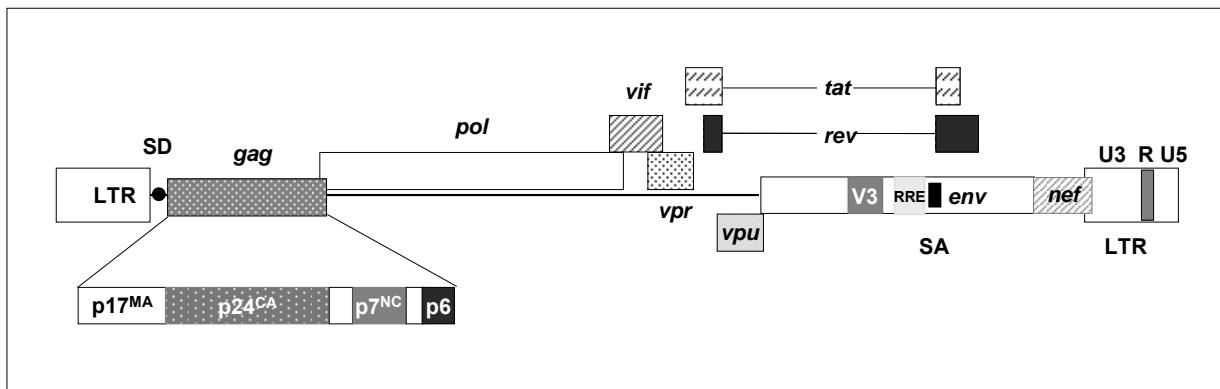


Abbildung 1-2: Organisation des proviralen HIV-1 Genoms. *gag*: gruppenspezifisches Antigen, *pol*: Polymerase, *vif*: viraler Infektiositätsfaktor, *vpr*: virales Protein R, *vpu*: virales Protein U, *tat*: Transaktivator der Transkription, *rev*: Regulator der Expression viraler Proteine, *env*: Envelope, *nef*: negativer Faktor, *RRE*: Rev-responsive element, *LTR*: long terminal repeats; *SD*: 5'-Spleißdonor, *SA*: 3'-Spleißakzeptor;

1.1.1.1 Die Replikation von HIV-1

Die Infektion (Abb. 1-3) beginnt mit dem Anheften (*attachment*) der Virionen an die Oberfläche der Zellen und wird durch die Interaktion zwischen der extrazellulären Domäne von HIV-1 gp120 und zellulären Rezeptoren vermittelt (Moore, 1993; Weiss, 1993). Der Hauptrezeptor für HIV-1 und HIV-2 ist CD4, die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 sind die wichtigsten Korezeptoren für HIV-1 *in vivo* (Clapham, 2002).

Nach Bindung an den Korezeptor fusionieren die virale und die zelluläre Membran, und das virale *core* wird in das Cytoplasma der Zelle entlassen (*uncoating*). In diesen Prozess sind zelluläre Faktoren und die viralen Proteine MA, Nef, und Vif involviert. Das virale RNA Genom wird durch die virale RT in doppelsträngige DNA retro-transkribiert (Hirsch, 1990; Harrich, 2002). Durch die Anwesenheit des zellulären Proteins APOBEC3G (CEM15) wird die Genauigkeit der reversen Transkription beeinflusst. HIV-1 Vif wirkt dem antiretroviroalen Effekt von APOBEC3G entgegen, indem es dessen Expression und Einbau in die Nachkommenviren reduziert (Sheehy, 2002; Mariani, 2003; Kao, 2003; Marin, 2003).

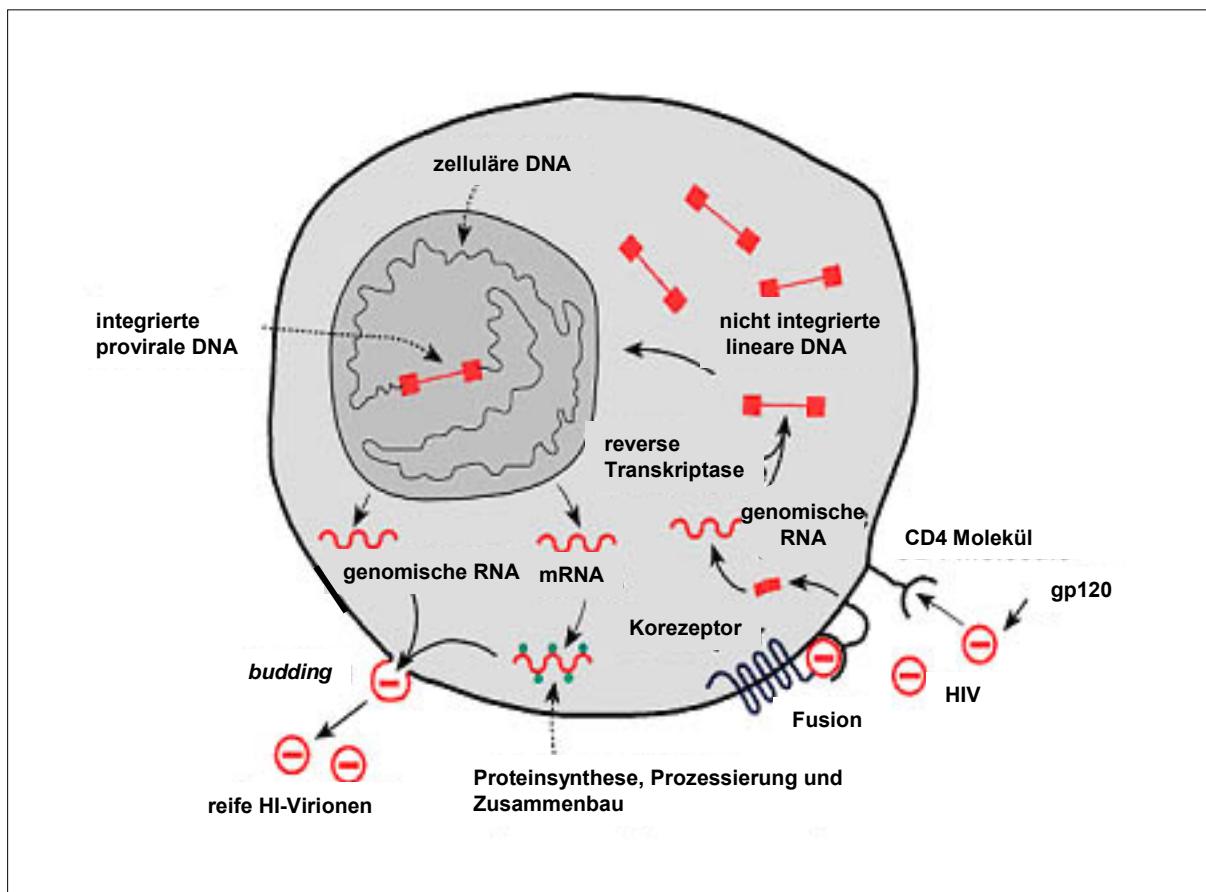


Abbildung 1-3: Replikationszyklus von HIV. Die „frühe Phase der Replikation“ beginnt mit der CD4-Erkennung und beinhaltet alle Ereignisse bis zur Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom. Von der „späten Phase der Replikation“ spricht man ab der Transkription der integrierten DNA bis zur Virus Freisetzung („budding“) und Reifung („maturation“).

Der Präintegrationskomplex, bestehend aus dem viralen RNA-Genom, den Enzymen RT und IN, sowie dem Matrixprotein und dem Vpr (Farnet und Haseltine, 1991), dockt durch Vpr zielgerichtet an die Kernmembran an (Popov, 1998) und gelangt durch die Kernporen in den Nukleus (Le Rouzic, 2005; Haffar, 2005). Die virale DNA liegt dort vor der Integration in drei Formen vor: linear oder in der 1-LTR bzw. 2-LTR kovalent geschlossen, zirkulären Form (Dismuke, 2006). Durch Bindung zellulärer Faktoren wie z.B. AP-1, NFAT-1 und Ets-1 sowie NF-κB und SP1 an den 5'-LTR, werden Nef, Tat und Rev in basalen Mengen produziert (Aiken, 1995). Durch die IN wird die lineare, doppelsträngige DNA im Präintegrationskomplex in das Wirtschromosom integriert (Abb. 1-4) (Bushman, 2002; Van Maele, 2005). Sobald die provirale DNA integriert ist, findet die erste Runde proviraler Transkription durch die zelluläre Polymerase II und Bindung von zellulären Faktoren an den viralen LTR-Promotor statt, und wiederum werden basale Mengen an Tat, Rev und Nef produziert (Jordan, 2001). Das regulatorische 14 kDa Protein Tat (Rabson, 1988) ist dabei essentiell für die Aktivierung der viralen Transkription. Tat bindet an die ebenfalls im 5'-LTR gelegene, transkribierte RNA-Haarnadelschleife TAR (*transactivating response element*) (Harrich, 1996; Harrich, 2002) und rekrutiert weitere zelluläre Faktoren, wie z.B. den Komplex Cyclin T1/CDK9 (Wei, 1995;

Isel, 1999). Eine durch CDK9 vermittelte Hyperphosphorylierung der RNA-Polymerase II erhöht die Prozessivität des Transkriptionskomplexes und gewährleistet somit eine effiziente Elongation der viralen Transkription (Karn, 1999). Die nukleäre Degradation ungespleißter, viraler RNA-Transkripte wird auf bislang noch unbekannte Weise durch A/U-reiche Sequenzen oder Sequenzmotive (INS; „*inhibitory sequences*“) vermittelt (Freed, 2001; Kofman, 2003). Durch diesen Regulationsmechanismus werden zunächst ausschließlich mehrfach gespleißte RNA-Transkripte (~2kb) aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert. Diese kodieren unter anderem für das virale 13 kDa Regulatorprotein Rev (Pollard, 1998). Das nukleäre Phosphoprotein Rev bindet in oligomerer Form an die ausgeprägte RNA-Sekundärstruktur RRE (*Rev-responsive element*), die innerhalb der für die viralen Hüllproteine kodierenden Region *env* liegt und in allen einfach- und ungespleißten HIV RNA Transkripten vorhanden ist (Battiste, 1996; Tiley, 1992). Rev blockiert zudem die Zusammenlagerung des Spleißapparates am Spleißdonor (SD1) und wirkt somit weiteren Spleißprozessen entgegen (Konforti, 1993). Des Weiteren interagiert Rev mittels der C-terminalen Domäne NES (*nuclear export signal*) mit dem zellulären Kernexportfaktor CRM1/Exportin1 und vermittelt dadurch den Export der einfach gespleißten (~4kb) und ungespleißten (~9kb) viralen Transkripte aus dem Zellkern. Durch weitere Interaktionen mit Ran-GTP und Assoziation mit Proteinen des Kernporenkomplexes, wie z.B. Nup214 und Nup98 (Zolotukhin, 1999), wird der Komplex unter Hydrolyse von GTP in GDP aktiv durch die Kernpore in das Zytoplasma transloziert (Nilsson, 2002). Im Zytoplasma erfolgt die Dissoziation des Komplexes unter Freisetzung der viralen mRNA, wobei Rev aufgrund einer aminoterminalen Kernlokalisierungssequenz (NLS; *nuclear localization signal*) wieder in den Zellkern transportiert wird (Greene, 2002; Kjems, 2000). Auf diese Weise wirkt das *shuttle*-Protein Rev als Schalter der frühen Synthese mehrfach gespleißter mRNAs (Tat, Rev, Nef) und der späteren Synthese von einfach gespleißten (Env, Vpu, Vif, Vpr) und ungespleißten mRNA-Transkripte (Gag, Gag-Pol). Das *env* Gen wird unter Bildung des gp160 Vorläuferprotein translatiert, welches im endoplasmatischen Retikulum glykosyliert wird. Das Gag Polyprotein ist ein 55 kDa Vorläufer, das vom *gag-pol* Gen translatiert wird und das proteolytisch während der Reifung des Virus in vier Strukturproteine (p17^{MA}, p24^{CA}, p7^{NC}, p6) gespalten wird, die durch Umlagerung das reife Virus bilden. Ein in ~ 5 % der Translationsereignisse stattfindender -1 Leserastersprung während der Translation führt zur Expression des Gag-Pol Polyproteins, das zusätzlich die enzymatischen Proteine Protease, Reverse Transkriptase und Integrase enthält. Nach der Translation wandert Env und integriert in die Plasmamembran. Gag und Gag-Pol Polyproteine bewegen sich ebenfalls zur zellulären Membran und beginnen durch das Gag-Polyprotein gesteuert mit dem Zusammenbau (*assembly*) der Virionen (Sandefur, 2000; Briggs, 2003; Derdowski, 2004).

Die viralen Enzyme, die genomische RNA, zelluläre tRNAlys3 Primer und zelluläre Komponenten assoziieren zu dem unreifen *core* (De Guzman, 1998; Zimmerman, 2002; Kleiman, 2004). Später knospt dieser Komplex durch die Plasmamembran und wird zum unreifen Virion (Nguyen, 2000; Ono, 2001; Freed, 2002; Gould, 2003).

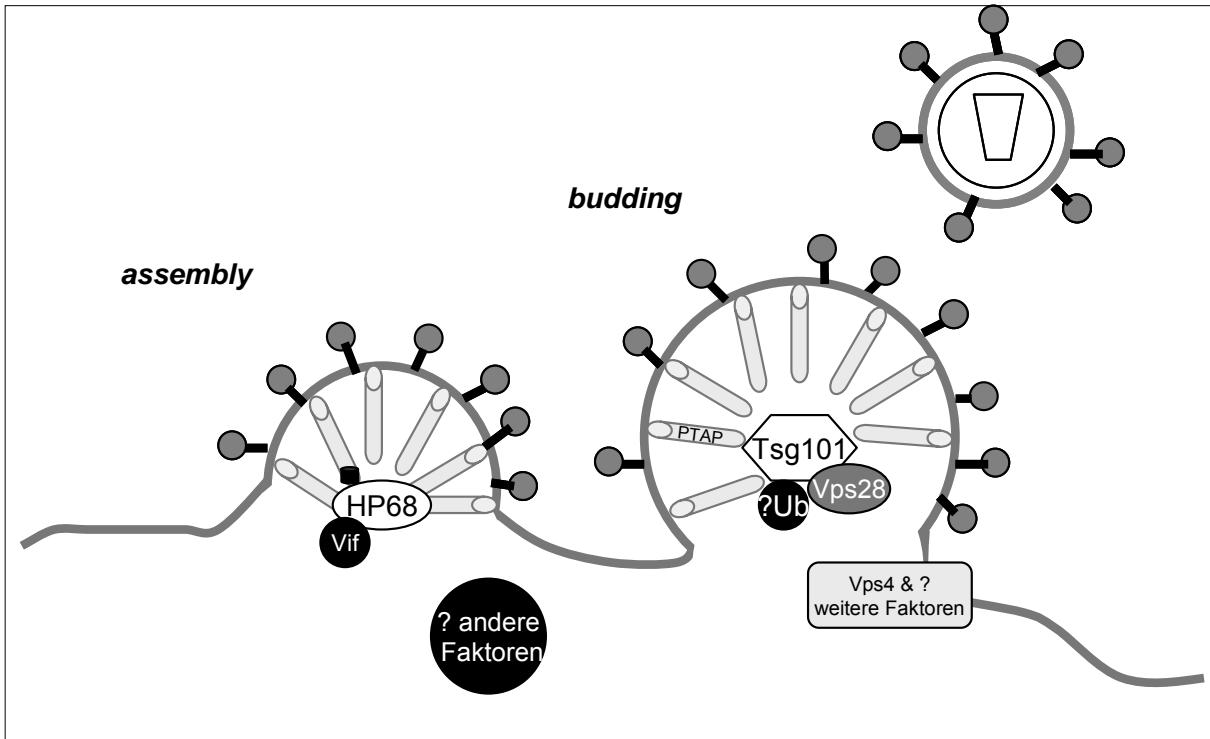


Abbildung 1-4: Die Rolle zellulärer Faktoren beim HIV Kapsid assembly und der Virus-Knospung. Nach der Synthese binden Gag Polypeptide und das virale akzessorische Protein Vif an das Wirtsprotein HP68. HP68, ein ATP Bindeprotein, interagiert mit der p7^{NC} Region von Gag und fördert den Übergang von assembly-Intermediaten in unreife Kapside an der Plasmamembran der Wirtszelle (Zimmermann, 2002). Das zelluläre Protein Tsg101, das im vakuolären Protein-sorting (vps) wirkt, wird für das Budding benötigt. Tsg101 bindet an Ubiquitin und an ein essentielles Motiv (PTAP) in der p6 Domäne des Gag-Proteins. Vps28, das an Tsg101 bindet, ist ebenfalls essentiell für das budding.

Für das Virus-assembly und das Knospen (Abb. 1-4) ist es essentiell, dass die Zahl an CD4 Molekülen auf der Plasmamembran sinkt, um Interaktionen mit dem neu-synthetisierten gp120 zu vermeiden. In diesen Prozess sind HIV-1 Nef, Env und Vpu involviert. In der frühen Phase der Replikation forciert Nef die Endozytose und anschließend die Degradation von CD4 und MHC Klasse I und II Molekülen an der Oberfläche (Das, 2005). In der späten Phase fängt das gp160, der Vorläufer der Virushülle, die neu-synthetisierten CD4 Moleküle im endoplasmatischen Retikulum ab. Vpu induziert die Degradation der CD4 Moleküle und entlässt die gp160 Moleküle, um somit die Reifung zu ermöglichen (Willey, 1992; Schubert, 1996; Iwatani, 1997). Vpu formt zusätzlich Ionen leitende Kanäle, die die Freisetzung der Viren erhöhen (Ewart, 1996; Bour, 1999). Das *budding* löst die Aktivierung der PR aus, die autokatalytisch die Gag und Gag-Pol Polyproteine spaltet, wodurch die Strukturproteine (p17^{MA}, p24^{CA}, p7^{NC}) und die Enzyme (IN, RT) freigesetzt werden. Das p24^{CA} und p7^{NC} formen das konische Nucleokapsid, und p17^{MA} bleibt assoziiert mit der viralen Hülle (Ehrlich, 2001; Wilk, 2001; Lanman, 2002; Briggs, 2003).

1.1.1.2 Latenz von HIV-1

Die Infektion von ruhenden oder naiven CD4⁺T-Zellen, Makrophagen oder mononukleäre Zellen durch HIV-1 resultiert in einer nicht produktiven latenten Infektion (Chun, 1997; Tamalet, 1997; Wong, 1997; Chun, 2000; Sharkey, 2000). Die molekularen Mechanismen, die dazu führen, dass ein Virus seinen Lebenszyklus unterbricht oder fortführt sind bislang unklar. Zwei Formen der Latenz von HIV-1 in ruhenden CD4⁺T-Zellen können unterschieden werden: (i) eine labile Präintegrationsform und (ii) eine stabile Postintegrationsform (Chun, 1997; Blankson, 2000; He, 2002; Hermankova, 2003). Sogar unter HAART (*highly active antiretroviral therapy*), die erfolgreich die Virämie im Plasma auf eine undetektierbare Menge reduziert, bleiben Viren latent in Zellen (Tamalet, 1997; Wong, 1997; Zhang, 1999; Chun, 2000; Sharkey, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur Wildtyp-Viren, sondern auch resistente Varianten in Reservoirs, wie z.B. in den Lymphknoten persistieren. Obwohl die Zahl der latent mit replikationskompetenten Viren infizierten Zellen relativ gering ist, scheint die Menge ausreichend zu sein, um eine lebenslange Persistenz in den mit antiretroviralen Medikamenten behandelten Patienten zu garantieren (Finzi, 1999; Ramratnam, 2000; Siliciano, 2003). Bis heute ist die Latenz von HIV-1 die größte Hürde, die genommen werden muss, um das Virus aus dem Patienten gänzlich zu eliminieren (Chouquet, 2002).

1.1.2 Immunantwort und Genpolymorphismen in der HIV-1 Infektion

Der Hauptgrund für das Fortschreiten von AIDS in HIV-1 infizierten Patienten ist der Abfall der CD4⁺ T-Lymphozyten, die das primäre Ziel für HIV darstellen und essentiell für die Induktion einer spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort sind. Als eine Folge der langsamen aber kontinuierlichen Depletion der CD4⁺ T-Lymphozyten während des Infektionsverlaufs wird der Patient anfällig für opportunistische Infektionen, die schließlich zum Tod führen.

1.1.2.1 Der Verlauf der HIV-1 Infektion

In ungefähr 50 % der Fälle verläuft die primäre HIV-1 Infektion asymptomatisch, die anderen 50 % der Patienten entwickeln in den ersten vier Wochen nach Infektion Grippe-ähnliche Symptome. Während der Primärinfektion sind die Virustiter im peripheren Blut extrem hoch (bis zu 10⁸ HIV-1 RNA Kopien /ml Plasma) und die Zahl der CD4⁺ T-Lymphozyten sinkt signifikant ab (Piatak, 1993) (Abb. 1-5). Der Beginn der HIV-1 spezifischen zellulären Immunantwort und die anschließende Synthese von HIV-1 spezifischen Antikörpern führen zur Abnahme der Viruslast im Plasma bis auf einen Patienten-spezifischen Wert und zur Chronifizierung der Infektion.

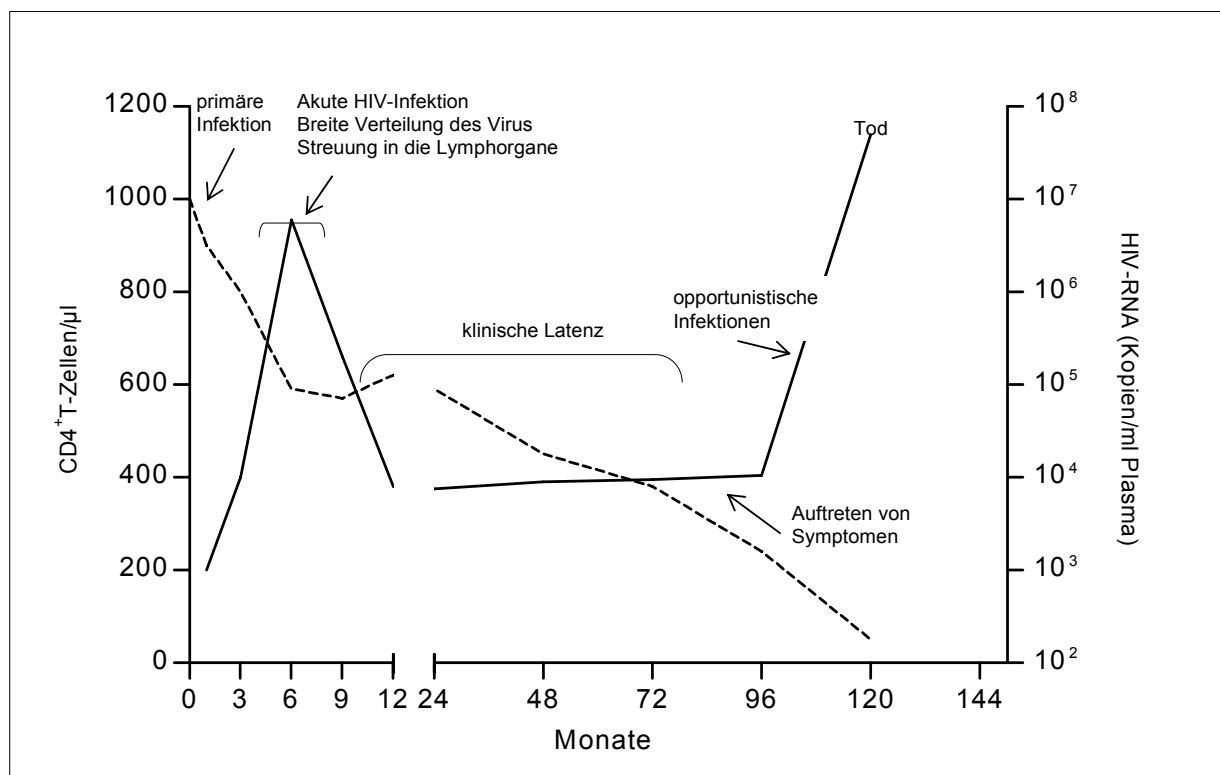


Abbildung 1-5: Schematischer Verlauf der HIV-Infektion. Dargestellt sind die Anzahl der CD4⁺T-Zellen im Blut und die HIV-RNA Kopienzahl im Plasma. (nach Coffin et al., 1997)

Die asymptomatische Phase der Infektion wird begleitet von persistierender Virusreplikation in den Lymphknoten und einer schnellen Abnahme von Plasmavirionen und CD4⁺ T-Lymphozyten, die so genannte klinische Latenzphase (Embreton, 1993; Pantaleo, 1993; Ho, 1995; Wei, 1995). Während des Verlaufs der klinischen Latenz nimmt die Zahl der CD4⁺ T-Lymphozyten stetig ab. Als Folge davon ist das Immunsystem des Patienten nicht mehr fähig, opportunistische Infektionen zu kontrollieren und lebensbedrohende AIDS-definierende Krankheiten treten auf. Die verschiedenen Stadien der HIV-1 Infektion werden nach dem CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) System klassifiziert. Dieses System kombiniert klinische Daten und die Zahl der CD4⁺ T-Lymphozyten, um die HIV-1 Infektion zu klassifizieren.

1.1.2.2 Zelluläre Immunantwort

Während der primären Infektion und normalerweise vor der Serokonversion, findet die Aktivierung von HIV-1 spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten (*cytotoxic T-Lymphocytes*, CTL) statt. Die CTL-vermittelte Lyse spielt eine große Rolle in der Kontrolle der Virusreplikation. Mit quantitativen Techniken konnte gezeigt werden, dass die Zahl der HIV-1 spezifischen CTL invers mit der Viruslast korreliert (Ogg, 1998). Es gibt verschiedene Mechanismen für die CTL-vermittelte Virus-Inhibition. CTL erkennen die HIV-1 infizierten und antigenpräsentierenden Zellen über den T-Zell Rezeptor (TCR). Die CTL-TCR binden an

virale Peptide, die an MHC Klasse I assoziiert auf der Zelloberfläche der infizierten Zelle präsentiert werden. Diese Bindung induziert die Freisetzung von Proteasen und Perforinen, was zur Lyse der infizierten Zelle führt. Ein zweiter Mechanismus ist die Interaktion des Fas Liganden (FasL) auf der CTL Oberfläche mit Fas Molekülen auf den Zielzellen, was in der apoptotischen Lyse der infizierten Zelle endet (Hadida, 1999). Neben der Lyse der Zellen induziert die Bindung von CD8⁺ T-Lymphozyten an infizierte Zellen die Freisetzung von nicht cytotoxischen, antiviral wirkenden Komponenten, wie z.B. Interferon- α (Meylan, 1993) und der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES (Wagner, 1998). Diese Chemokine sind die natürlichen Liganden des HIV-1 Korezeptors CCR5. Es konnte gezeigt werden, dass sie fähig sind, die Infektion von CD4⁺ T-Lymphozyten durch R5 HIV-1 Stämme zu verhindern (Cocchi, 1995). Darüber hinaus wurde ein weiterer, bislang nicht identifizierter, löslicher, antiviraler CD8 Faktor (CAF) entdeckt, der von CD8⁺ T-Lymphozyten sezerniert wird. Die zentrale Rolle der CD8⁺ T-Lymphozyten - die Kontrolle der viralen Replikation -, wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Langzeitüberlebende („Long-Term Nonprogressors“, (LTNP)) häufig besonders starke qualitative und quantitative HIV-1 spezifische CTL Antworten zeigen (Migueles, 2002). So konnte gezeigt werden, dass besonders exponierte, aber seronegative Personen detektierbare Mengen an HIV-1 spezifischen CTL haben (Bernard, 1999). Ob die beobachtete CTL Antwort der primäre Grund für die Prävention vor Serokonversion und Chronifizierung in diesen Personen ist, muss noch geklärt werden.

1.1.2.3 Humorale Immunantwort

Entscheidend für die Antikörper-vermittelte Reduktion der viralen Partikel ist mehr der Anteil an neutralisierenden Antikörpern, als die Gesamtmenge an spezifischen Antikörpern. Durch die Bindung neutralisierender Antikörper an virale Partikel wird die Inkorporation und die Zerstörung der Virionen durch Phagozytose vermittelt. Tatsächlich sind Seren HIV-1 infizierter Patienten nicht im Stande, die virale Infektiösität *in vitro* signifikant zu reduzieren (Kostrikis, 1996). Zusätzlich konnte keine Korrelation zwischen der Menge an mütterlichen, neutralisierenden Antikörpern in infizierten Schwangeren und der Rate der vertikalen HIV-1 Transmission beobachtet werden (Hengel, 1998). Die antivirale Aktivität neutralisierender Antikörper gegen das gp120 Glykoprotein wird häufig durch mutationsbedingte Konformationsänderungen von gp120 (Wrin, 1994) und/oder durch modifizierte Glykosylierungsmuster des gp120 (Wei, 2003) wirkungslos. Trotz der Vielzahl antiretroviraler Mechanismen hat das Immunsystem der meisten Menschen weder die Fähigkeit, die Chronifizierung der HIV-1 Infektion zu verhindern, noch die HIV-1 infizierten Zellen zu eliminieren. Die extrem hohe Mutationsrate von HIV-1 (Callego, 2001) führt zur Entstehung neuer Virus-Stämme, die der CTL-Erkennung durch Aminosäure-Austausche in viralen

Epitopen entkommen (Phillips, 1991). Als Folge werden die Neuinfektion von CD4⁺ T-Zellen und die Virusreplikation weiterhin stattfinden, was zum Zusammenbruch des Immunsystems und zum Tod führt.

1.1.3 Die Wirtsgenetik in der HIV-1 Infektion

Neben der Pathogen-spezifischen Immunantwort, beeinflussen Wirtsfaktoren den Verlauf der HIV-1 Infektion stark.

1.1.3.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC)

MHC Moleküle binden prozessierte Pathogen-abgeleitete Peptide und präsentieren diese auf der Zelloberfläche. Die spezifische Erkennung dieser Peptide auf infizierten Zellen führt zur Lyse der präsentierenden Zelle. MHC Klasse-II Moleküle präsentieren den CD4⁺ T-Lymphozyten Antigenpeptide. Die humanen MHC Moleküle werden HLA (human leukocyte antigen) genannt. Studien mit HIV-1 infizierten LTNP zeigten eine erhöhte Frequenz der spezifischen HLA Klasse-I (HLA-A1, HLA-A2, HLA-B14, HLA-B17, HLA-B27) und HLA Klasse-II (HLA-DR5, HLA-DR6) Allele (Magierowska, 1999). Im Gegensatz dazu waren in Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf die Allele HLA-B35, HLA-DR1, HLA-DR3 und HLA-DQ1 häufiger zu finden (MacDonald, 2000). Ein weiterer Vorteil für HIV-1 infizierte Patienten ist ein heterozygoter Genotyp im HLA-A, -B, -C Lokus; der Grund ist vielleicht eine breitere Aufstellung von HIV-1 Peptiden und als Konsequenz daraus ein größeres Repertoire an spezifischen CTL (Carrington, 1999).

1.1.3.2 HIV-1 Korezeptoren

Die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 sind die wichtigsten Korezeptoren für die HIV-1 Infektion *in vivo* (Clapham, 2002). Es wurde gezeigt, dass die natürlichen Liganden für CXCR4 (SDF-1) und CCR5 (MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES) sehr effizient X4-trope beziehungsweise R5-trope HIV-1 Stämme inhibieren (Oberlin, 1996). Die initiale Infektion erfolgt durch HI-Viren, die den CCR5 Korezeptor benutzen; in 50-60 % der Patienten tauchen im Verlauf der Infektion Viren auf, die fähig sind, den CXCR4 Korezeptor zu nutzen. Das Vorhandensein von X4-Viren korreliert mit dem Fortschreiten der Krankheit (Asjo, 1986; Tersmette, 1989; Schuitemaker, 1992; Koot, 1993; Karlsson, 1994; Connor, 1997; Kupfer, 1998). Es wurden bislang verschiedene Polymorphismen im CCR5-Gen identifiziert, die funktionelle Konsequenzen für die HIV-1 Pathogenese haben (Carrington, 1999). Eine 32 bp Deletion im Exon des CCR5-Gens (CCR5-delta32) führt zu fast vollständigem Schutz vor einer HIV-1 Infektion bzw. zu einem langsameren Verlauf von AIDS in Patienten, die in

diesem Allel homozygot sind (Dean, 1996; Huang, 1996; Liu, 1996; Samson, 1996; Michael, 1997). Weitere Punktmutationen in der kodierenden Region und der Promotorsequenz des CCR5-Gens wurden identifiziert. Der Phänotyp eines anderen Chemokinrezeptors (CCR2 V64I) ist assoziiert mit einem langsameren Verlauf von AIDS (Smith, 1997; Kostrikis, 1998). Da CCR2 nur von sehr seltenen HIV-1 Varianten verwendet wird, vermutet man, dass eine CCR2 V64I vermittelte Erniedrigung der CCR5 Expression die Ursache für den positiven Effekt auf den Infektionsverlauf ist (Nakayama, 2004).

1.2. Antiretrovirale Therapie

Mit der Entdeckung der Korrelation erhöhter Viruslasten im Plasma und dem Fortschreiten der Krankheit (Mellors, 1996) wurde der therapeutische Schwerpunkt auf die Reduktion der Plasma-Virämie gelegt. Theoretisch stellen alle Schritte im viralen Lebenszyklus Ziele für eine antiretrovirale Therapie dar. Heutzutage werden in der klinischen Praxis drei Hauptgruppen von Medikamenten benutzt. Dazu gehören Inhibitoren der Reversen Transkriptase (Nukleoside / Nukleotide, NRTI, und nicht Nukleoside, NNRTI) und die Proteaseinhibitoren (PI). Seit kurzem wird der erste Fusionsinhibitor (FI) Enfuvirtide (T-20/Ro 29-9800; Fuzeon®, Trimeris/Roche), somit die vierte Klasse von Therapeutika, zur Behandlung von Patienten verwendet. Die aktuelle therapeutische Strategie (HAART) beruht auf der Verwendung von Therapeutika aus mindestens zwei verschiedenen Klassen (Yeni, 2004). In der Mehrzahl der HIV-1 infizierten Personen führt HAART zu einer Erhöhung der CD4⁺-Zellzahl und zu einer Reduktion der Virämie, die für Jahre aufrechterhalten werden können (Finzi, 1998; Yerly, 2000). Der Langzeit-Erfolg von HAART ist limitiert durch Resistenzbildung, ernste Nebenwirkungen, pharmakokinetische Interaktionen oder der Compliance des Patienten (d'Arminio-Monforte, 2000; Duran, 2001; Tuldra, 2001; Carrieri, 2003). Daraus ergibt sich eine hohe Belastung für den Patienten. Eine vollständige Elimination (Eradikation) aller Viren und damit eine Heilung ist bisher nicht möglich. Das Virus kann trotz Therapie persistieren, z.B. in den Lymphknoten oder im Gehirn. Dort kann es die HIV-Enzephalopathie (Denkstörungen, Störungen des Bewegungsapparats und Verhaltensänderungen) bis hin zur HIV-assoziierten Demenz verursachen. Im Moment werden viele potentielle neue Medikamente untersucht, unter anderem Protease-Inhibitoren (L-731, 988 und S-1360), Komponenten die mit Tat/TAR interagieren (EM2487, tamacrazine, CGP 64222 oder CGA 137053) (Barbaro, 2005), Reifungsinhibitoren (PA-457, DSB) (Yu, 2005), NC-Inhibitoren (Goel, 2002), Inhibitoren der CD4-gp120 Interaktion (zintevir, FP-21399, BMS-378806) (Trkola, 2001; Zhu, 2001; Lin, 2002), CXCR4 Korezeptorblocker (AMD3100; AMD3465), Antagonisten des CCR5 Korezeptors (TAK-779 und NSC 651016) (Kazmierski, 2003) oder neue Fusionsinhibitoren (T1249) (Kilby, 2003; Greenberg, 2004).

1.2.1 Gentherapie

Gentherapie wurde zum ersten Mal vor fast 30 Jahren als eine Methode beschrieben, um Zellen auf molekularer Ebene zu manipulieren und somit genetische Erkrankungen wie Zystische-Fibrose, Phenylketonurie und Krebs zu heilen (Friedman, 1972). Nach großen Fortschritten in der Erforschung von Krebs, von Viren und Bakterien und der Charakterisierung von humanen, genetischen Erkrankungen, wurden virale Vektoren als die geeigneten Vehikel für den Transfer von Genen in Zellen erachtet. Dieser Gentransfer sollte in den Zellen den korrekten Phänotyp induzieren. Der Transfer großer genetischer Sequenzen in Zellen erweist sich als fundamentales Problem, denn DNA ist negativ geladen und wird nicht einfach durch die Plasmamembran geschleust. Deswegen musste und muss viel Aufwand in die Entwicklung und Produktion geeigneter Vektorsysteme investiert werden (Wilson, 1997; Clesham, 1998).

1.2.1.1 Vektoren und Vektorsysteme

Replikationsdefiziente Viren scheinen die idealen Gentransfersysteme zu sein. Sie können Zellen infizieren, umgehen teilweise Immunantworten und exprimieren ihr Genom in den Wirtszellen (Morgan, 1997). Eine Reihe viraler Vektoren, einschließlich Retroviren, Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren, wurden in Studien untersucht. Grundsätzlich wurden alle Gene, die für virale Replikation und für die Herstellung von Strukturproteinen nötig sind, deletiert und durch die Transgen-Expressionskassette ersetzt. Zusätzlich wurden nicht-virale Transfersysteme entwickelt, bei denen es sich um kationische Liposomen-DNA Komplexe (Caplen, 1995) handelt, die potentiell die Applikation von wesentlich größeren DNA Fragmenten erlaubt und nicht wie die viralen Vektoren mit möglichen Immunantworten assoziiert sind. Der direkte Transfer von Plasmid-DNA in das Zielgewebe bildet eine weitere Möglichkeit für die Applikation. Bislang war diese Strategie jedoch durch geringe Transfereffizienzen eine wenig erfolgversprechende Alternative.

1.2.1.2 Retrovirale Transfersysteme

Retroviren haben Tropismen für eine Vielzahl von Vertebraten und können diverse Krankheiten, wie z.B. Pneumonie, Leukämie und AIDS verursachen (Russ, 1996). Retroviren sind die meist verbreiteten viralen Systeme in der Gentherapie. Der am häufigsten verwendete Vektor ist das Moloney-murine-Leukämie-Virus (MoMuLV) (Blesch, 2004). Die Fähigkeit, ihr Genom in die Wirtszelle zu integrieren, macht Retroviren zu exzellenten Gentherapie-Vektoren. Die für den Zusammenbau, die RNA-Polymerase und die virale Hülle kodierenden Gene *gag*, *pol* und *env* werden entfernt und durch die Expressionskassette für das Transgen ersetzt. Durch Transfektion von Verpackungszellen mit dem rekombinanten

Plasmid und zwei weiteren Plasmiden, die für Gag-Pol und Env kodieren, werden die retroviralen Partikel produziert (Abb. 1-6).

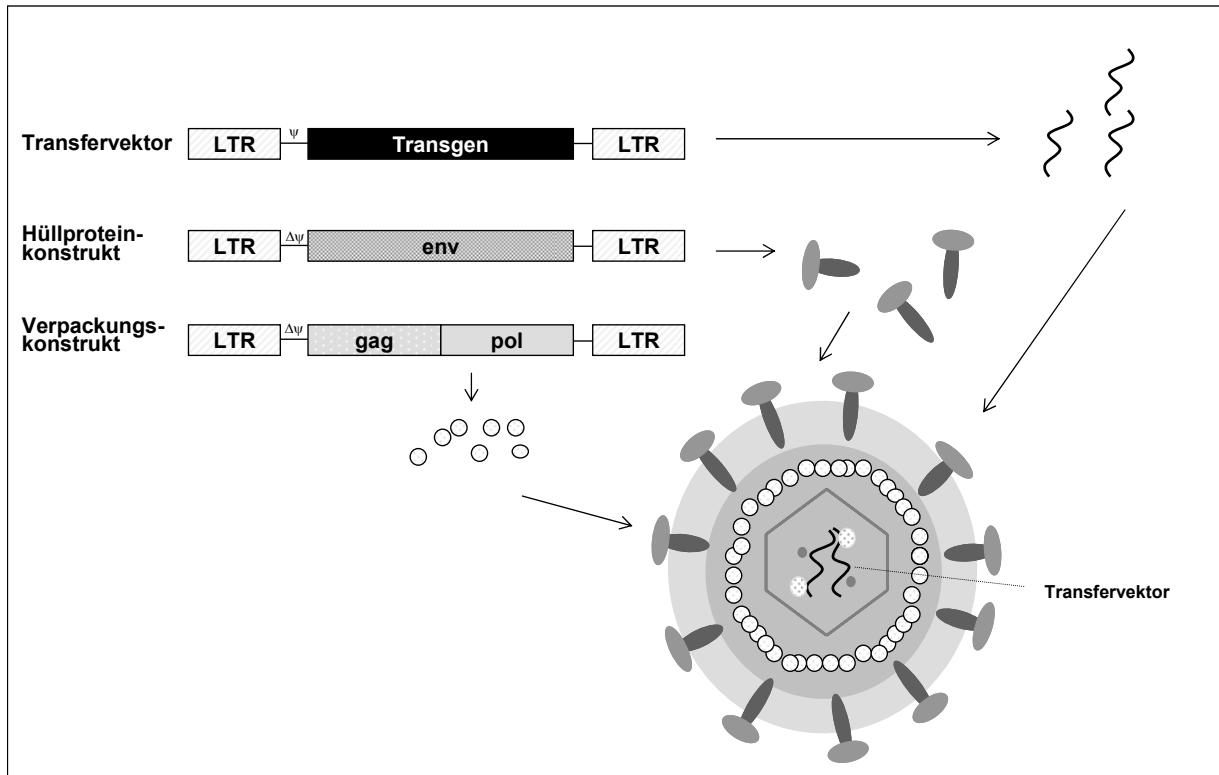


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Bestandteile eines retrovirusvektors und der Aufbau eines Vektorpartikels. Der Transfervektor, der das Transgen überträgt, besitzt ein Verpackungssignal (ψ). Den Vektoren, die für die Strukturproteine (Verpackung) und das Hüllprotein kodieren, fehlt das Verpackungssignal. Aus den Struktur- und Hüllproteinen wird der virale Partikel gebildet, in den die RNA des Transfervektors verpackt wird.

Retrovirale Partikel können durch Verwendung diverser Hüllproteine pseudotypisiert werden, darunter auch mit Hüllproteinen entfernt verwandter Viren, wie z.B. dem Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV). Das Hüllprotein des VSV vermittelt die Transduktion eines breiten Zielzellspektrums, während das des Gibbonaffen Leukämie Virus (GaLV) besonders den Gentransfer in hämatopoetische Zellen vermittelt (Yang, 2006).

1.2.2 HIV Gentherapie

Trotz vieler Bemühungen konnte bislang noch keine schützende Vakzinierung gegen die HIV-Infektion entwickelt werden, und bis dahin ist die medikamentöse Behandlung der Infektion die einzige derzeit mögliche Therapieform. Der Erfolg von HAART hat die Frage aufgeworfen, ob die Entwicklung und Forschung an einer AIDS-Gentherapie noch nötig ist. Wieso teure Studien, zusätzliche Risiken und potentiell unpraktikable Behandlungen, wenn die pharmakologische Behandlung dauerhafte Remission erzielt? Wenn HAART kurativ, kostengünstig und ohne signifikante Toxizität wäre, dann wären diese Argumente überzeugend. HAART ist nicht vollständig erfolgreich und hat zudem problematische Nebenwirkungen. Zudem treten immer mehr resistente Virusvarianten auf (Wensig, 2003;

Tamalet, 2003), sogar in Lymphknoten von Patienten, die mit HAART behandelt werden (Lafeuillade, 2001). Studien zu Therapiepausen, die gemacht werden, um den Patienten Ruhepausen von den beschwerlichen Nebenwirkungen zu ermöglichen, haben gezeigt, dass HAART nicht effektiv unterbrochen werden kann, auch nicht kurzfristig (Dybul, 2003; Lambotte, 2004). Gentherapie kann die Pharmazie vielleicht nicht vollständig ersetzen, aber dennoch eine wichtige Rolle spielen.

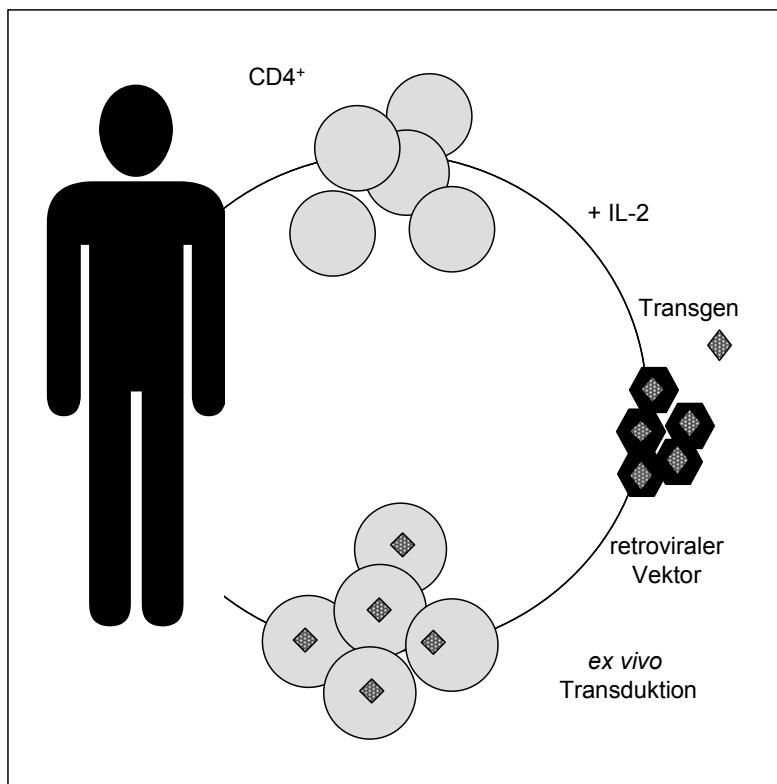


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der ex vivo Transduktion von CD4⁺-T-Zellen durch retrovirale Vektoren. Dem Patienten werden durch Lymphapharese PBMCs (*primary blood mononuclear cells*) entnommen. Anschließend werden die CD8⁺-T-Zellen depletiert und die verbleibenden CD4⁺-T-Zellen für 3-5 Tage mit IL2 stimuliert. Die Zellen werden durch retrovirale Vektoren, die das oder die Transgene enthalten transduziert. Die transduzierten Zellen werden angereichert und den Patienten reinfundiert. Die Behandlung kann mit leichtem Fieber und Schüttelfrost assoziiert sein.

Eine gentherapeutische Behandlung von HIV-Infektionen erfolgt über eine ex vivo Transduktion von CD4⁺-T-Zellen bzw. der CD21-Vorläuferzellen. Dafür werden über Lymphapharese PBMCs (peripherie mononukleäre Zellen) gewonnen. Die CD4⁺-T-Zellen werden durch Depletion der CD8⁺-T-Zellen angereichert (Abb. 1-7). Die Proliferation wird durch Zugabe von IL2 und anti-CD3 induziert. Die angereicherten Zellen werden durch retrovirale Vektoren, die das therapeutische Gen beinhalten, transduziert. Die genmodifizierten T-Zellen werden wiederum expandiert, um anschließend die mindestens nötigen 1×10^9 Zellen dem Patienten zu reinfundieren.

Im Verlauf einer HIV-Infektion nimmt nicht nur die Zahl der CD4⁺-T-Zellen ab, sondern auch ihre Variabilität. Um das Immunsystem eines HIV-positiven Patienten zu rekonstituieren, wäre es von Vorteil CD4⁺-T-Zellen bereits vor einer Infektion oder in der asymptomatischen Phase der Infektion zu entnehmen und zu kryopräservieren. Ein Vorteil dieser frühen

Lymphapharese ist, dass das T-Zellrepertoire wahrscheinlich noch zum größten Teil vorhanden ist. *In vivo* Studien zur Gentherapie von HIV werden häufig mit eineiigen Zwillingen durchgeführt, von denen einer seropositiv und der andere seronegativ ist.

Stetig wird an neuen effektiven Gentransfer-Methoden für die Behandlung der HIV-1 Infektion gearbeitet. CD4⁺-Zellen sind die Zellen, die für eine Gentherapie im Fall von HIV die größte Rolle spielen. Auf Grund der relativ kurzen Lebensphase dieser Zellen (maximal 500 Tage, bei Gedächtniszellen mehrere Jahre), muss versucht werden, die CD34⁺ Vorläuferzellen zu behandeln (Rosenzweig, 1997; Scherr, 2002). Für viele Transgene konnte gezeigt werden, dass sie die HIV-1 Replikation *in vivo* inhibieren. Doch bislang ist es eine große Herausforderung, solche Modelle in die klinische Praxis umzusetzen. Die letzten Entwicklungen auf diesem Gebiet geben neue Hoffnung, dass Gentherapie für die Behandlung von HIV-infizierten Patienten eine wichtige Rolle spielen wird.

1.2.2.1 Entwicklung potenter anti-HIV-1 Transgene

Das Prinzip des Gentransfers zur Expression eines Genprodukts und zur Inhibition von HIV-1 wurde 1988 zum ersten Mal beschrieben (Baltimore, 1988). Der Replikationszyklus von HIV-1 ist an verschiedenen Punkten angreifbar (siehe Abb. 1-8). Eine große Zahl an Transgenen wurde entwickelt, die auf unterschiedliche Weise gegen HIV wirken und konstitutiv oder über konditionelle Promotoren exprimiert werden können (Lori, 2002; Poluri, 2003). Anti-HIV-Gene werden nach den Angriffspunkten im Replikationszyklus in drei Klassen unterteilt: (I) Eintritt des Virus in die Zelle bis zur Integration in das Wirtsgenom, (II) Transkription, RNA-Export, Translation, (III) Zusammenbau des Virions, Freisetzung und Maturation (Abb. 1-8).

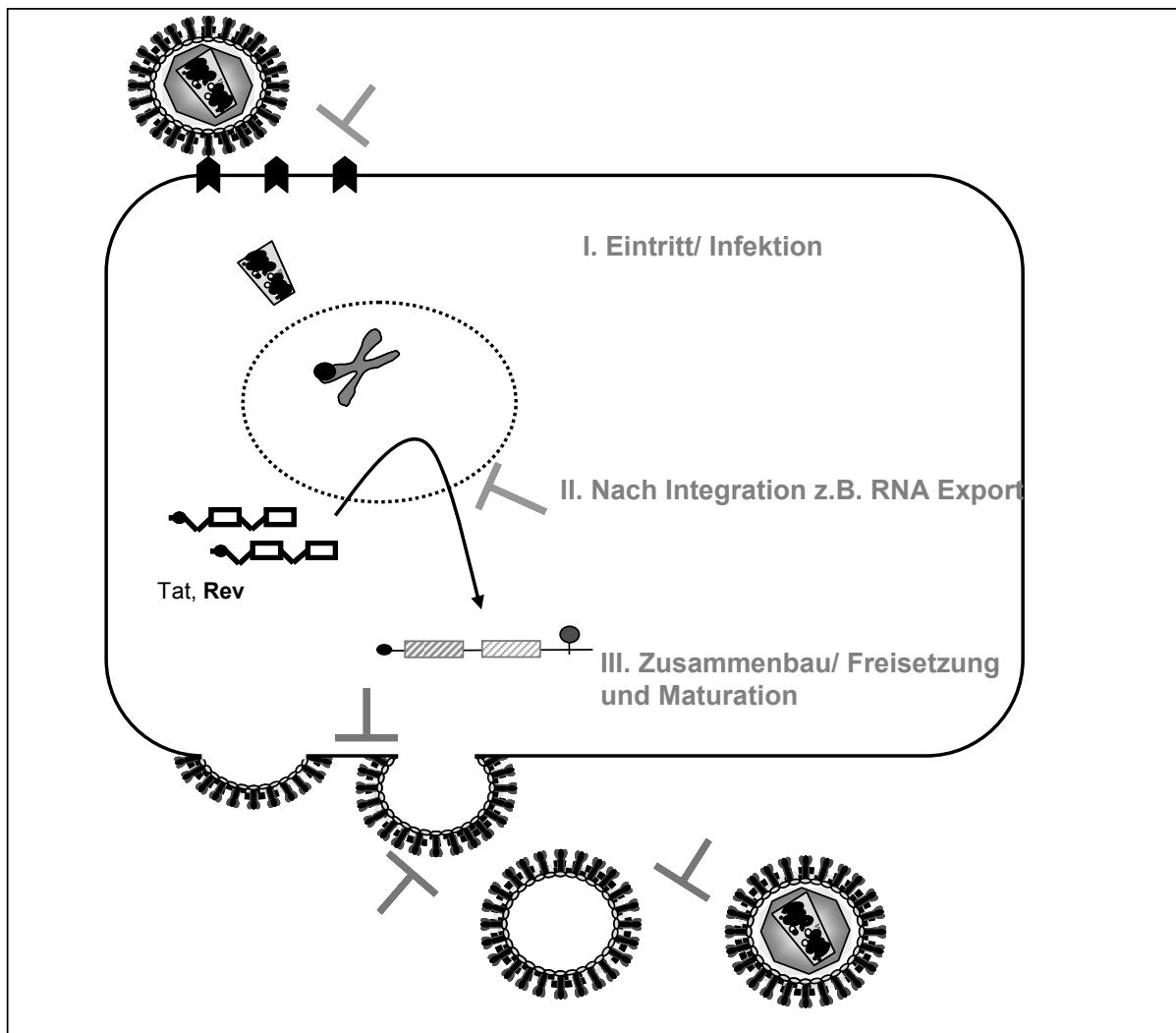


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des HIV-viralen Replikationszyklus und die Klassifizierung der Transgene Anti-HIV
 Transgene können nach ihrer Wirkung in drei Klassen unterteilt werden: Klasse I: die frühe Phase; Eintritt und Infektion der Zelle; Klasse II: nach Integration; Klasse III: Zusammenbau, Freisetzung und Maturation.

1.2.2.2 Protein-Strategien

Die meisten humanen Gentherapie Studien wurden mit auf Protein-basierenden Strategien durchgeführt (Dornburg, 2000). Zu den Proteinen, die entwickelt wurden, um HIV-1 zu inhibieren, gehören transdominant negative Mutanten, Intrakine, Toxine, *Single-Chain* Antikörper und DNA-basierende Vakzine. Das erste transdominante Derivat eines HIV-1 Proteins, welches die HIV-1 Replikation inhibierte, eine Gag-Mutante (Trono, 1989), inspirierte das Design von weiteren homologen transdominanten HIV-1 Proteinen. RevM10 war das erste transdominante Protein, das in humanen Studien getestet wurde (Woffendin, 1996; Ranga, 1998). Es verhindert zwei Funktionen, zum einen die Fähigkeit an das RRE zu binden und zum anderen Rev-Multimere zu bilden. Intrazelluläre Toxine oder konditionell toxische Proteine, wie z.B. die Herpes Simplex Thymidinkinase (Smith, 1996), das Diphtherie Toxin (Curiel, 1993) und sogar modifizierte lytische Viren, wurden als Therapie gegen HIV-1 entwickelt (Schnell, 1997; Mebatsion, 1997). HIV benutzt den CD4 Rezeptor und einen Chemokin-binde-Rezeptor, um Zellen zu infizieren. Durch intrazelluläre Expression von SDF-

1, dem Liganden von CXCR4, oder Expression von RANTES oder MIP-1 α , Liganden des CCR5, können die Rezeptoren intrazellulär blockiert und die Zahl der Rezeptoren an der Oberfläche reduziert werden (Chen, 1997; Yang, 1997). CD4, intrazellulär exprimiert, kann auch genutzt werden, um eine HIV Infektion zu verhindern (Buonocore, 1993). Intrazelluläre, HIV-spezifische *single-chain* Antikörper können gegen essentielle HIV Proteine gerichtet werden, diese von den subzellulären Kompartimenten fernhalten und deren Funktion bzw. die Prozessierung eines solchen Proteins, wie z.B. gp120, Rev, Gag, RT oder IN, verhindern (Levin, 1997; Rondon, 1997; Levy-Mintz, 1996).

1.2.2.3 RNA Strategien

Antisense-Strategien, Ribozyme, RNA-Aptamere, *decoy* und *small interfering RNA* (siRNA) gehören zu den RNA Ansätzen in der HIV-1 Gentherapie. Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass Antisense-Moleküle, wenn sie gegen kritische HIV-1 Gene wie *tat*, *rev* und/oder IN gerichtet sind, HIV-1 *in vitro* inhibieren (Goodchild, 1988; Buck, 1990; Lisziewicz; 1994). RNA *decoys* sind, ähnlich wie TAR und RRE, RNA Homologe, die virale Proteine binden und mit den nativen Liganden, die für die Replikation nötig sind, konkurrieren (Sullenger, 1990; Morgan, 1996). Zur zweiten Generation RNA-basierten Antisense-Transgenen gehören Ribozyme -RNA Moleküle die RNA an spezifischen Sequenzen schneiden- und Aptamere (Sarver, 1990; Martinez, 2002; Qin, 2003). siRNAs bieten eine weitere Möglichkeit, die HIV-1 Replikation zu inhibieren (Jaque, 2002). Sowohl für die erste als auch für die zweite Generation RNA-basierter Strategien ergibt sich das Problem der Resistenzbildung (Das, 2004).

Der *in vitro* Schutz hängt normalerweise von der Menge an Viren ab: viele Transgene sind bei einer geringen Virus-Dosis sehr effektiv, allerdings lässt der Schutz bei steigender Menge nach. Am wichtigsten aber ist, ob man den *in vitro* Schutz auf die *in vivo* Situation übertragen kann.

Einige generelle Prinzipien können jedoch festgehalten werden: (i) Transgene, die gegen HIV Gene gerichtet sind, funktionieren am besten, wenn sie gegen hochkonservierte Regionen gerichtet sind, (ii) Kombinationen von Transgenen, die verschiedene Stellen des HIV Zyklus inhibieren, sind wirksamer als individuelle Transgene (Strayer, 2002).

1.2.2.4 Inhibition der Infektion der Zelle

Der Infektionsprozess von HIV-1 wird durch die beiden *envelope* Proteine gp120 und gp41 vermittelt. Das Glycoprotein gp120 bindet nicht-kovalent durch hydrophil-hydrophobe Wechselwirkungen an das Transmembran-Protein gp41, die viralen Hüllproteine bilden dabei trimere Komplexe in streng asymmetrischer Anordnung auf der Oberfläche des Viruspartikels

aus. Nach Bindung von gp120 an den CD4- und den Korezeptor kommt es zu multiplen Konformationsänderungen des *Envelope*. Das Ergebnis ist die Insertion des gp41 hydrophoben N-terminalen Fusionspeptides in die Membran der infizierten Zelle (Eckert, 2001). Das T20 Peptid, das mit dem C-terminalen Heptamer des gp41 überlappt, ist ein effizienter Fusionsinhibitor und wird bereits in klinischen Studien erprobt (Carr, 2003; Baldwin, 2003). T20 verhindert die Konformationsänderung, welche normalerweise aus einer Formation von sechs Helices aus drei Sets N- und C-terminaler Heptamere besteht. Wenn das T20 als membranverankertes Peptid auf der Oberfläche von PM1-Zellen (Lymphozyten) präsentiert wird, ist der HIV-1 Eintritt in die Zelle effizient verhindert (Hildinger, 2001). Ein retroviraler Vektor, das Peptid selbst und das Gerüst zur Verankerung wurden auf maximale Expression und Präsentation auf der Oberfläche optimiert. Das membrangebundene C-Peptid bindet an freies gp41 N-Peptid, was schließen lässt, dass der biologische Effekt auf der Bindung des gp41 beruht (Egelhofer, 2004). Obwohl zwangsläufig resistente Varianten auftreten werden (Baldwin, 2004) und bereits gegen T20 durch Punktmutationen resistent gewordene HIV-Varianten identifiziert wurden (Lohrengel, 2005), liegt viel Hoffnung für die anti-HIV-1 Therapie in den *entry*-Inhibitoren, denn bislang konnten noch keine Varianten gefunden werden, die gegen die optimierte Form des T20 (M870) resistent sind.

1.2.3 Probleme der HIV Gentherapie

Der Erfolg einer HIV-Gentherapie ist von zwei Voraussetzungen abhängig: (i) dem effizienten Gentransfer in die Zielzellen und (ii) der genetischen Information, die verabreicht wird. CD4⁺T-Zellen sind die Zellen, die bei einer Gentherapie von HIV behandelt werden. In einer klinischen Studie wurden vier Patienten CD4⁺T-Zellen durch Lymphapharese entnommen und mittels eines lentiviralen Vektors (VRX496), der ein antisense-Env enthielt, transduziert. Alle vier Patienten zeigten nach autologer Zellinfusion eine Reduktion der Viruslast, die bis zu 12 Monaten anhielt (Humeau, 2004). Da die Lebensspanne von CD4⁺T-Zellen jedoch relativ kurz ist (maximal 500 Tage), ist eine Behandlung der CD34⁺ Vorläuferzellen von entscheidendem Vorteil. In einer dazu veröffentlichten Studie wurden Patienten CD34⁺ Zellen entnommen und mit einem retrovirusen Vektor, der RevM10 und ein polAS enthielt, transduziert. Die Zahl der CD34⁺ Zellen sank allerdings nach der Transplantation. Diese Daten haben gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, Stammzellen zu transduzieren und zu reinfundieren, allerdings sind weitere Arbeiten nötig, um den Ansatz zu verbessern.

Des Weiteren sind es die Transgene, die verbessert werden müssen. So sollten einerseits Kombinationen aus verschiedenen wirksamen Transgenen verwendet werden, um der Resistenzbildung entgegenzuwirken und andererseits dürfen die verwendeten Transgene keine Immunreaktion im Patienten auslösen. Der zu erwartende Effekt von genmodifizierten Zellen auf das Virus und die T-Zell-Kinetik wurden durch mathematische Modelle errechnet

(von Laer, 2006). Da technisch bedingt nur ein kleiner Teil aller T-Zellen eines Patienten *ex vivo* manipuliert werden kann, hängt der therapeutische Erfolg von der Akkumulation der modifizierten Zellen nach Reinfusion in den Patienten durch *in vivo* Selektion ab. Solch ein signifikanter Vorteil kann nur durch Klasse I Gene vermittelt werden (vgl. Abb. 1-7), die die HIV Replikation vor der Integration inhibieren. Die meisten Studien wurden bislang jedoch mit Klasse II Genen, wie z.B. RevM10, durchgeführt, die keinen selektiven Vorteil für die transduzierten Zellen bringen. Analysen und mathematische Berechnungen zeigten, dass die Kombination aus einem Klasse I Gen und einem Klasse III Gen anderen Kombinationen in der Suppression der Viruslast nach der Transfusion überlegen ist. Ein effektiv wirksames Klasse I Gen wurde bereits identifiziert (Hildinger, 2001; Egelhofer, 2004). Transdominant negative (TD) Gag Varianten sind wie viele Klasse III Gene sehr effektive Inhibitoren der HIV Replikation (Trono, 1989; Sakai, 1995; Furuta, 1997; Shimano, 1998). Jedoch sind die bestehenden Immunantworten gegen das Transgen immer noch ein großes Problem in Hinblick auf das Überleben der transduzierten Zellen. Die Antigen-spezifischen MHC Klasse-I restriktiven CTL sind es, durch die die Zellen lysiert werden (Jooss, 1998). Frühere Versuche, die T-Zell-Antwort während der Gentherapie zu reduzieren, zielten auf eine Manipulation des Immunsystems des Patienten ab (Kolls, 1996; Kay, 1995; Yang, 1996). Diese Ansätze waren jedoch entweder nicht effektiv oder resultierten in einer generellen Immunsuppression. Eine selektive und gezielte Prävention der Präsentation von Transgenpeptiden über MHC Klasse-I wäre eine neuartige Strategie, die den Vorteil hat, gezielt nur die Immunerkennung des Transgens zu verhindern. Viren haben vielfältige Strategien entwickelt, dem proteolytischen System der Zelle und somit der Peptid-Präsentation über MHC Klasse-I zu entkommen (Fischer, 1995; Koonin, 1997). Ein besonders interessantes Beispiel für ein Protein, das den proteasomalen *pathway* blockiert, ist das Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen-1 (EBNA-1). EBNA-1 enthält eine interne Wiederholungssequenz, die ausschließlich aus Glycin und Alanin besteht. Dieser Bereich (GA) inhibiert in *cis* die Präsentation von endogenem Antigen an MHC Klasse-I restriktierte CTL (Levitskaya, 1995) und verhindert die Ubiquitin-Proteasomen abhängige Proteolyse *in vitro* (Levitskaya, 1997). Obwohl in Mononukleose-Patienten und gesunden Trägern EBNA-1 spezifische CTL gefunden wurden, können diese EBV infizierte Zellen nicht erkennen (Khanna, 1992; Munz, 2000; Blake, 2000; Rickinson, 1997).

1.2.4 HIV-Gentherapie: *status quo*

Klassische Vakzinierungsstrategien, die gegen eine Infektion mit HIV-1 schützen, sind im Moment noch nicht erhältlich. Studien, in denen die Funktion des Immunsystems durch Vakzinierung unterstützt wird, sind jedoch mit Erfolg durchgeführt worden. Derzeit ist die medikamentöse Behandlung von HIV-Infektionen die einzige Therapieform. Diese ist allerdings mit vielen, oft gravierenden Nebenwirkungen behaftet. Die HIV-Gentherapie könnte eine mögliche alternative Behandlungsform darstellen. Der Erfolg einer Gentherapie für HIV-Infektionen ist von drei entscheidenden Faktoren abhängig. Es müssen Gentransfer-Vehikel und Protokolle verwendet werden, die einen möglichst hohen Gentransfer erlauben, jedoch ohne Verlust an Funktionen der Gen-modifizierten Zellen. Die Zelltypen, die eine dauerhafte Population an geschützten Zielzellen ermöglichen, müssen identifiziert werden. Schließlich müssen die Transgene sorgfältig geprüft werden und nach Parametern, die für einen Erfolg wichtig sind, ausgewählt werden. Diese Parameter sind: die inhibitorischen Eigenschaften, die potentielle Toxizität und die Immunogenität, ein *bystander* Effekt des Genprodukts und der Schritt im viralen Replikationszyklus, der inhibiert wird. Eine besondere Herausforderung wird es sein, eine Kombination an Genen zu identifizieren, die synergistisch die Replikation von HIV in hohem Maße inhibiert, um die Möglichkeit der Resistenz gegen das antivirale Gen zu reduzieren.

Die zu Grunde liegende Arbeit ist Teil der Kooperation mehrerer Institute mit Fresenius Biotech GmbH (Bad Homburg) zu einem Netzwerk mit dem Ziel, eine wirksame Gentherapie der HIV-Infektion zu entwickeln. Es sollten gemeinsam alle Parameter des Therapieverfahrens optimiert werden. Beginnend mit der Optimierung der Bedingungen für die Entnahme und Expansion von T-Zellen (J. v. Lunzen, Hamburg), verbesserter Expression der Transgene in T-Zellen (C. Baum, Hannover) und der Entwicklung effizienterer antiviraler Gene (z.B. TDgag), die in Kombination synergistisch wirken (B. Müller, M. Dittmer, Heidelberg; D. v. Laer, Frankfurt). Die entwickelten Transgene sollten von M. Schweizer im Paul-Ehrlich-Institut (Langen) einer unabhängigen Testung unterzogen werden, um anschließend bis hin zur klinischen Prüfung gebracht zu werden.

Nur durch eine solche konzertierte Anstrengung gibt es die Möglichkeit, eine sichere und wirksame Gentherapie für Menschen mit AIDS zu entwickeln

1.3. Ziel der Arbeit

Durch die Entwicklung und Anwendung der medikamentösen Kombinationstherapie (HAART) ist es möglich, die Virusreplikation zu kontrollieren und die Lebenszeit HIV⁺-Patienten erheblich zu verlängern. Eine Vielzahl von Gründen, z.B. die Entstehung resistenter Virusstämme während der Therapie, die Nebenwirkungen und Toxizität der Medikamente und schließlich auch die Kosten, limitieren jedoch die Erfolge von HAART.

Einen neuen Ansatz bietet die gentherapeutische Behandlung von T-Lymphozyten zum Schutz dieser HIV-Zielzellen vor der Infektion mit und Replikation von HIV-1 und damit verbunden dem Erhalt ihrer immunologischen Funktion. Die Expression eines antiviralen Gens der Klasse I, d.h. eines *entry*-Inhibitors, vermittelt der Zelle dabei einen selektiven Vorteil gegenüber nicht-transduzierten Zellen, die infiziert und somit zerstört werden können. Die Kombination aus zwei oder mehr antiviralen Genen in einer Zelle bringt mehrere Vorteile mit sich: (i) der Entstehung resistenter Virusvarianten wird vorgebeugt, (ii) bei einem Versagen des Klasse I-Gens wird die Replikation des Virus an einer zweiten Stelle unterbrochen, (iii) mathematischen Berechnungen zufolge besteht die beste und sicherste Kombination aus einem Klasse I- und einem Klasse III (Zusammenbau, Freisetzung und Maturation) -Gen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung des anti-HIV-viralen Transgens *TDsyngag* für die klinische Applikation in Kombination mit einem starken *entry*-Inhibitor Gen (C46; M87o) (Egelhofer, 2004). Transdominant negative Mutationen führen zu einem Verlust der natürlichen Funktion des Wildtyp-Proteins. Gag-Varianten mit transdominant negativen Eigenschaften interferieren mit dem Viruszusammenbau und der Maturation der Virionen. Im Mittelpunkt standen dabei einerseits die Wirksamkeit der *TDsyngag*-Varianten und andererseits die Verringerung deren Immunogenität, um die *in vivo* Lyse der transduzierten Zellen durch spezifische CTL zu verhindern.

Zunächst sollte versucht werden, das kodonoptimierte, konstitutiv exprimierte Konstrukt *TDsyngag* durch Verwendung der Wildtyp-Gensequenz und / oder des HIV-LTR-Promotors von HIV-1 abhängig zu transkribieren bzw. exprimieren. Zusätzlich sollten weitere Deletionen in CTL-Epitop-reichen Regionen des Transgens eingeführt werden, um somit die Immunogenität zu reduzieren.

Des Weiteren sollte das Transgen durch die Fusion mit einem von EBNA-1 abgeleiteten 24 Aminosäuren langen Linker aus Glycin und Alanin vor dem Abbau durch das Proteasom geschützt werden um die Präsentation von Transgenpeptiden durch MHC Klasse-I Moleküle zu verhindern.

Ebenfalls aus Gründen der Reduktion der Immunogenität sollten transdominante Konstrukte (Minigene) hergestellt werden, die aus den minimalen Bereichen bestehen, welche noch zur Interaktion mit Gag fähig sind.

Die verschiedenen Strategien sollten zudem in Kombinationen getestet werden. Nach Überprüfung der Funktionalität in transienten Zellkulturversuchen, sollten mit den besten Kandidaten durch retrovirale Transduktion stabile Lymphozyten-Zelllinien generiert werden, um diese anschließend in HIV-Infektionsversuchen zu testen. Die Immunogenität der transdominanten Gag-Varianten sollte parallel im Mausmodell evaluiert werden. In dieser Arbeit sollte das effektivste und am geringsten immunogene Transgen identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien

Alle Chemikalien wurden – wenn nicht anders angegeben - von SIGMA (Deisenhofen), FLUKA Chemie (Buchs, CH) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Ansonsten werden die Herstellerfirmen der verwendeten Reagenzien, Enzyme und Chemikalien an entsprechender Stelle genannt. Die HIV-spezifischen Antikörper wurden von dem *UK Medical Research Council* (MRC) bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten HIV-spezifischen Gen- und Aminosäuresequenzen entstammen dem Klon BH10 des französischen HIV-1 Subtyp B Isolates LAI/IIIB (*accesession number*: M15654) (Ratner, 1985). Als Matrize der Klonierungen diente hierbei das Provirusplasmid pHX10, welches die provirale Sequenz von BH10 mit den flankierenden LTR-Regionen des Isolates HXB2 enthält (Ratner, 1987).

2.2. Gentechnische Arbeitsmethoden

Für Klonierungen und zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden die *Escherichia coli* K12-Stämme DH5 α (f- *supE44* Δ /*lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR1* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi1* *relA1*) {Hanahan und Meselson, 1983} und GM169 (F- *mutS453* *dam-3* *thr-1* *ara-14* *leuB6* Δ (*gpt-proA*)62 *lacY1* *tsx-33* *supE44* *galK2* *hisG4* *metB1* *rfbD1* *mgl-51* *rpsL260* *kdgK51* *mtl-1* *thi-1* *deoB16*) (McGraw, Marinus, 1980) verwendet. Die Anzucht positiver Transformanden erfolgte unter Ampicillin-Selektion (100 μ g/ml) auf LB-Agarplatten oder in LB (*Luria Bertani*) – und TB (*Terrific Broth*) –Flüssigmedien. Zur Identifikation korrekter Subklone wurden die Bakterienkolonien mittel PCR-Amplifikation (Taq PCR Master Mix, Qiagen, Düren) unter Verwendung spezifischer Primer analysiert. Zur Charakterisierung hergestellter Subklone wurde die Plasmid DNA mittel alkalischer Lyse isoliert (Birnboim und Doly, 1979). Größere Mengen eukaryontischer Expressionsplasmide für Transfektionsanalysen wurden über Nucleobond-Tip AX100 oder AX500-Säulen nach Angaben des Herstellers gereinigt (Macherey und Nagel, Düren). Die Reinheit (A_{260}/A_{280}) und Konzentration der gereinigten DNA wurde durch Messung des Adsorptionsspektrums ($A_{230}-A_{300}$) ermittelt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($1\text{ OD}_{258} = 47,5\text{ }\mu\text{g dsDNA/ml}$) berechnet. Für analytische und präparative Zwecke wurde je 1 μ g Plasmid-DNA endonukleolytisch mit Hilfe von 10 U Restriktionsendonukleasen (Roche, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach-Taunus) nach Angaben des Herstellers verdaut. Die Auftrennung der DNA- Fragmente durch Agarosegelelektrophorese (50 ng/ml Ethidiumbromid) erfolgte in 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM NaAc; 2 mM EDTA). Die Isolierung definierter DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction“-

Kits, die Aufreinigung von DNA nach Restriktionen und PCR-Amplifikationen mit Hilfe des „QIAquick Purification“-Kit (Qiagen, Düren) durchgeführt. Zur kovalenten Verknüpfung von Vektor - und Insert- DNA wurden diese im Verhältnis 1:7 nach Angaben des Herstellers mit je 10 U T4-Ligase durchgeführt (New England BioLabs, Schwalbach Taunus). Die Transformation von 1 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl des Ligationsansatzes in transformationskompetente Bakterien, hergestellt nach der RbCl-Methode, erfolgte durch die „Hitze-Schock“ Methode bei 42°C. Die Amplifikation definierter DNA-Fragmente und die Herstellung synthetischer Gensequenzen wurde unter Verwendung der Taq- *Precision* mit allgemeinen PCR-Techniken (Graf, 2000) sowie nach Angaben des Herstellers (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Das Enzym besitzt eine 3'-5'Exonuklease Aktivität („*proof-reading*“), wodurch eine fehlerfreie Amplifikation gewährleistet wird. Die Einführung von Sequenzveränderungen in doppelsträngige Plasmid-DNA (Mutation) wurde unter Verwendung des „QuickChange SiteDirected Mutagenesis“- Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Stratagene, Heidelberg). Die Sequenzen, die für die PCR verwendeten Oligonukleotide, sind an entsprechenden Stellen verzeichnet. Alle Klonierungen und eingeführten Mutationen wurden durch Sequenzanalysen nach der Methode von Sanger (Sanger, 1977) bei GENEART GmbH überprüft. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der SeqMan - Software (DNASTar). Zur Sequenzierung wurden die Vektor - bzw. Insert - spezifischen Oligonukleotide BGHr (5'-CTAGAAGGCACAGTCGAGGC TG-3'), T7f (5'-TTAACGACTCACTATAGGGAGAC-3'), pcDNA-1100r (5'-GTGGCACCTT CCAGGGTCAAG-3'), pcDNA-798f (5'-GAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTC-3'), pcDNA3-101f (5'-GGAGGTCGCTGAGTAGTG-3'), M387-1613r (5'-GCCTTATTCCAAGCGGCTTC-3'), M387-1468f (5'-GTC TGAAAATTAGCTGACAAA-3'), LTR-73r (5'-AAGTAGCCTTGTGTGT GGTAGAT-3'), polyA-f (5'-TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG-3') sowie die Gag-spezifischen Oligonukleotide HIVgag-296f (5'-GACAGCTACAACCATCCCTTC-3'), HIVgag-720f (5'-GACCATCAATGAGGAAGCTG-3'), HIVgag-1128f (5'-CATTGGGACCAGCGGCTA C-3') verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

2.3. Zellkulturtechniken und Zelllinien

2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 5% CO₂ und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Als Standardmedium für adhärente, eukaryontische Zellen wurde Dullbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% fötalem Rinderserum (FKS, PAN, Heidenheim), Penicillin (100 U/ml, PAN, Heidenheim) und Streptomycin (100 µg/ml, PAN, Heidenheim) verwendet. Das Medium zur Kultivierung der CD4-positiven HeLa-LTR-

β Gal Indikatorzelllinie MAGI wurde zur Selektion zusätzlich mit G418 (2 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) und Hygromycin B (0,1 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Die eukaryontischen Suspensionszellen wurden in RPMI-1640 Medium (PAN, Heidenheim) mit FKS (10%), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 μ g/ml) kultiviert. Nach Transfektion der eukaryontischen Jurkat-FlpIn-Zellen wurden die positiven Klone durch Zugabe von Hygromycin selektiert, wobei die Konzentration wöchentlich von 50 μ g/ml in Schritten zu 20 μ l/ml bzw. 50 μ l/ml auf 350 μ g/ml Medium gesteigert wurde. Sämtliche Zellkulturmedien und Antibiotika wurden von Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Alle für die Zellkultur verwendeten Chemikalien waren speziell für die Zellkulturen getestet und wurden von Invitrogen (Karlsruhe), BD (Heidelberg) oder SIGMA (Deisenhofen) bezogen. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und deren Beschreibung findet sich in Tabelle 2-1.

Bezeichnung	Herkunft	Beschreibung
H1299	human	p53-negative Lungenkarzinomzellen (Mitsudomi, 1992)
293T	human	Ad5/SV40 (T) transformierte Nierenepithelzellen (Numa, 1995) (ATCC: CRL-11268)
MAGI	human	CD4 $^{+}$ /LTR- β -Gal HeLa, HPV-18 transformierte Cervixkarzinomzellen (Kimpton und Emmermann, 1992)
Jurkat-FlpIn	human	T-Leukämie-Zellen, CCR5-Rezeptor negativ (Weiss, 1984) (Invitrogen, R762-07)
PM1	human	T-Zellen, abstammend von der HUT78 Zelllinie, CXCR4- und CCR5-Rezeptor positiv (Lusso, 1995)
P815	murin	Mastocytomazellen Haplotyp: H-2 d (ATCC: TIB-64)

Tabelle 2-1: Beschreibung der verwendeten eukaryontischen Zelllinien

2.3.2 Transfektion und Transduktion eukaryontischer Zellen

Die transiente Expression viraler Proteine in eukaryontischen Zellen wurde in der Regel durch Transfektion diverser eukaryontischer Expressionplasmide auf der Basis von pcDNA3.1-Vektoren (Invitrogen, Groningen, NL) erzielt. Die Expression der in den Polylinker von pcDNA3.1 (5,4 kb) inserierten Fremdgene stehen hierbei entweder unter der Kontrolle des konstitutiven hCMV-*immediate early* Promotors (hCMV, *human cytomegalie virus*) oder unter Kontrolle des induzierbaren HIV-1 LTR-Promoters (LTR, *long terminal repeat*). Die Polyadenylierung der Transkripte wird durch eine BGHpolyA-Signalsequenz (BGH, *bovine growth hormone*) initiiert. Zusätzlich trägt dieser Vektor ein Neomycin-Resistenzgen (Neo R), welches von einem SV40-Promotor und einem SV40 Polyadenylierungssignal (SV-40, *simian virus*) flankiert wird.

2.3.2.1 CaHPO₄⁻-Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur transienten Expression viraler Proteine in eukaryontischen Zellen wurden diese in Petrischalen (\varnothing 10 cm) ausgesät (1x10⁵- 3x10⁵ Zellen / 12,5 ml Medium), 24 h kultiviert und mittels der Calciumphosphat-Präzipitation Technik (Graham, 1973) mit dem jeweiligen eukaryontischen Expressionsplasmid transfiziert. Hierzu wurden je 45 µg DNA mit 90 µl 2,5 M CaCl₂ in einem Volumen von 900 µl H₂O vereint und das Gemisch tropfenweise unter leichtem Vortexen zu 900 µl 2xHeBs (16,4 g NaCl; 11,9 g HEPES; 0,21 g Na₂HPO₄ in 1 Liter H₂O; pH 7,05) pipettiert. Nach einer Inkubation von 20 min (Raumtemperatur) wurde der Transfektionsansatz (1,8 ml) gleichmäßig auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde nach 8-16 h abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. In der Regel wurden die Zellen bzw. der Zellkulturüberstand 48 h nach Transfektion geerntet. Für Transfektionen in kleineren Kulturschalen wurden die eingesetzten Mengen entsprechend verringert, z.B. in 6-well Zellkulturschalen (\varnothing 3 cm; 3-7x10⁵ Zellen / 3 ml Medium) wurde ein Drittel des oben beschriebenen Transfektionsansatzes verwendet.

2.3.2.2 Transfektion zur Herstellung stabiler Zelllinien durch Lipofektion

Für die Herstellung stabiler Jurkat-Zellen wurde das Flp-In System (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Jurkat-Zellen tragen stabil integriert ein lacZ-Zeocin Fusionsgen unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Eine FRT-site nach dem SV40 Promotor und dem ATG-Startkodon fungiert als Bindungs- und Insertionsstelle für die Rekombinase. Der pcDNA5/FRT Expressionsvektor (5.1 kb) enthält ebenfalls eine FRT-site; bei Cotransfektion dieses Vektors mit dem pOG44 Flp-Rekombinase Expressionsplasmids in Flp-In Säugerzellen wird das Transgen durch homologe Rekombination gezielt in das Genom der Wirtszelle integriert. Zur Selektion stabil transfizierter Zellklone enthält der pcDNA5/ FRT Vektor ein Hygromycinresistenzgen.

Zur stabilen Transfektion von Jurkat-Zellen mittels „DOTAP liposomalen Transfektionsreagenz“ (Roche, Mannheim) wurden je 5 µg Gesamt-DNA (pOG44: pcDNA5/FRT; 9:1) mit 20 mM Hepes (pH 7,4) auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht und zu 100 µl einer DOTAP/Hepes Lösung (30 µl DOTAP) nach Angaben des Herstellers gegeben, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionsmischung auf die Zellen (1,5x10⁶ Zellen / 5 ml Medium) gegeben. Nach einer Inkubation von 3-10 h wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen wurden weiter kultiviert.

2.3.2.3 Transiente Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren

Zur Herstellung retroviraler Vektoren wurden am Tag vor der Transfektion 5×10^6 293T-Zellen in einer 10 cm Petrischale ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Etwa eine Stunde vor Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch 8 ml frisches Medium, dem 25 μ M Chloroquin zur Erhöhung der Transfektionseffizienz zugesetzt wurden, ersetzt. Der Transfektionsansatz bestand aus 7,5 μ g retroviraler Vektor M387 (Abb. 2-1), 12,5 μ g des *gag-pol* Expressionsplasmids (M13) sowie 1 μ g des VSVG - bzw. GALV-*env* - Expressionsplasmids (M130), mit H₂O wurde auf 450 μ l aufgefüllt.

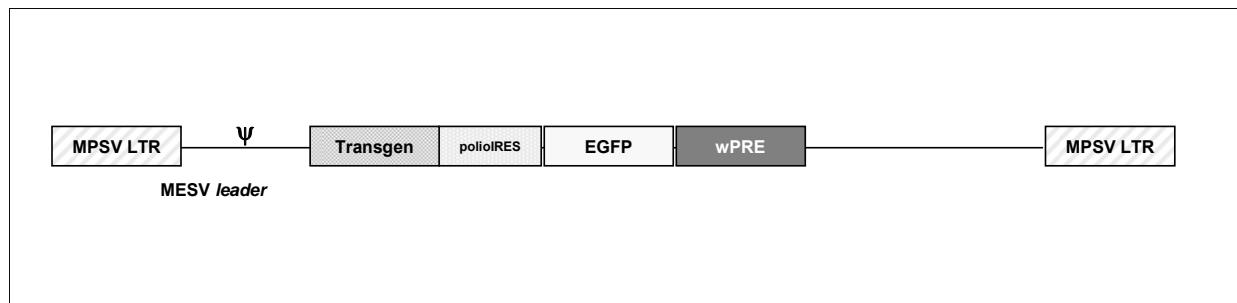


Abb. 2-1 : Aufbau des retrovirusalen Vektors M387. Der retrovirale Vektor M387 (von Laer, GSH, Frankfurt/Main) besteht aus dem 5'- und 3'LTR des MPSV (MPSV, *Myeloma proliferative sarcoma virus*) und einer *leader*-Sequenz (*leader* MESV, *Mouse embryonic stem cell virus*) mit dem Verpackungssignal ψ . Zur gleichzeitigen Expression des Transgens und des EGFP als Reporterprotein wurde eine PolioIRES (PolioIRES, *Poliovirus internal ribosome entry site*) zwischengeschaltet.

Nach Zugabe von 50 μ l CaCl₂ (2,5 M) wurde die Lösung wie unter 2.3.1.1 beschrieben mit 2xHeBs vermischt und weiter verfahren. Nach 24 h und 48 h wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände geerntet und durch 0,45 μ m Filter sterilfiltriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei 4°C gelagert.

2.3.2.4 Transduktion von Suspensionszellen mit retrovirusalen Partikeln

In einer 24-well Zellkulturschale wurden je 2×10^5 Suspensionszellen (PM1, P815) in 100 μ l Medium ausgesät. Nach Zugabe von 1 ml virushaltigem Zellkulturüberstand, der mit 1 μ l Polybrene (8 μ g/ml) versetzt war, wurden die Zellen für 1 h bei 560 xg bei RT zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Die Transduktion wurde bis zu 3-mal wiederholt.

2.3.2.5 FACS-Anreicherung

Die transduzierten Zellen konnten, da sie bei Integration des retrovirusalen Vektors das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) exprimieren, mit einem *fluorescence-activated cell sorter* (FACSaria; BD; Heidelberg, Germany) angereichert werden. In der Regel betrug die Reinheit der nach ihrer GFP-Expression angereicherten Zellen über 95 %.

2.3.3 Herstellung replikationskompetenter HI-Viren und Titration des Virusstocks

Zur Infektion der transduzierten Zellen wurden verschiedene Virusstocks hergestellt. Dazu wurden 5×10^6 PM1 T-Zellen (in 250 µl Medium) mit 250 µl Virusstock (HIV_{NL4-3}; HIV_{D117II}; HIV_{JRFL}) in einer 25 cm² Zellkulturflasche infiziert. Die Flasche wurde für 2-3h schräg stehend im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Kulturmedium auf 10 ml Gesamtvolume aufgefüllt. Täglich wurden die Kulturen auf die Bildung von Synzytien und zytopathische Effekte (CPE) hin mikroskopisch untersucht. Die Überstände wurden in eine zweite Infektionsrunde eingesetzt, wenn in der infizierten Kultur mehr als 70% tote Zellen waren (ca. Tag 5-9) (Verfahren wie in der ersten Infektionsrunde). In der zweiten Infektionsrunde wurden die Überstände gesammelt, als wiederum bis zu 70% tote Zellen in den Kulturen waren. Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (2200 xg, RT, 10 min) abgetrennt und die vereinigten Überstände 1:1 mit FKS gemischt und aliquotiert (1 ml). Die so erhaltenen hoch infektiösen und replikationsfähigen Virusstocks wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung des HIV-Titers wurden je 5×10^4 Lymphozyten-Zellen (PM1, Jurkat) in 48-well Zellkulturplatten ausgesät (50 µl) und mit einer seriellen Virusstockverdünnung (50 µl) infiziert. Nach 2-3 h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde den Ansätzen 300 µl frisches Medium zugegeben. Am dritten Tag der Infektion wurde den Ansätzen erneut 400 µl frisches Medium zugesetzt und im Folgenden jeden zweiten Tag 100 µl Kulturüberstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Durch Quantifizierung des p24-Capsid-Antigens mittel ELISA (siehe 2.4.2.2) wurde 14 Tage *post infectionem* die Virusproduktion im Zellkulturüberstand bestimmt. Mit jeder Verdünnung des Virusstocks wurden jeweils 6 unabhängige Infektionen durchgeführt. Der reziproke Wert der Verdünnung, bei der in 3 von 6 Ansätzen eine Virusreplikation nachweisbar war, ergab den Virustiter des Stocks, ausgedrückt in 50% Gewebekultur-infektiösen Dosen (50% *tissue culture infective dose* = TCID₅₀).

2.3.4 Infektion der Zelllinien mit HIV-1

In den Infektionsexperimenten wurden die neu generierten Zelllinien mit infektiösen und replikationskompetenten HI-Viren infiziert. Zur Bestimmung des HIV-1 Antigens p24^{CA} mittels ELISA wurde in regelmäßigen Abständen (1-2 Tage) Zellkulturüberstand entnommen.

Zur Infektion wurden 5×10^4 Zellen (in 50 µl Medium) in einer 48-well Platte ausgesät. Die HIV-1 Stocklösung wurde bis zur entsprechenden multiplicity of infection (MOI) verdünnt und in 50 µl zu den Zellen gegeben. Nach 2-3 h Kultivierung bei Standardbedingungen wurde mit Medium auf 400 µl Endvolumen aufgefüllt. Ab Tag 3 der Infektion wurden die Zellen jeden zweiten Tag gesplittet und der Zellkulturüberstand im p24-capture ELISA untersucht. Dazu

wurden 90 μ l des Überstands mit 10 μ l einer 5% Triton X-100-Lösung (SIGMA, Deisenhofen) inaktiviert; bis zur p24-Bestimmung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.4. Analyse der Proteinexpression

2.4.1 Gewinnung von Zelllysaten

Zur Analyse der Genexpression wurden die transfizierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten, nach mehrmaligem Waschen des Zellrasens mit PBS, in 1-2 ml PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) abgeschabt, abgespült oder mit 0,5 ml Trypsin abgelöst und das Zellpellet nach Zentrifugation (300 xg; 5 min; 4°C) in 100-400 μ l „*triple-detergent*“ Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS (w/v); 1% Nonidet-40 (w/v); 0,5% Na-Deoxycholat (w/v)), der zuvor mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail, CompleteTM (Roche, Mannheim), versetzt worden war, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min (4°C) und anschließender Zentrifugation (20.800xg, 15 min, 4°C) wurde das Zelllysat in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (Lagerung: -20°C).

2.4.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den aufbereiteten Zelllysaten erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) und wurde unter Verwendung der „*Bio-Rad Protein Assay*“ Reagenz (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinmenge wurde näherungsweise anhand einer BSA-Standardgeraden bestimmt.

2.4.3 Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) exprimierter Proteine *in vivo*

Zur Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) von Gag *in vivo* wurden die Zellen zunächst wie beschrieben in Petrischalen transfiziert. Nach einer Inkubation von 30 h wurde das Medium abgesaugt und durch Medium, dem der Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximid (Calbiochem, Schwalbach) (25 μ g/ml) zugesetzt worden war, ersetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zelllysate wie unter Kapitel 2.4 beschrieben gewonnen und die bis zu diesem Zeitpunkt intrazellulär vorhandenen Proteine elektrophoretisch im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western blot detektiert.

2.4.4 Bestimmung der proteasomalen Degradation exprimierter Proteine *in vivo*

Zur Bestimmung der Degradation von Gag durch das Proteasom *in vivo* wurden die Zellen zunächst wie beschrieben in Petrischalen transfiziert. Nach einer Inkubation von 36 h wurde

das Medium abgesaugt und durch Medium, dem der Proteasomen-Hemmer Calpain (N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-Norleucinal) (Sigma, Geisenhofen) (2 µg/ml) zugesetzt worden war, ersetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zelllysate wie unter Kapitel 2.4 beschrieben gewonnen und die bis zu diesem Zeitpunkt intrazellulär vorhandenen Proteine elektrophoretisch im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western blot detektiert.

2.4.5 Analyse der Proteinexpression: SDS-Page und Western Blot Analyse

Zur Analyse der Expression viraler Proteine wurden die Zelllysate mit 5x SDS Probenpuffer (312,5 mM Tris-HCl; pH 6,8; 5% SDS; 25% β-Mercaptoethanol; 2,5 mM EDTA; 25% Glycerin; 0,0125 % Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. I.d.R. wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinmengen (z.B. 50 µg) der zu untersuchenden Zelllysate entsprechend ihrem Molekulargewicht über ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetrennt (Lämmli, 1970). Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend unter Verwendung einer „*SemiDry-Blotting*“-Apperatur nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München) aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) (Schleicher & Schuell, Dassel) in Transferpuffer (25 mM Tris; 150 mM Glycin; 10% MeOH; 0,1% SDS) überführt (Towbin, 1979). Zur Kontrolle des Transfers bzw. zum Anzeichnen des Molekulargewichtsstandard (Bio-Rad, München) wurden die Proteine reversibel mit Ponceau S (0,5 g Ponceau S; 25 ml Eisessig auf 500 ml H₂O) angefärbt. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl)). Anschließend wurden die Proteine spezifisch mit Hilfe in TBS-Puffer verdünnter Primär-Antikörper bzw. Alkalische-Phosphatase (AP) konjugierter, sekundärer Antikörper (vgl. Tabelle 2-2) nach herkömmlichen Methoden detektiert und analysiert (Sambrook, 1989). Die Antikörper-Antigen-Komplexe auf den Membranen wurden über AP-Färbung (Roche, Mannheim) in AP-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) nach Herstellerangaben detektiert.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Beschreibung
PRIMÄRE ANTIKÖRPER			
13 / 5	Wolf, 1990	1:500	murin, monoklonal p24/55 _{IIIB}
anti-CA	Kräußlich, Heidelberg	1:500	Kaninchen, polyklonal p24 _{IIIB}
anti-β-Aktin	SIGMA, München	1:5000	Murin, monoklonal β-Aktin
Anti-V3	DAKO, NEA 92053	1:2500	Murin, monoklonal V3 _{IIIB}
SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER			
α-Maus-AP	Bio-Rad, München	1:2000	
α-rabbit-AP	DAKO, Hamburg	1:2000	

Tabelle 2-2 : Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper

2.4.6 Quantifizierung der p24-CA Konzentration im ELISA

Zur Quantifizierung der p24 Konzentration in Zelllysaten und Zellkulturüberständen wurden 96-well MaxiSorb-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) mit je 100 µl einer 1:10.000 Verdünnung des p24-spezifischen Antikörpers MO1 in 0,1 M Karbonatpuffer (pH 9,5) über Nacht (4°C) beschichtet. Der Standard wurde seriell (50-0 ng/ml) in Verdünnungspuffer (PBS/1% BSA) hergestellt und je 100 µl der Verdünnung wurden nach mehrmaligem Waschen (3x) der Mikrotiterplatten mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween-20) zugegeben. Anschließend wurden die mit 5 % Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen) inaktivierten Zellkulturüberstände oder die verdünnten Zelllysate (1-5 µg Gesamtprotein in 100 µl Verdünnungspuffer) auf die Platten aufgetragen und 1h (37°C) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (6x) wurden je 100 µl einer 1:20.000 Verdünnung des biotinylierten p24-Antikörpers 37G12 zugegeben und eine weitere Stunde (RT) inkubiert. Nach weiteren zehn Waschschritten wurden 100 µl einer 1:10.000 Verdünnung des Streptavidin-HRP (*horse radish peroxidase*) Konjugats (Roche, Mannheim) zugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min (RT) wurde die Mikrotiterplatte abermals gewaschen (10x). Die Antikörper-Antigen Komplexe wurden unter Verwendung von je 100 µl TMB-Substratlösung nach Angaben des Herstellers (BD, Heidelberg) detektiert. Die Adsorption wurde im Photometer bei einer

Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Mit Hilfe einer p24-Standardgeraden (von 10 ng/ml bis 0,078 ng/ml) wurden anschließend die Mengen an p24 bestimmt. Die für diesen ELISA verwendeten p24-spezifischen Antikörper MO1 und 37G12 (biotinyliert) wurden von Polylimmun (Wien, Österreich) bezogen.

2.5. RNA Methoden

2.5.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurden beim Arbeiten mit RNA ausschließlich sterile, gestopfte Pipettenspitzen sowie sterile Plastikpipetten verwendet. Alle Apparaturen und Gefäße wurden zuvor mit 0,2 M NaOH gründlich gereinigt. Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem H₂O hergestellt und durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert. Dazu wurde 1 ml/l DEPC (SIGMA, Deisenhofen) zugegeben, mind. 12 h inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der kanzerogenen Chemikalie autoklaviert. Die meisten Arbeitsschritte, insbesondere die Gelelektrophorese, wurden aus Sicherheitsgründen unter dem Digestorium durchgeführt.

2.5.2 Aufreinigung der RNA

Die Zellen wurden zunächst in Petrischalen ausgesät und transfiziert. Nach 48 h wurde der Zellrasen nach einmaligem Waschen durch Spülen mit PBS abgelöst und zentrifugiert (300 xg; 5 min; 4°C). Das Zellpellet wurde durch Zugabe von 175 µl RLN-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 140 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5% NP-40) partiell lysiert und die lösliche, zytoplasmatische Fraktion wurde durch anschließende Zentrifugation (300 xg; 2 min; 4°C) von der unlöslichen, nukleären Fraktion abgetrennt. Die pelletierten Zellkerne wurden nachfolgend durch Zugabe von 350 µl RLT Puffer vollständig lysiert. Die Isolierung und Aufreinigung der RNA aus der zytoplasmatischen (C) bzw. nukleoplasmatischen (N) Fraktion wurden unter Verwendung des „RNeasy-Mini Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die präparierte RNA wurde anschließend in RNase-freiem Wasser (30-50 µl) aufgenommen, und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration der RNA wurde durch Messung des Adsorptionsspektrums (230-300 nm) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($c = (1_{A260} = 40 \text{ } \mu\text{g} / \text{ssRNA/ ml})$; Reinheit: $A_{260} / A_{280} \geq 2$) ermittelt.

2.5.3 RT-PCR und LightCycler

Für die Reverse Transkription wurden 20 µg gereinigte RNA zunächst mit 5 µl (10 U/µl) DNase I (Roche, Mannheim) für 1 h (37°C) verdaut und anschließend die DNase I inaktiviert (95°C, 10 min). Wenn die RNA frei von DNA war (Kontroll-PCR), wurde die RT-Reaktion nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) mit 1 µg RNA durchgeführt.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch das „*LightCycler*“ System (Roche, Mannheim) unter Verwendung des „*LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*“ Kits nach Herstellerangaben (Roche, Mannheim). Als Standard zur Quantifizierung der mRNA wurde das Neomycin-Resistenzgen, das ebenfalls auf dem Plasmid liegt, benutzt.

Die DIG-markierten Sonden wurden mittels PCR generiert, wobei DIG-11-dUTPs (Roche, Mannheim) in die Sonde eingebaut wurden. Als Template wurden jeweils 100 ng des entsprechenden Plasmids eingesetzt (siehe Tabelle 2-3).

Sonde	Plasmid	~Länge (nt)	Primer
syngag	pc-syngag	500	5' GCAGATGCTGAAGGAGAC 3' GGTCACCTGGCTCATGG
β-Aktin	pGEM ₃ -Aktin	500	5' TGACTGGCACACAGACAA 3' ATTGGCAAGCAGGCATCGC

Tabelle 2-3 : Auflistung der für die Herstellung DIG-markierter Sonden verwendeten Plasmide und Primer.
Ebenfalls angegeben die Länge der hergestellten Sonden.

Nach gelelektrophoretischer Kontrolle der PCR-Produkte wurden sie über „*PCR-purification*“ Säulchen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und bei -20°C gelagert.

2.5.4 Analyse der RNA: Northern Blot

Gleiche Mengen der aus den Zellen isolierten und gereinigten RNA (5-20 µg) wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht, mit 5x RNA-Auftragspuffer (4 mM EDTA; 4x MOPS-Laufpuffer; 0,9 M Formaldehyd; 20% Glycerin; 30% Formamid; 0,2% Bromphenolblau; 0,2% Xylencyanol) versetzt, aufgekocht (65°C, 10 min) und danach auf Eis (4°C) inkubiert. Anschließend wurde die RNA auf einem 1-1,5%igem Formaldehydgel (1-1,5% Agarose; 1x MOPS-Laufpuffer (0,4 M MOPS; 10 mM EDTA; 0,1 M NaAc; pH 7,0)) elektrophoretisch aufgetrennt (100-150 V, 1-2 h). Als Standard wurden 2 µl eines 0,2-10 kb RNA-Markers (SIGMA, Deisenhofen) aufgetragen. Das Gel wurde darauffolgend 3x 20 min mit DEPC-Wasser gewaschen, 20 min in 0,05 N NaOH und 45 min in 20x SSC-Puffer (3 M NaCl; 0,3 M Na₃-Citrat; pH 7,0) inkubiert. Die Übertragung der RNA auf eine positiv geladene

Nylonmembran (Biodyne Plus; Pall, Dreieich) erfolgte ÜN (16-20 h) mittels Kapillarkraft (*Northern Blot*). Als Transferpuffer wurde 20x SSC-Puffer verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 min mit 5x SSC-Puffer gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet (10 min) und die RNA durch UV-Behandlung (1200kj, 1 min) im Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert (*cross-linking*). Die ribosomale RNA wurde anschließend unspezifisch und reversibel mit 0,3 % Methylenblau; 0,03 % NaAc angefärbt und der Kontrast mit H₂O verschärft. Anschließend wurde der Standard angezeichnet, sowie die Laufhöhe der 5S (<0,2 kb), 18S (1,9kb) und 28S (4,7-5,0 kb) markiert und die Membran zur internen Kontrolle fotografiert. Zur Detektion spezifischer RNAs wurde die Membran zunächst in speziellen Hybridisierungsgefäßen (Biometra, Göttingen) in 50 ml Prähybridisierungspuffer (20xSSPE (3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄·H₂O; 20 mM EDTA; pH 7,4); 0,5% Formamid; 0,05 % 100x Denhardts Reagenz (1% Ficoll-400; 1% Polyvinylpyrolidon; 1% BSA); 0,05% SDS; 0,4 mg/ml tRNA (Roche, Mannheim)) 2 h bei 40°C im Überkopfschüttler prä-inkubiert. Im Anschluß wurde der Prähybridisierungspuffer verworfen und durch die gleiche Menge Hybridisierungspuffer mit denaturierter (68°C, 10 min), spezifischer DIG-markierter Sonde ersetzt und im Überkopfschüttler inkubiert (16 h, 40°C). Die Membranen wurden anschließend 2x nicht stringent (2x 10 min, 40-65°C, 2x SSC; 0,1% SDS) und danach 3x stringent (3x 15 min, 65°C, 0,2% SSC; 0,1% SDS) gewaschen. Die Membran wurde anschließend erst für 2 min (RT) unter Schütteln in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3% Tween-20) inkubiert, danach für mindestens 30 min (RT) unter Schütteln in Blockierlösung (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 1% *Blocking Reagenz* (Roche, Mannheim)). Die Blockierlösung wurde verworfen und die Membran für 30 min (RT) in Antikörperlösung (Anti-DIG-Antikörper AP-konjugiert 1:10.000 in Maleinsäurepuffer; 1% *Blocking Reagenz*) geschüttelt. Anschließend wurde die Membran 2x mit Waschpuffer gewaschen und in Detektionspuffer (2-5 min) equilibriert. Zur Detektion wurde die Membran in Klarsichtfolie eingelegt und mit Substratlösung (CDP-Star RTU-Lösung, TROPIX, Bedford, MA, USA) beträufelt. Die spezifische RNA wurde durch Chemolumineszenz detektiert (KODAK Biomax MR, Amersham).

2.6. Immunisierung der Versuchstiere und allgemeine immunologische Arbeitstechniken

2.6.1 Versuchstiere und Haltung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsstudien wurden weibliche Mäuse (Charles River, Sulzfeld), im Alter von 40-45 Tagen, der Inzuchtrassen Balb/cAnNCrl (H-2^d) oder C57BL / 6 (H-2D^b) verwendet. Die Tiere wurden unter keimfreien Bedingungen in der Tierversuchsanlage H4 des Universitätsklinikums Regensburg gehalten.

2.6.2 Präparation Endotoxin-freier Plasmid-DNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch immunmodulatorische, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), wurde die bakterielle Plasmid-DNA für die *in vivo* Studien im Mega- bzw. Giga-Maßstab unter Verwendung des „*Endotoxin-free DNA preparations*“-Kit nach Angaben des Herstellers präpariert (Qiagen, Hilden) und in einer Konzentration von 1 µg/µl in sterilem PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ Ionen) aufgenommen.

2.6.3 Immunisierung der Mäuse

Die Versuchstiere wurden i.d.R. im Alter von 8 Wochen immunisiert. Zur intramuskulären Immunisierung (i.m.) wurden die Tiere zunächst mittel des Inhalationsnarkotikums Isoflurane (Baxter, Unterschleißheim) betäubt und nachdem die Einstichstelle rasiert wurde, je 50 µl der entsprechend konzentrierten Plasmid DNA in PBS langsam in beide Schienbeinmuskeln (*tibialis anterior*) injiziert. Nach der Grundimmunisierung wurden die Mäuse in der Regel nach 3-6 Wochen erneut immunisiert (Auffrischungsimpfung; *boost*-Immunisierung).

2.6.4 Bestimmung der humoralen Immunantwort

2.6.4.1 Gewinnung von Serum

Den immunisierten Tieren wurde einen Tag vor der Grundimmunisierung und eine Woche nach der zweiten Auffrischungsimpfung durch Anritzen der Schwanzvene mit einem sterilen Skalpell Blut entnommen (100-500 µl). Die Blutentnahme wurde dabei durch Erwärmen der Mäuse mittel einer Rotlichtlampe (5-10 min) erleichtert. Zur Serumgewinnung wurde das Blut 1 h bei 37°C bzw. 1 h bei 4°C (Agglutination der Blutzellen) inkubiert und der Überstand nach zweimaliger Zentrifugation (5.200 xg; 4°C; 10 min) als Serum gewonnen. Anschließend wurde das Serum für 30 min bei 56°C inaktiviert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.4.2 Bestimmung der spezifischen Gesamt-Ig Antikörpertiter

Zur Bestimmung der absoluten Gag-spezifischen Ig Antikörpertiter wurden mitteladsorbierende 96-well Platten (Nunc, Wiesbaden) über Nacht (4°C) mit je 100 µg PrepCell®-gereinigtem (BioRad, München) 55 kDa Gag Protein in 100 µl 0,1 M Karbonatpuffer (pH 9,5) beschichtet (1 µg/ml). Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS; 0,05% Tween-20) wurden die Platten mit je 200 µl Blockierlösung (PBS; 10%FCS) pro Vertiefung 1 h bei 37°C inkubiert. Die Seren der Versuchstiere wurden seriell in Verdünnungspuffer (PBS; 2% FCS; 3% Tween-20) verdünnt (wahlweise: 1:40 – 1.310.720). Je 100 µl der entsprechenden Verdünnung wurde anschließend in die Vertiefung pipettiert und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten 6x mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 µl einer 1:2.000 in Verdünnungspuffer verdünnten anti-Maus Ig-HRP Antikörpers (Dako, Hamburg), 1 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem 6-maligem Waschen wurden je 100 µl TMB-Substratlösung (BD, Heidelberg) zugegeben. Nach einer Farbentwicklung von ca. 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Reaktion mit 50 µl 1N H₂SO₄ abgestoppt und die jeweilige Adsorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer gemessen. Der Antikörpertiter des jeweiligen immunisierten Versuchstieres wurde als Endpunkt derjenigen reziproken Verdünnung definiert, deren OD um den dreifachen Wert eines parallel gemessenen Wertes des Negativserums (z.B. mock immunisierter Versuchstiere) dergleichen Verdünnung auf derselben Mikrotiterplatte erhöht war.

2.6.5 Bestimmung der zellulären Immunantwort

2.6.5.1 Kultivierung primärer Splenozytenkulturen

Die Zellpopulation (Splenozyten), die aus der Milz immunisierter Mäuse präpariert wurde (~1-2x 10⁸ Zellen/Milz), besteht zu einem großen Anteil aus B-Lymphozyten (60 – 70 %), CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen (15 – 20 %) sowie Monozyten / Makrophagen und dendritischen Zellen (10 %). Die restlichen Zellen setzen sich aus neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen und Fibroblasten zusammen. Die isolierten Splenozyten wurden in RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 10 % inaktiviertem FKS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), 20 mM HEPES und 50 µM β-Mercaptoethanol bei einer Temperatur von 37°C und einer 5 %igen CO₂ Begasung im Brutschrank kultiviert. Da die primären Zellen ohne Zusatz von Zytokinen, wie z.B. IL-2, innerhalb von 2-3 Tage absterben, wurden alle Versuche unverzüglich, direkt nach der Präparation der primären Zellen angesetzt.

2.6.5.2 Präparation der Milz und Isolierung der Splenozyten

Zur Entnahme der Milz wurden die Versuchstiere i.d.R. eine Woche nach der letzten Immunisierung durch CO₂-Begasung getötet, die Milz unter Verwendung eines sterilen Präparationsbestecks entnommen und die Organe einer Immunisierungsgruppe (~5) in 25 ml Waschpuffer (PBS/ 1 %FCS) vereint. Anschließend wurden die Milzen mitsamt der Flüssigkeit in Petrischalen überführt und zur Gewinnung von Einzelzellsuspension mit dem Stempel einer 5 ml Spritze in einem Nylonfilter (100 µm Porengröße) zerrieben. Nachfolgend wurden die Zellen in ein 50 ml Gefäß gegeben und pelletiert (300 xg, RT, 5 min). Zur Entfernung der Erythrozyten (Hämolyse) wurden die Zellen in Lysepuffer (5 ml / Milz) (150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA; pH 7,2) resuspendiert. Sofort wurden die Splenozyten pelletiert (300 xg, RT, 5 min) und durch zwei wiederholte Waschschrifte (300 xg, RT, 5 min, Bremse auf 5) in je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde ein 10 µl Aliquot der Splenozyten mit 90 µl Tryphanblau (0,4% Tryphanblau/ PBS) gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer die Lebendzellzahl bestimmt. Die Zellen wurden mit Kulturmedium auf die jeweilige Arbeitskonzentration (ELISA: 2x10⁶ / ml; Elispot und FACS: 2x10⁷ / ml; Cytotox: 3x10⁷ / ml) verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten.

2.6.5.3 Verwendete Peptide

Die für die Bestimmung der zellulären Immunantwort verwendeten HIV-1 spezifischen, murinen MHC Klasse-I restriktiven Peptide (vgl. Tabelle 2-4) wurden von der Firma Biosyntan (Berlin) hergestellt. Die lyophilisierten Peptide wurden in HPLC-grade DMSO gelöst (10 mM) und bei 4°C gelagert. Das Peptid A9I^{p24} (aa197-205) ist als murines p24 CTL-Epitop des Haplotyps H-2^d beschrieben worden (Selby, 1997; Nakamura, 1997). Das Peptid R10I^{V3/IIIB} (gp160: aa 318-327) stellt ein murines V3/IIIB-spezifisches CTL-Epitop (Haplotyp H-2D^d) dar (Takahashi, 1988; Sastry, 1992). Das Peptid B6G^{p24} (aa 390-398) ist ein murines p24 CTL-Epitop vom Haplotyp H2-D^b (Paliard, 1998).

Bezeichnung	Sequenz	Haplotyp	Konzentration
A9I ^{p24}	AMQMLKETI	H-2K ^d	10 mM
B6G ^{p24}	SQVTNTATI	H-2D ^b	10 mM
R10I ^{V3/IIIB}	RGPGRAFVTI	H-2D ^d	10 mM

Tabelle 2-4 : Auflistung und Beschreibung der verwendeten Peptide

2.6.5.4 *In vitro* Restimulation der Splenozyten: Quantifizierung der IFN γ -Sekretion (ELISA)

Je 1×10^5 Milzzellen (2×10^5 Zellen/ml) wurden in 24-well Zellkulturgefäßen (Falcon, BD, Heidelberg) mit 1 ml einer entsprechenden Verdünnung eines „recall“-Antigens (Peptide 10 μ M, 10 μ g/ml) bzw. einer Antigen-exprimierenden Zelllinie P815 (Balb/c Mastozytoma-Zellen: 1×10^5), die mit 20.000 rad (200 Gy) bestrahlt wurde, 24 – 48 h *in vitro* restimuliert. Anschließend wurden die Überstände (1 ml) abgenommen, durch Zentrifugation (600 xg, 10 min, 4°C) von Zellen und Zelltrümmern befreit und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Bestimmung von IFN γ im Überstand von *in vitro* restimulierten Splenozyten wurde mit Hilfe kommerzieller IFN γ -ELISA-Kits (BD, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden dazu unverdünnt vermessen.

2.6.5.5 ELISPOT-Assay: Quantifizierung IFN γ -sezernierender Zellen

Zur Bestimmung der Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit spezifischen „recall“-Antigenen wurde zunächst die mit Nitrocellulose beschichtete 96-well Kulturplatte MAHA-S45 (Millipore, Eschborn) mit 100 μ l eines 5-10 μ g/ml in PBS verdünnten Anti- γ IFN *capture* Antikörpers R4-6A2 (anti-Maus IFN γ ; 1:1.000) (BD, Heidelberg) $\ddot{\text{U}}$ N (4°C) inkubiert. Nach mehrmaligem, sterilem Waschen (4x) mit PBS/ 10% FKS wurde die Platte 1 h bei 37°C mit 200 μ l PBS/ 10% FKS blockiert. Anschließend wurden je 100 μ l einer entsprechenden Verdünnung der Splenozyten (1×10^5 Zellen pro well) und je 100 μ l der stimulierenden Reagenz (10 μ M Peptid (2 μ g); 0,1-1 μ g PMA (1 μ l/ml) (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, Deisenhofen) und Iono (1 μ l/ml) (Ionomycin, Sigma, Deisenhofen) bzw. der antigenexprimierenden Zelllinie P815 (1×10^5 Zellen) zugegeben und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach der *in vitro* Restimulation wurden die Zellen durch mehrmaliges Waschen (6x) mit Waschpuffer (PBS/ 0,05% Tween-20) lysiert. Anschließend wurden je 100 μ l einer auf 1 μ g/ml in PBS verdünnten Lösung des sekundären, biotinylierten *detection*- γ IFN-Antikörpers XMG1.2 (Biotin-anti-Maus IFN γ ; 1:1.000) (BD, Heidelberg) zugegeben und weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde gewaschen (10x) und die Antikörper-Antigen-Komplexe durch Zugabe eines 1:5.000 in Verdünnungspuffer verdünntem Streptavidin-AP Konjugats (Roche, Mannheim) detektiert. Nach einer Inkubation von 30 min (Raumtemperatur) wurde die Platte wiederum gewaschen (10x). Anschließend wurde die Platte mit 50 μ l AP-Färbelösung nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) 15-30 min inkubiert und die Spots, (SFC; *spot forming cell*) nach wiederholtem Waschen mit H₂O und Trocknung, ($\ddot{\text{U}}$ N, Raumtemperatur) mit Hilfe einer Lupe per Auge ausgezählt.

2.6.5.6 Intrazelluläre IFN γ –Färbung und FACS-Analyse

Zur Bestimmung der CD8 $^{+}$ und IFN γ produzierenden Zellen in der Splenozytenpopulation wurde intrazellulär IFN γ gefärbt. Dazu wurden je 100 μ l der Milzzellsuspension (2x 10 7 Zellen/ml) pro well in eine 96-well Zellkulturplatte pipettiert. Als Negativkontrolle wurde den Milzzellen je 100 μ l RPMI-1640 mit 0,2 μ l Blockierungslösung BFA (Brefeldin A, Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Die spezifische Stimulation der Splenozyten erfolgte durch Zugabe von spezifischem Peptid (A9I bzw B6G, 2 μ l/ml). Als Positiv-Kontrolle wurden die Splenozyten mit den unspezifischen Antigenen PMA (1 μ l/ml) (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, Deisenhofen) und Iono (1 μ l/ml) (Ionomycin, Sigma, Deisenhofen) aktiviert. Anschließend wurde der Ansatz für 6 h bei 37°C und 5% CO₂ Begasung im Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden danach zentrifugiert (300 xg, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 200 μ l FACS-Puffer (PBS; 1% FKS; 1 mg/ml NaN₃) in eine 96-well-Rundbodenplatte überführt. Um die Fc-Rezeptoren zu blockieren wurde je 100 μ l FACS-Puffer mit 1 μ l CD16/32 Antikörper (CD16/32- α -mouse; BD Pharmingen, Heidelberg) pro well zu den Splenozyten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min (4°C), wurde pro well 10 μ l einer 1:20 Antikörperverdünnung von CD4-FITC (CD4-FITC - α -mouse; BD Pharmingen, Heidelberg) und/oder CD8-APC (CD8a-APC- α -mouse; BD Pharmingen, Heidelberg) zugeben und für 25 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer-II (PBS/ 1 mg/ml NaN₃) wurden je 250 μ l Cytofix/Cytoperm (4% PFA; 1% Saponin; Sigma, Deisenhofen) zugegeben und die Zellen für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen (2x) mit 200 μ l Perm/Wash (PBS; 0,1% Saponin; BD Pharmingen, Heidelberg) erfolgte die intrazelluläre Färbung mit IFN γ -PE- α -mouse (BD Pharmingen, Heidelberg). Dazu wurde je 100 μ l Perm/Wash Puffer vorgelegt und 10 μ l einer 1:20 Verdünnung des IFN γ -PE- α -mouse Antikörpers zugegeben und für 25 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit Perm/Wash (2x 200 μ l) wurden die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die anschließende Analyse auf INF γ -Produktion erfolgte durch *fluorescence activated cell sorting* (FACScalibur; BD; Heidelberg, Germany).

2.6.5.7 Bestimmung der CD8 $^{+}$ zytotoxischen T-Zellantwort: LDH-Freisetzungstest (CytoTox96[®])

Zur Bestimmung der zytotoxischen T-Zell Reaktivitäten (% Lyse) wurde die Lyse von Peptid-präsentierenden Zellen durch spezifisch gegen dieses Epitop *in vitro* restimulierten und spezifisch proliferierten T-Zellen mit Hilfe des nicht radioaktiven LDH-Freisetzungstests (CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison WI, USA) bestimmt.

Die für diesen Assay verwendeten spezifischen Antigen-exprimierenden P815-Zellen (Balb/c Mastocytoma) wurden durch Transduktion mit retroviralen Partikeln hergestellt.

Jeweils 3×10^7 Splenozyten wurden mit 1×10^6 murinen (H-2d) P815 Stimulatorzellen in 10 ml Kulturmedium mit 20 U murinem rIL2 (Roche, Mannheim) für 5 Tage aufrecht stehend in 25 cm²-Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) *in vitro* restimuliert. Die dafür verwendeten P815-Zellen wurden dafür mittel eines Gammastrahlers mit 20.000 rad (200 Gy) bestrahlt, um weitere Zellteilungen zu blockieren. Nach der 5-tägigen Inkubation wurde die Lebendzellzahl aller Ansätze bestimmt, die Zellen pelettiert (300 xg, 25°C, 5 min) und in frischem Kulturmedium (RPMI-1640; 5% FKS; 2 mM L-Glutamin; Penicillin (100 U/ml); Streptomycin (100 µg/ml); 50 µM β-Mercaptoethanol; 20 mM HEPES) aufgenommen (4×10^6 / ml).

Spezifische Lyse der P815 Zielzellen wurde mit dem CytoTox® Assay (Promega, Southampton, UK) bestimmt, bei diesem Test wird quantitativ Lactat-Dehydrogenase, die nach Zelllyse in das Kulturmedium freigesetzt wird, gemessen (Milner, 2003),

Zur Bestimmung der Antigen spezifischen Zytotoxizität der angereicherten CD8⁺T-Lymphozyten wurden zunächst 50 µl unterschiedlicher Zellzahlen (4×10^6 / 2×10^6 / 1×10^6 / 5×10^5 / $2,5 \times 10^5$ / $1,25 \times 10^5$ / 6×10^4 / 3×10^4 Zellen / ml) in zwei Triplets in 96-well Rundboden-Kulturplatten (BD, Heidelberg) vorgelegt (Effektorzellen; E). Anschließend wurden zu einem Triplet je 1×10^4 der Antigen-exprimierenden, murinen (H-2^d) P815 Zellen (Zielzellen; „target cells“, T) in 50 µl (2×10^5 / ml) zugegeben. Zur Kontrolle der LDH-Spontanfreisetzung wurde zum zweiten Triplet Effektorzellen je 50 µl Medium pipettiert. Für die Target-Zellen (P815) wurde ebenfalls ein Triplet nur mit jeweils 50 µl Medium versetzt und ein zweites mit 50 µl Medium und zusätzlich 10 µl Lyse –Puffer, um die maximale LDH-Freisetzung zu ermitteln. Schließlich wurden auf jeder Platte auch Kontrollen mitgeführt, die nur Medium (100 µl), oder Medium und Lysepuffer (100 µl + 10 µl) enthielten. Die Platten wurden zentrifugiert (250 xg, 4 min, Raumtemperatur) und anschließend 4 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut zentrifugiert (300 xg, 4 min, RT) und 50 µl des Überstands in eine neue 96-well Maxisorb-Platte (Nunc, Wiesbaden) überführt. Zunächst wurde 50 µl Substrat-Mix pro Ansatz zugegeben und die versiegelten Platten anschließend für 30 min im Dunkeln (Raumtemperatur) inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 50 µl Stop-Lösung abgebrochen. Die Absorbtion wurde im ELISA-reader („Microplate Reader“, Bio-Rad, München) bei 490 nm gemessen. Die spezifische Lyse (%) eines definierten E:T Verhältnisses als Maß für die ZTL-Reaktivität gegen ein spezifisches Peptid wurde nach der Formel berechnet:

$$100 \times \frac{(\text{gemessene LDH Freisetzung} - \text{spontane Effektor LDH Freisetzung})}{(\text{maximale Target LDH Freisetzung} - \text{spontane Target LDH Freisetzung})}$$

2.6.5.8 Bestimmung der *in vivo* Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Gag- oder GA-Gag-exprimierender P815 Zellen (murine, Mastozytoma) im Balb/c Mausmodel, wurden die Zellen mit 5-(und-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine *CellTracker* Orange (CMTMR, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. *CellTracker* Orange ist ein fluoreszierendes Chloromethyl-Derivat, das frei durch die Membran lebender Zellen diffundiert. Einmal in der Zelle, reagieren diese wenig thiol-reaktiven Farbstoffe mit intrazellulären Komponenten, was schließlich zu Zellen führt, die fluoreszieren und für mindestens 24 h ihre Viabilität behalten. *CellTracker* Orange CMTMR hat einen niedrigen pKa Wert, womit sichergestellt ist, dass bei allen physiologischen pH Werten die Zellen orange fluoreszieren. Als Kontrolle dienten P815, die nur GFP exprimieren; sie wurden mit 0,5 μ M *CellTracker* Orange angefärbt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Farbstoff in RPMI Medium ohne Serum gegeben und die Zellen wurden für 15-45 min im Brutschrank gefärbt (4×10^7 Zellen / 10ml Medium). Die transgen-exprimierenden Zellpopulationen hingegen wurden mit 10 μ M *CellTracker* Orange behandelt. Um weitere Zellteilung zu verhindern, wurden die gefärbten Zellen im Anschluss mit Mitomycin C (Sigma, Deisenhofen) behandelt. Die Zellen wurden in 5 ml Medium mit Mitomycin C (50 μ g/ml) resuspendiert und für 20 min im Brutschrank inkubiert. Nach 6-maligem Waschen mit PBS, wurden die P815 Zellen in PBS aufgenommen (1×10^8 /ml). Den mit pc-syngag immunisierten Balb/c Mäusen wurden je 2×10^7 / 200 μ l gefärbte P815 (1×10^7 GFP-P815 + 1×10^7 Transgen-P815) intravenös injiziert. Nach 5h wurden den Mäusen durch Anritzen der Schwanzvene 200-300 μ l Blut entnommen. Um zu verhindern, dass das Blut gerinnt, wurde 1 Tropfen Heparin (Heparin-Natrium-5000-ratiopharm, ratiopharm, Ulm) zugesetzt. Das heparinisierte Blut wurde quantitativ in ein 50 ml Falcon überführt, mit PBS auf 40 ml aufgefüllt und zentrifugiert (500 xg, 5 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die pelletierten Zellen mit 15 ml Erythrozyten-Lysepuffer (150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2) resuspendiert und zentrifugiert (500 g, 5min, RT). Bei nicht kompletter Lyse der Erythrozyten wurde der Vorgang wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 30 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 100 μ l FACS-Puffer I (PBS; 1 % FKS; 1 mg/ml Natriumazid) aufgenommen. Die Zellen wurden im FACS (FACScalibur; BD; Heidelberg, Germany) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Inhibition der HIV-1-Replikation durch induzierbare transdominant negative gag-Gene (*TDgag*)

3.1.1 Strategien zur HIV-1-abhängigen Induktion der Expression transdominanter Gag-Mutanten

Die Verbreitung des HI-Virus im Infizierten kann durch den Einsatz von HIV-1 abgeleiteten Proteinderivaten, die die Virusfreisetzung inhibieren und die Infektiösität der Nachkommenviren reduzieren, verhindert werden (Trono, 1989; Sakai, 1995; Furuta, 1997; Shimano, 1998). Diese Strategie beinhaltet jedoch einige Probleme bedingt durch die konstitutive Expression eines Fremdgens. Um Probleme zu umgehen, die bezüglich des Transgenproduktes (Zelltoxizität, Dysregulation zellulärer Funktionen, Immunogenität) (Smythe, 1994) auftreten können, wird die Expression von regulatorischen HIV-Proteinen induzierbar gemacht. Eine effektive Suppression der TD-Gene ist essentiell, um die ungewollte Lyse der transduzierten Zellen durch CD8⁺-T-Zellen zu verhindern. Zwei Regulationsprozesse, die spezifisch für HIV sind, können für die Kontrolle über die Genexpression genutzt werden: zum einen die Initiation der Transkription durch das virale Regulatorprotein Tat und zum anderen die Abhängigkeit des Exports von einfach- oder ungespleißter RNA durch das Rev-Protein. Der HIV-LTR Promotor ist in Abwesenheit von Tat ein sehr schwacher Promotor, jedoch steigt die Expression in Anwesenheit von Tat um das 2-4 fache (Ragheb, 1999). Der zweite regulatorische Komplex Rev/RRE (Rev responsive element) ist von einer Reihe *cis*-aktiver Elemente (5'-nicht translatierter Bereich des HIV Genoms inklusive der Hauptspleißstellen (*major splice sites*), INS (inhibitory sequences) und RRE) ebenso abhängig wie von dem trans-aktiven Rev-Protein. In Anwesenheit dieser *cis*-aktiven Elemente sind der nukleäre Export von transkribierten mRNAs und die folgende Translation abhängig von Rev. In dieser Arbeit sollten, ausgehend von einem synthetischen *TDgag*-Gen, verschiedene Strategien evaluiert werden, um die Immunogenität des Transgenproduktes zu verringern. Die Regulation der Expression durch Rev ist eine der effektivsten Strategien, die auf verschiedene Arten erreicht werden kann. Erstens durch den Transfer der inhibitorischen Elemente aus dem HIV Genom in den Transgen-Vektor oder zweitens, durch Umgehen der INS, indem das Transgen mit funktionellen Spleiß-Stellen umgeben wird. So wird das Transgen in Abwesenheit von Rev gespleißt und ist somit inaktiv. Eine dritte Möglichkeit ergibt sich daraus, dass die inhibitorische Aktivität mit dem A/U Gehalt der RNA-Sequenz korreliert (Graf, 2000); die INS

Funktion kann durch das Anpassen des A/T Gehaltes des Gens generiert werden, ohne dabei die Aminosäuresequenz zu verändern. Die beobachtete Rev-Induktion ist stärker als für andere Strategien berichtet (Marcello, 1998; Ragheb, 1999). Die Strategie, den Kodongebrauch zu verändern, scheint die effektivste Expressionskontrolle für TD-Gene zu sein. Eine noch stringenter kontrollierte Expression verspricht die Kombination aus Rev- und Tat-abhängiger Expression. Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein System zu entwickeln, das eine HIV-abhängige Expression von transdominanen Gag-Mutanten in eukaryontischen Zellen ermöglicht, um somit die Schwierigkeiten einer konstitutiven Genexpression in der HIV Gentherapie zu eliminieren. Um dies zu erreichen, wurden die Konstrukte in eine regulierbare HIV-Abhängigkeit versetzt, ohne dabei ihre stark inhibitorischen Eigenschaften zu verlieren.

3.1.2 Konstruktion und Beschreibung der TDgag Expressionsplasmide

HIV-1 transdominant-negative (TD) Gag-Derivate wurden als konstitutiv, Tat-, Rev- oder Tat/Rev-abhängig exprimierende Genkonstrukte hergestellt. Die Rev-Abhängigkeit wurde durch die Verwendung von HIV-wildtyp (wt) Gensequenzen inklusive des 5'-nicht translatierten Bereiches (UTR) in Verbindung mit dem HIV-RRE erreicht. Die Rev-Unabhängigkeit wurde durch synthetische, GC-reiche Gensequenzen möglich, wobei die kodierte Aminosäuresequenz für beide Konstrukte identisch ist. Die Herstellung des *syngag* Expressionskonstruktes *pc-syngag*, das ein kodonoptimiertes HIV-1 Gag-Gen enthält, wurde bereits im Detail beschrieben (Graf, 2000). Eine Abhängigkeit von Tat wurde durch die Verwendung des HIV-1-LTR Promotor zur Transkriptionskontrolle erreicht. Demgegenüber wurde für eine konstitutive Transkription der CMV Promotor/*enhancer* verwendet. Durch entsprechende Kombination der Elemente wurde eine konstitutive Expression (CMV-*syngag*), eine Tat-abhängige (LTR-*syngag*), eine Rev-abhängige (CMV-UTR-*wtgag*-RRE) und eine Tat- und Rev-abhängige (LTR-UTR-*wtgag*-RRE) Expression von auf Proteinebene identischen TD Gag-Derivaten generiert.

Der Leserahmen des HIV-1 Gruppen-spezifischen Antigens (Gag) sollte unter Verwendung einer Kodonwahl, die der in humanen Zellen vorkommenden entspricht, synthetisch aufgebaut werden. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des *gag*-Gens in eine optimierte Nukleotidsequenz übersetzt und eine Deletion von Nt 306-489 eingeführt, die die transdominanen Eigenschaften vermittelt. Für die Kodonoptimierung der RNA-Sequenz wurde entsprechende Software (GeneOptimizer, GENEART) verwendet. Zur Subklonierung, sowie zum Anfügen weiterer Sequenzelemente innerhalb nicht translatierter Regionen, wurden zusätzliche Schnittstellen eingefügt. Die so generierte Sequenz wurde als vollsynthetisches Gen unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide und einer bereits beschriebenen Methode (Zolotukhin, 1996) hergestellt. Das so hergestellte, TDGag-

kodierende DNA Fragment (*TDsyngag*) wurde unter Verwendung der Schnittstellen *Eco*RI und *Xba*I in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) unter die transkriptionelle Kontrolle des Cytomegalie-Virus Promotors (CMV, *early promoter/enhancer*) gestellt. Zur Herstellung eines analogen, jedoch in seiner Kodonwahl dem HIV Wildtyp entsprechenden Expressionsplasmides, wurde die kodierende Region des HIV-1 *gag*, inklusive des 5'-nicht translatierten Bereichs (UTR) subkloniert und um die Voraussetzungen für einen Rev-vermittelten Kernexport zu erfüllen, dem *wtgag*-kodierenden Bereich eine RNA-Zielsequenz (RRE) angefügt (Graf, 2000). Diese Zielsequenz interagiert auf RNA-Ebene mit einem viralen Kernexportprotein (Rev) und zellulären Komponenten. Das Wildtyp Konstrukt (Abb. 3.1-1) wurde durch Einführung von zwei aufeinander folgenden Stopp-Kodons im *gag*-Leserahmen C-terminal verkürzt (Kodons für Phenylalanin an Position 372 und Leucin an 373 wurden mutiert), um exakt dem synthetischen Gen zu entsprechen. Die Mutationen wurden durch gerichtete Mutagenese (QuickChange „site directed mutagenesis“-Kit, Stratagene) unter Verwendung der Oligonukleotide gag-stop1 (5'-GGAAGGCCAGATCTTCC CTCATTAATTAGCCTGTCTCAGTAC-3') und gag-stop2 (5'-GTACTGAGAGACAGGGCTA ATTAATGAGGGAAGATCTGGCCTTCC-3') eingeführt. Das resultierende Konstrukt wurde pc-CMV-UTR-*wtgag*-RRE bezeichnet. Unter der Verwendung der Oligonukleotide Del1 (5'-TAAAGCTTCCTTGGTGTC-3') und Del2 (5'-TTCAGCCCAGAAGTAATACC-3') wurde diesem Konstrukt - analog dem *TDsyngag* - eine Deletion von Nt 306 bis Nt 489 eingefügt (pc-CMV-UTR-TD*wtgag*-RRE). Wie bereits dargelegt, muss der kodierende Bereich unter der transkriptionellen Kontrolle des HIV Promotors stehen, um eine Tat-Abhängigkeit des Gag Proteinderivates sicherzustellen. Die HIV-1 LTR-Region wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide ltr1 (5'-ATTGTCGACACGCGTTGGAAGGGCTAATTCACT CC-3') und ltr2 (5'-ATTGAATTCTCTCTCCTCTAGCCTC-3') aus proviraler HIV-1 DNA amplifiziert und in den *Mlu*I / *Eco*RI linearisierten pc-CMV-*TDsyngag* direkt vor das ATG des *gag*-kodierenden Leserahmens gesetzt. Hierbei wurde der CMV Promotor gegen das HIV-LTR ausgetauscht. Für den Austausch des Promotors im *wtgag*-Konstrukt wurden Teile des HIV-Genoms unter Verwendung der Oligonukleotide ltr1 und ltr3 (5'-GCTTGCCCATACTATA TG-3') mittels PCR amplifiziert und in das *Mlu*I / *Cla*I linearisierte pc-CMV-UTR-TD*wtgag*-RRE Konstrukt kloniert. Dabei wurde der natürliche Leserahmen des HIV Provirus (LTR-UTR-*gag*) wieder hergestellt. Die resultierenden Konstrukte wurden im Weiteren pc-LTR-*TDsyngag* bzw. pc-LTR-UTR-TD*wtgag*-RRE genannt.

Ausgehend von den Konstrukten pc-CMV-*TDsyngag*, pc-LTR-*TDsyngag*, pc-CMV-UTR-TD*wtgag*-RRE und pc-LTR-UTR-TD*wtgag*-RRE wurde durch die Verwendung der Oligonukleotide Del3 (5'-TACAAGACCCTGCGCGCCGAGCAGGCC-3'), Del4 (5'-CTCCCT CATCTGGCCGGGGCGATGGG-3') (*syngag*), Del5 (5'-TTCTCTCATCTGGCCTGGTGCA

ATAGG-3') und Del6 (5'-TATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCT-3') (*wtgag*) eine weitere Deletion in den *gag*-Leserahmen (Nt 690 – 900) eingeführt. Diese Deletion betrifft die Aminosäuren 230 bis 300, ein Bereich in dem sehr viele CTL-Epitope identifiziert wurden (Abb. 3.1-1 und 3.1-2).

3.1.2.1 Herstellung der induzierbaren *TDgag*-Expressionskonstrukte

HIV-1 transdominant negative (TD) Gag-Derivate wurden als konstitutiv, Tat-, Rev- oder Tat/Rev- abhängig exprimierende Gen-Konstrukte hergestellt. Die Rev-Abhängigkeit wurde durch Verwendung der Wildtyp *gag*-Sequenz, einschließlich des 5' nicht translatierten Bereichs (UTR) in Kombination mit dem HIV RRE (*Rev responsive element*) erreicht (Abb. 3.1-1).

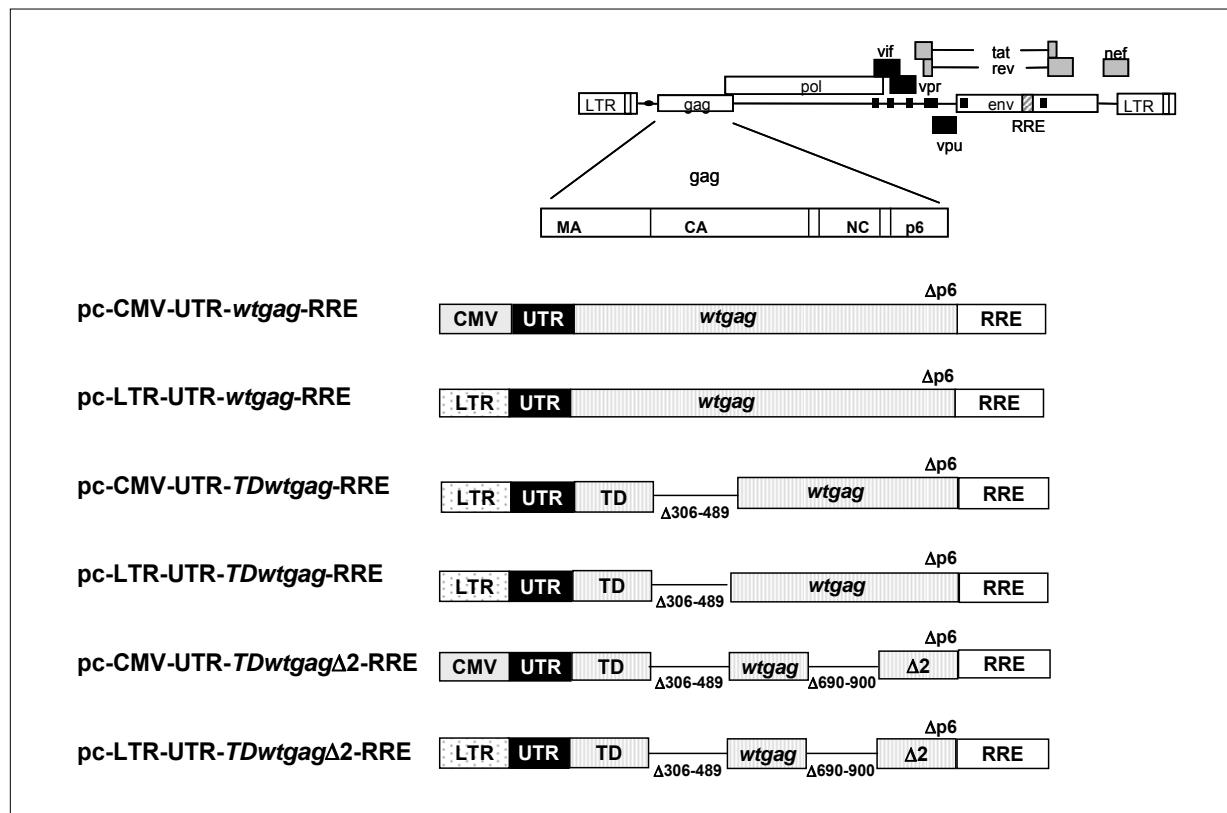


Abbildung 3.1-1: Schematische Darstellung der Rev-abhängigen (pc-CMV-UTR-wtgag-RRE) und Rev/Tat-abhängigen (pc-LTR-UTR-wtgag-RRE) eukaryontischen Expressionsvektoren. Neben den für die Gag-Varianten kodierenden Regionen sind zudem die jeweiligen 5'- nicht translatierten Bereiche (UTR) und das Rev responsive element (RRE) angezeigt. Die induzierbaren transdominat negativen Konstrukte wurden durch Einführung einer Deletion von 60 aa (TD; Nt 306-489) im Übergangsbereich von p17 und p24 hergestellt (pc-CMV-UTR-TDwtgagRRE; pc-LTR-TDwtgagRRE). Eine zweite Deletion (Δ2; Nt 690-900) innerhalb der Kapsidsequenz (p24) wurde eingeführt, um bekannte CTL Epitope zu entfernen (pc-CMV-UTR-TDwtgagΔ2RRE; pc-LTR-TDwtgagΔ2RRE). CMV = Cytomegalie Virus Promotor; LTR = HIV Promotor (*long terminal repeat*);

Die Tat-Abhängigkeit wurde durch den Einsatz des HIV-1-LTR zur Transkriptionskontrolle erreicht. Für eine konstitutive Transkription wurde der CMV Promotor/enhancer verwendet. Durch die Kombination dieser Elemente wurden die konstitutive Expression (CMV-syngag), die Tat-abhängige (LTR-syngag), die Rev-abhängige (CMV-wtgag) und die Tat/Rev-abhängige (LTR-wtgag) Expression von identischen TDGag-Derivaten erreicht. Alle unter

Verwendung der Wildtyp Sequenzen hergestellten Gag-kodierenden Konstrukte sind in Abbildung 3.1-1 abgebildet, die Konstrukte mit optimierter Kodonwahl sind in Abbildung 3.1-2 dargestellt.

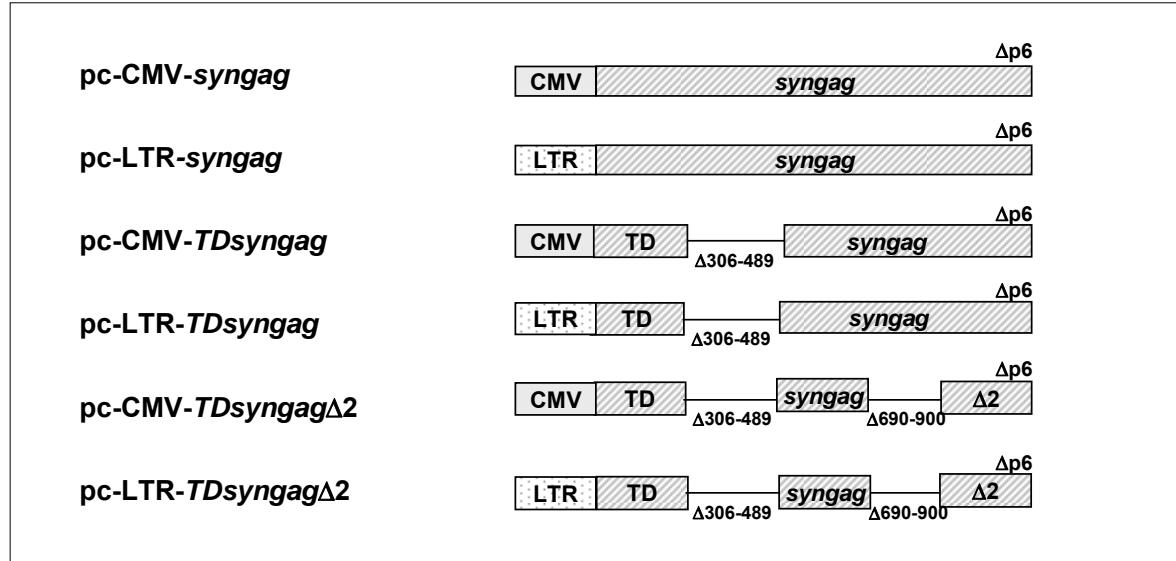


Abbildung 3.1-2: Schematische Darstellung der konstitutiv (pc-CMV-syngag) und Tat-abhängigen (pc-LTR-syngag) eukaryontischen Expressionsvektoren. Die transdominant-negativen, kodonoptimierten Konstrukte wurden durch Einführung einer Deletion von 60 aa (TD; NT 306-489) im Übergangsbereich von p17 und p24 hergestellt (pc-CMV-TDsyngag; pc-LTR-TDsyngag). Eine zweite Deletion (Δ2; NT 690-900) im Kapsid (p24) wurde eingeführt, um bekannte CTL Epitope zu entfernen und somit die Immunogenität zu reduzieren (pc-CMV-TDsyngagΔ2; pc-LTR-TDsyngagΔ2). CMV = Cytomegalie Virus Promotor; LTR = HIV Promotor (*long terminal repeat*).

3.1.3 Einfluss der Induzierbarkeit auf die Expression der gag-Konstrukte

3.1.3.1 Nachweis der Rev- oder Tat-abhängigen Induktion der Expression von TDGag

Humane H1299 Zellen wurden transient mit den verschiedenen *gag*-Konstrukten transfiziert und die Expression in Ab- und Anwesenheit von Tat und Rev analysiert (Abb. 3.1-3). Für pc-CMV-TDsyngag konnte die konstitutive Expression unabhängig von Tat und Rev gezeigt werden (Abb. 3.1-3 A, Spur 2 und Abb. 3.1-3 B, Spur 2). Die nur geringe Expression von TDgag durch pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE wurde durch Cotransfektion von Rev um das 2,7-fache gesteigert (Abb. 3.1-3 A Spur 3 und 4 und Abb. 3.1-3 B Spur 3 und 4). Tat erhöhte die Expression bei pc-LTR-TDsyngag um das 1,3-fache (Abb. 3.1-3 A Spur 5 und 6 und Abb. 3.1-3 B Spur 5 und 6). Die basale TDGag-Expression von pc-LTR-TDsyngag und pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE war im Vergleich mit pc-CMV-TDsyngag erheblich reduziert.

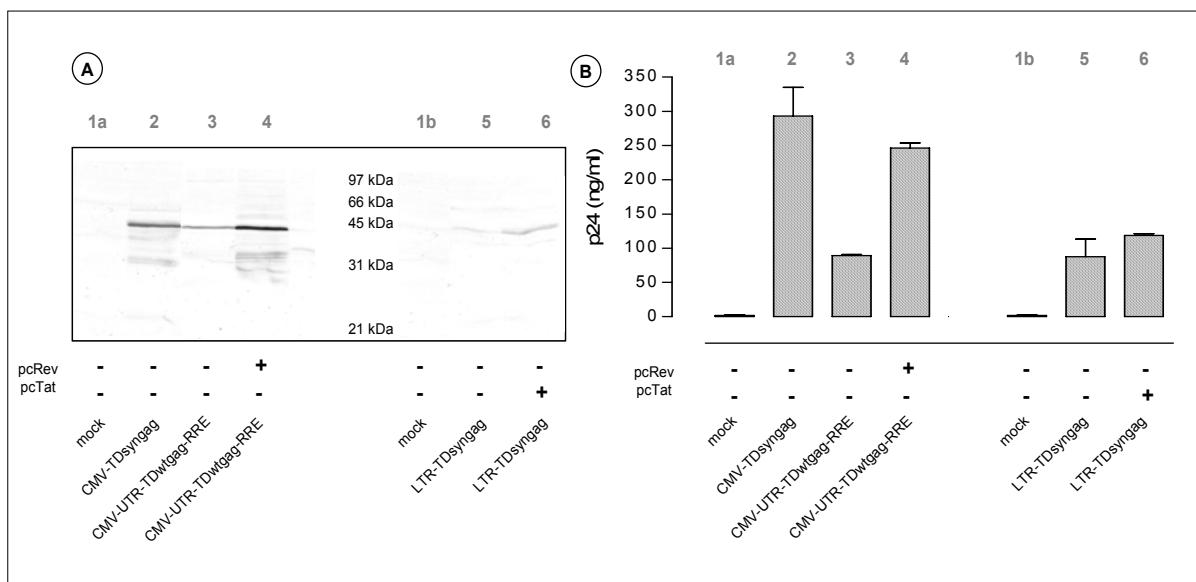


Abbildung 3.1-3: Gag-Expression durch Rev- bzw. Tat-Induktion. Gag-Expressionsanalysen nach transakter Transfektion humaner H1299 Zellen mit den angegebenen Rev-abhängigen und Tat-abhängigen Expressionskonstrukten und Cotransfektion eines Rev-bzw. Tat-Expressionsplasmids. **(A)** Von den Zelllysaten wurden gleiche Mengen Gesamtprotein (50 µg) in einem 12,5%-igem SDS-Page aufgetrennt und mit Hilfe eines Gag-spezifischen Antikörpers (16/4/2) durch Immunoblotting detektiert. **(B)** Zudem wurde die Gag Konzentration in den Zelllysaten mittels p24-ELISA quantifiziert.

3.1.3.2 Nachweis der Rev/Tat-abhängigen Induktion der Expression von TDgag

Das Produkt von pc-LTR-UTR-TDwtgag-RRE konnte mit diesen Methoden nicht nachgewiesen werden. Die Deletionen in Gag führten zu reduzierter Erkennung durch monoklonale Antikörper und in Kombination mit der stark limitierten Expression waren die erreichten Mengen an TDGag zu gering, um durch Antikörper detektiert zu werden. Deswegen wurde die Tat- und Rev-Abhängigkeit mit einem Referenzkonstrukt (komplette wtgag Sequenz) untersucht. Das Konstrukt (pc-LTR-UTR-wtgag-RRE) war sowohl Tat als auch Rev-abhängig. Tat führte zu einer 2-fach höheren Expression, verglichen mit dem Basallevel (Abb. 3.1-4 B, Spur 2 und Spur 4), Rev konnte die Expression um das 8,3-fache steigern (Abb. 3.1-4 B, Spur 2 und Spur 3) und die Kombination von Tat und Rev erbrachte einer Steigerung der Proteinmenge um das 22-fache (Abb. 3.1-4 B, Spur 2 und Spur 5).

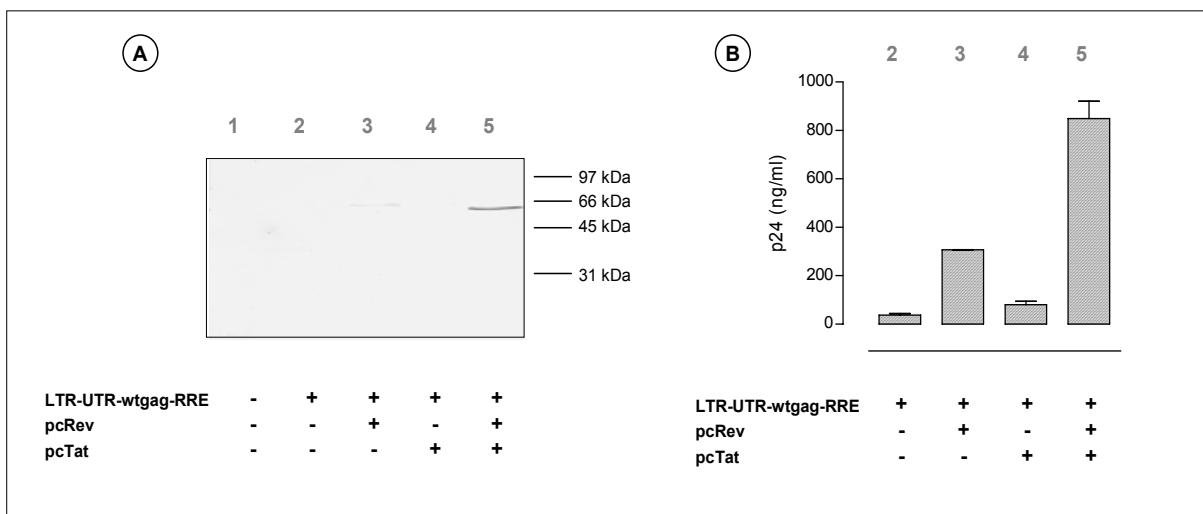


Abbildung 3.1-4: Analyse der Induktion der Gag-Expression durch Tat und Rev. Gag Expressionsanalyse nach transienter Transfektion humarer H1299 Zellen mit einem Rev- und Tat-abhängigen Gag-Expressionskonstrukt (LTR-UTR-wtgag-RRE) und Cotransfektion von Rev- bzw Tat-Expressionsplasmiden. (A) Von den Zelllysaten wurden gleiche Mengen Gesamtprotein (50 µg) in einem 12,5%-igem SDS-Page aufgetrennt und mit Hilfe eines Gag-spezifischen Antikörpers (16/4/2) durch Immunoblotting nachgewiesen. (B) Zudem wurde die Gag-Konzentration in den Zelllysaten mittels p24-ELISA quantifiziert.

3.1.4 Inhibition der HIV-1-Replikation durch TDgag-Konstrukte

3.1.4.1 Hemmung der Virusfreisetzung in transienten Transfektionsstudien

H1299 Zellen wurden transient mit HX10 proviraler Plasmid-DNA und einem transdominant-negativen Konstrukt bzw. pcDNA3.1 als Kontrolle transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Überstände geerntet, mittels spezifischem ELISA der p24 Gehalt bestimmt und anhand der nicht gehemmten Kontrolle die Inhibition der Konstrukte errechnet. Alle getesteten TD-Konstrukte induzierten eine signifikante Inhibition der Partikelfreisetzung, wie in Abb 3.1-5 dargestellt. Die TDsyngag Konstrukte bewirkten unabhängig von der Promotorregion eine sehr hohe Hemmung. Im Gegensatz dazu war die inhibitorische Aktivität bei den Wildtyp-Konstrukten von der Promotorregion abhängig: die Hemmung der Partikelfreisetzung war deutlich höher, wenn die Transgenexpression unter der Kontrolle des CMV-Promotors stand. Die Ergebnisse zur Reduktion der Infektiösität der noch freigesetzten Partikel korrelierten im Wesentlichen mit den Daten aus der nachgelagerten Partikelfreisetzung. Hierfür wurde der nach 48 h geerntete Überstand auf MAGI-Zellen gegeben, und nach weiteren 48 h wurde die Anzahl an infizierten Zellen durch den Nachweis von β -Galactosidase ermittelt. Fast vollständige Hemmung der Partikelfreisetzung und Reduktion der Infektiösität konnte für pc-CMV-TDsyngag (94 % / 94 %), pc-LTR-TDsyngag (94 % / 94 %) und pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE (93 % / 99 %) gezeigt werden, wohingegen pc-LTR-UTR-TDwtgag-RRE nur etwa 59 % Inhibition der Freisetzung erreichte und die Infektiösität der Nachkommen nur um 52 % reduzierte.

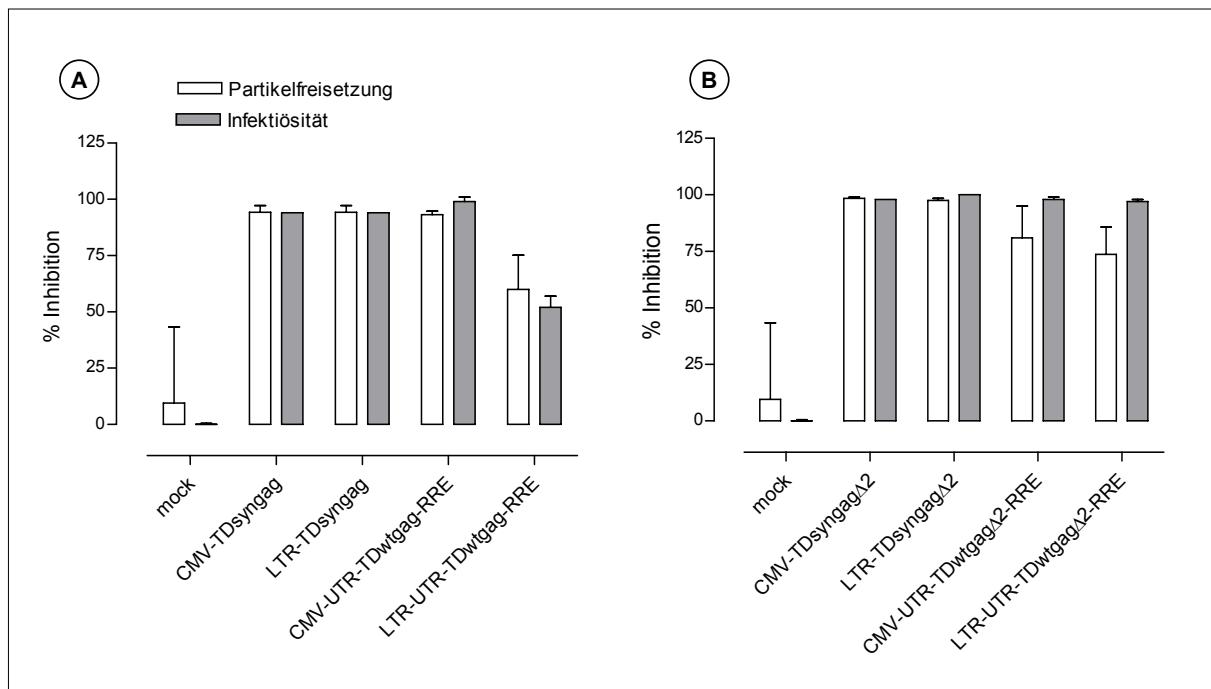


Abbildung 3.1-5: Hemmung der HIV-1 Freisetzung durch transdominante Gag-Mutanten. H1299 Zellen wurden mit proviraler HIV-1 Plasmid-DNA (pHX10) und mit den angegebenen TDgag-Konstrukten oder pcDNA3.1 cotransfiziert und 48h kultiviert. Mittels ELISA wurde der p24 Gehalt im Überstand bestimmt, und bezogen auf die Infektionskontrolle (HX10 + pcDNA3.1) wurden die %-Hemmung berechnet. Die Hemmung der Infektiosität der Nachkommenviren wurde bestimmt, indem MAGI Zellen mit dem Überstand infiziert wurden, und wiederum anhand der Infektionskontrolle (HX10 + pcDNA3.1) wurde die Hemmung der Infektiosität berechnet. **(A)** Hemmwirkung der transdominant negativen, induzierbaren Konstrukte (TD). **(B)** Inhibitionsdaten der TD Konstrukte mit der zweiten Deletion ($\Delta 2$) in p24. Dargestellt ist das Mittel aus 6 unabhängigen Versuchen.

Ausgehend von pc-CMV-TDsyngag, pc-LTR-TDsyngag, pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE und pc-LTR-UTR-TDwtgag-RRE wurde eine weitere Deletion im Gag-Leserahmen eingeführt. Die Deletion von aa 230-300 wurde gewählt, um die Immunogenität weiter zu reduzieren, da für diesen Bereich multiple, murine CTL-Epitope beschrieben sind. Die Expression der neu hergestellten TD-Konstrukte pc-CMV-TDsyngag $\Delta 2$, pc-LTR-TDsyngag $\Delta 2$, pc-CMV-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ -RRE und pc-LTR-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ -RRE war aufgrund fehlender Gag-spezifischer Antikörper für das modifizierte Protein nicht nachweisbar. H1299 Zellen wurden, wie bereits beschrieben, mit den TD $\Delta 2$ -Konstrukten oder pcDNA3.1 sowie dem proviralen HX10 Konstrukt transfiziert, um den transdominant-negativen Effekt zu verifizieren. Die Überstände wurden mit Hilfe eines p24-spezifischen ELISA analysiert und auf MAGI-Zellen getestet. Alle untersuchten Konstrukte bewirkten eine Inhibition der Partikelfreisetzung und reduzierte Infektiosität der Nachkommenviren (Abb 3.1-5 B). Anhand dieser Daten ergibt sich bezüglich der inhibitorischen Eigenschaften folgende Rangfolge: pc-CMV-TDsyngag $\Delta 2$ (98%) > pc-LTR-TDsyngag $\Delta 2$ (97%) > pc-CMV-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ -RRE (80%) > pc-LTR-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ -RRE (73%) und ist somit im Wesentlichen äquivalent zu den Ergebnissen der TDGag Konstrukte. Die synthetischen Leserahmen zeigten dabei in beiden Fällen deutliche Vorteile bezüglich der Inhibition. Die Reduktion der Infektiosität der Nachkommen durch Wildtyp- und optimierte Gene war in diesem Versuch hingegen vergleichbar. Der direkte Vergleich der Ergebnisse aus der Rev- und Tat-Abhängigkeit zeigt einen klaren Vorteil für die Kombination des LTR-Promotors mit synthetischem gag-Leserahmen.

3.1.4.2 Inhibition der HIV-1-Replikation in stabil TDGagΔ2-exprimierenden Jurkat Zellen

Der inhibitorische Effekt von transdominant negativem Gag wurde in humanen T-Zellen (Abb. 3.1-6), die durch Flp-In-Rekombination (Invitrogen, Karlsruhe) stabil transfiziert worden waren, untersucht. Die Verwendung des Flp-In-Systems garantiert den gleichen Integrationslokus für alle darüber hergestellten Zelllinien. Flp-In-Jurkat Zellen wurden mit den transdominant negativen Konstrukten CMV-TDsyngagΔ2, LTR-TDsyngagΔ2, CMV-UTR-TDwtgagΔ2-RRE und LTR-UTR-TDwtgagΔ2-RRE transfiziert und im Anschluss durch Hygromycin-Zugabe selektiert. Zur Vereinfachung und Übersicht werden die Namen der Wildtyp-Konstrukte verkürzt (CMV-TDwtgagΔ2; LTR-TDwtgagΔ2). Die generierten Jurkat-Zelllinien exprimierten stabil TDsyngagΔ2 und TDwtgagΔ2, beide jeweils entweder unter Kontrolle des CMV-Promotors oder des HIV-1 LTR; zusätzlich wurden Zellen mit dem Leervektor als Kontrolle hergestellt. Diese Jurkat-Zellen wurden mit HIV_{NL4-3} mit einer MOI von 0,005 infiziert; die HIV p24 Mengen wurden im zellfreien Überstand über 15 Tage gemessen (Abb. 3.1-6 A).

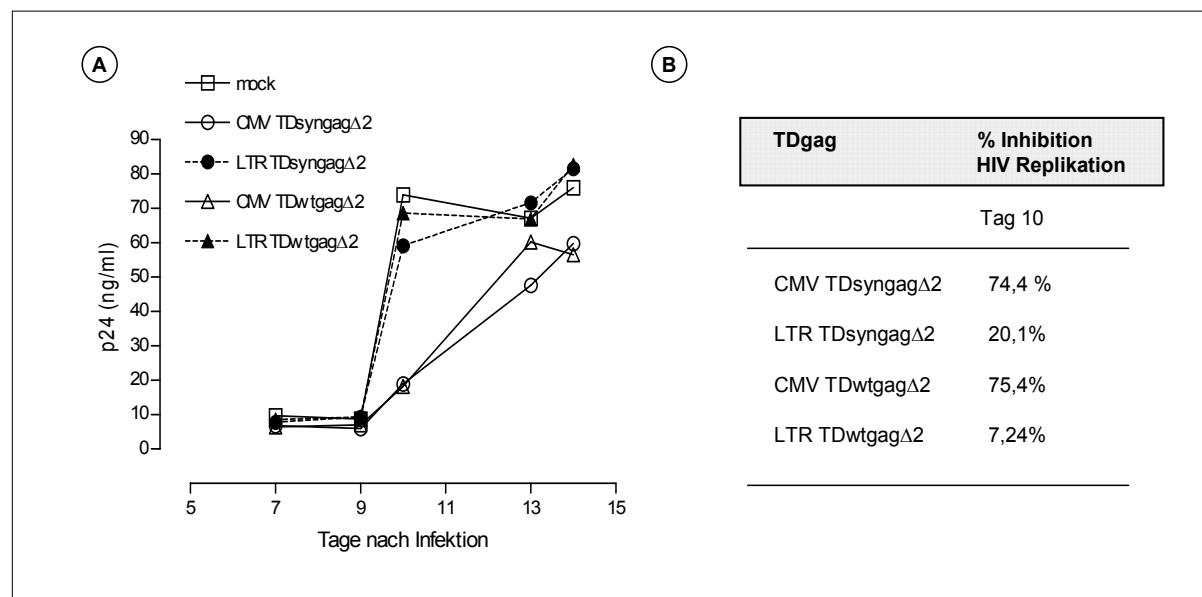


Abbildung 3.1-6: Antivirale Aktivität der induzierbaren TDgag-Derivate in Jurkat-Zellen. Replikationskinetik in stabil transfizierten TDgagΔ2-Jurkat Zelllinien nach Infektion mit HIV-1_{NL4-3}. (A) Die Jurkat Zelllinien wurden mit einer MOI von 0,005 infiziert. Alle 2-3 Tage wurden Proben des Überstandes zur Bestimmung des p24 Gehaltes genommen. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. (B) Tabellarische Übersicht der Inhibition der HIV-1 Replikation am Tag 10 in Prozent, gemessen an den Mock transfizierten Kontrollzellen.

An Tag 10 war die HIV Replikation in der Jurkat-Population, die TDsyngagΔ2 unter CMV Kontrolle exprimierten, zu 74 % supprimiert. In CMV-TDwtgagΔ2 transfizierten Jurkat-Zellen wurde die Replikation von HIV im Vergleich mit der Kontrolle ebenfalls zu 75 % gehemmt. Die beiden Konstrukte unter Kontrolle des HIV-LTRs (LTR-TDsyngagΔ2 und LTR-TDwtgagΔ2) zeigten sehr viel geringere Auswirkungen auf die HIV-Replikation. Das synthetische Konstrukt (LTR- TDsyngagΔ2) konnte die Replikation zu 20 % inhibieren und

das Wildtyp-Konstrukt LTR-TDwtgag Δ 2 war mit 7 % Inhibition unter diesen experimentellen Bedingungen das Gen mit den geringsten inhibitorischen Eigenschaften (Abb. 3.1.6 B). Das Konstrukt LTR-TDwtgag Δ 2 wurde im nächsten Versuch nicht mehr untersucht.

3.1.4.3 Inhibition der HIV-1-Replikation in transduzierten PM1 Zellen

Um das Potential der induzierbaren Konstrukte für eine Gentherapie zu untersuchen, wurden humane PM1 Zellen mit retroviralen Partikeln transduziert. Dazu wurden zunächst 293T Zellen mit dem retrovirusalen Transfervektor (M387), einem Vektor, der Gag und Pol kodiert (pM13) und pGALV Env, ein für das Hüllprotein kodierendes Plasmid, in einem Verhältnis 7.5 : 12.5 : 1 transfiziert. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend dazu verwendet, eine humane Lymphozytenzelllinie (PM1) zu transduzieren. Der Vektor enthielt entweder CMV-TDsyngag Δ 2, LTR-TDsyngag Δ 2 oder CMV-TDwtgag Δ 2, wobei das LTR-Konstrukt in reverser Orientierung kloniert wurde, um mögliche transkriptionelle Interferenzen zu vermeiden. Der entry-Inhibitor C46 (Egelhofer, 2004) wurde als Positivkontrolle und der Leervektor (M387) als Negativkontrolle verwendet. Durch das im Vektor enthaltene GFP-Gen konnten positiv transduzierte Zellen über FACS-Selektion angereichert werden. Die resultierenden PM1-Kulturen waren zu über 90 % GFP-positiv. Die transduzierten PM1 wurden mit HIV_{NL4-3} mit einer MOI von 0,1 infiziert. Proben der Zellkulturüberstände wurden alle 2-3 Tage genommen und mittels ELISA auf ihren p24 Gehalt hin untersucht (Abb. 3.1-7).

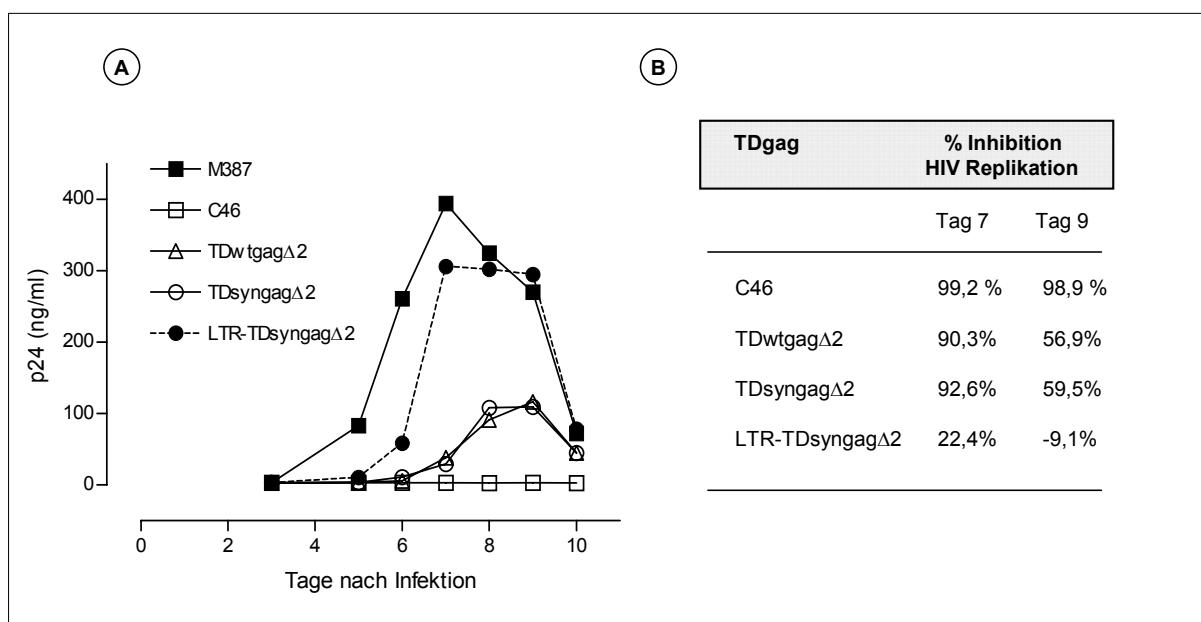


Abbildung 3.1-7: Antivirale Aktivität der TDgag-Derivate in humanen Lymphozyten. Replikationskinetik in den TDgag Δ 2-Zelllinien nach Infektion mit HIV-1_{NL4-3}. (A) Die stabil transduzierten PM1 Zelllinien wurden mit einer MOI von 0,1 infiziert. Alle 2-3 Tage wurden Proben des Überstandes zur Bestimmung des p24 Gehaltes genommen. Das Experiment wurde in Triplicaten durchgeführt. (B) Tabellarische Übersicht der Inhibition der HIV-1 Replikation an Tag 7 und Tag 9 in Prozent, gemessen an den mit M387 transduzierten Kontrollzellen.

Unter diesen experimentellen Bedingungen replizierte das HI-Virus in den Zellen, die mit LTR-TD*syngag* Δ 2 transduziert worden waren, annähernd so stark und schnell wie in den nicht geschützten Kontrollzellen. Die Hemmung der HIV-Replikation betrug bezogen auf die Replikation in nicht geschützten Zellen maximal 22 %. Die PM1-Kulturen, die mit TD*syngag* Δ 2 und TD*wtgag* Δ 2 transduziert worden waren, zeigten im Gegensatz dazu eine wesentlich stärkere Hemmwirkung. In diesen Zellen konnte sich das HI-Virus nur sehr abgeschwächt und zeitlich verzögert vermehren. Die HIV-Replikation konnte in PM1-TD*syngag* Δ 2 zu maximal 92 % und in PM-1-TD*wtgag* Δ 2 zu maximal 90 % inhibiert werden.

3.1.5 Zusammenfassung

Transdominant-negative Gag-Derivate sind starke Inhibitoren des HIV-Zusammenbaus und der Virusfreisetzung. Die Immunogenität der von Gag abgeleiteten Proteine schränkt ihre Verwendung in therapeutischen Ansätzen *in vivo* jedoch stark ein, da die Lyse der therapeutischen Zellen durch CD8⁺T-Zellen induziert werden kann. Die Expression des Transgens *in vivo* zu unterdrücken, so lange die Zelle nicht von HIV infiziert ist, bietet eine Möglichkeit, die transdominanten Gag-Mutanten dennoch anzuwenden. Die Expression des transdominant negativen Gag-Proteins kann Rev-, Tat- oder Tat/Rev-abhängig gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die basale Expression ohne regulatorische Proteine sehr gering und die Induktion der verschiedenen Konstrukte durch die Helperproteine sehr effektiv ist. In den transienten Inhibitionsstudien konnte gezeigt werden, dass alle Induktionsstrategien die Freisetzung von HIV-Partikeln fast vollständig verhindern. Eine Ausnahme bildete allerdings das Tat/ Rev-induzierbare Konstrukt (LTR-UTR-TDwtgag-RRE), das die Virionenfreisetzung kaum verringerte. Die Einführung einer zweiten Deletion ($\Delta 2$) zur Reduktion der CTL-Epitope und somit zur Reduktion der Immunogenität, hatte keinen Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften der transdominanten Gag-Mutanten. Die Virusfreisetzung konnte durch die Expression der transdominanten Konstrukte fast vollständig gehemmt werden. Die Ausnahme bildete das Tat/Rev-induzierbare Konstrukt (LTR-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ -RRE), das im Gegensatz zu den vergleichbaren Konstrukten (CMV-TDsyngag $\Delta 2$, LTR-TDsyngag $\Delta 2$ und CMV-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ -RRE) die Freisetzung der Viren nicht inhibieren konnte. In stabil transfizierten Jurkat Zellen wurde die HIV-Replikation durch das Tat/Rev-induzierbare Konstrukt (LTR-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ RRE) ebenfalls nur schwach gehemmt, weshalb auf dieses Konstrukt in weiteren Versuchen verzichtet wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die HIV-Replikation in den Jurkat-Zellen, die die Konstrukte CMV-TDsyngag $\Delta 2$ und CMV-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ -RRE exprimieren, bis zu 90 % reduziert und zeitlich verzögert wurde. Durch Transduktion mit retroviralen Partikeln hergestellte humane Lymphozyten-Zelllinien (PM1) wurden ebenfalls mit HIV infiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die HIV-Replikation durch das konstitutiv exprimierte Konstrukt (CMV-TDsyngag $\Delta 2$) und das Rev-abhängige Konstrukt (CMV-UTR-TDwtgag $\Delta 2$ -RRE) stark inhibiert wurde. Die Daten belegen, dass induzierbare, transdominant-negative Gag-Varianten wirksame Inhibitoren der HIV-1 Replikation sind.

3.2. Einfluss eines 24 Aminosäuren Glycin-Alanin-Bereichs auf die Funktionalität und Stabilität von transdominantem Gag und die Eigenschaften

3.2.1 Wirkung des Glycin-Alanin (GA) Bereichs von EBNA-1

Der Glycin-Alanin (GA) Bereich in EBNA-1 bzw. sein Einfluss auf die Struktur und die Ladung des Proteins ist die Ursache der ineffizienten Degradation von EBNA-1 durch das Proteasom. Die Fusion dieses GA-Bereiches an verschiedene Reportergene, einschließlich β -Galactosidase, HSV-1 Thymidinkinase und „*Firefly* Luziferase“, zeigte, dass der Mechanismus auf andere Proteine übertragbar ist (Ossevoort, 2003). Somit sollte die GA-Region aus dem EBNA-1 dazu verwendet werden können, die proteasomale Degradation von therapeutischen Transgenen zu verhindern. Besonders im Falle einer HIV-Gentherapie ist die bestehende Immunantwort des Patienten gegen Proteine des HI-Virus eine große Hürde. Die genmodifizierten, therapeutischen CD4 $^+$ T-Zellen werden von spezifischen CTL erkannt und nachfolgend lysiert. Bisherige Studien haben gezeigt, dass die ineffiziente Degradation von EBNA-1 durch das Proteasom für die schlechte endogene Prozessierung verantwortlich ist. Um diesen Effekt auf transdominante Varianten von HIV-1 Gag zu übertragen, wurde ein 24 Aminosäuren langer Bereich N-terminal an die Gag-Gene (*syngag* und *TDsyngag*) fusioniert.

Es wurden nur 24 Aminosäuren der normalerweise 239 Aminosäuren langen GA-Region gewählt, da gezeigt wurde (Masucci, 2000), dass dieser Bereich ausreicht, die Proteolyse zu verhindern. Da die Transgene später in Kombinationen verabreicht werden sollen, ist es in Hinblick auf die limitierte Verpackungskapazität der Retroviren besser die einzelnen Module so klein wie möglich zu halten.

3.2.2 Herstellung der GA-Gag Expressionskonstrukte

Das *syngag*-Konstrukt wurde bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, ebenso wie die Deletion im Übergangsbereich von p17 und p24 (*TDsyngag*), die zur transdominanten Wirkung auf die HIV-Replikation führt. Die Gene wurden in das mit *Eco*RI und *Xba*I linearisierte Plasmid pCDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) unter die Kontrolle des Cytomegalie-Virus (CMV) „*early Enhancer*“/Promotor eingesetzt. Die Konstrukte wurden im Folgenden als pc-*syngag* und pc-*TDsyngag* bezeichnet.

Das Glycin-Alanin-kodierende Gen (GA) wurde durch das Aneinanderlagern zweier Oligonukleotide GA-1 (GGAGGTGCAGGTGCCGGGGCAGGTGGAGGAGCTGGTGCTGGA GCAG) und GA-2 (ACCTGCTCCAGCTCCAGCGCCTCCACCTGCTCCAGCACCCAGCTCC

T) gefolgt von einer PCR-Amplifikation mit Hilfe der Oligonukleotide GA-3 (CGTATGAATTC CGTCTCAATGGGAGGTGCAGGTGCCGGGC) und GA-4 (CAGCCTGCGGCCGCTTAA GAAGACTCACCTGCTCCAGCTCCAGCGCC) generiert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I geschnitten und in das *Eco*RI/*Not*I linearisierte Plasmid pcDNA3.1 kloniert. Das entstandene Plasmid wird im Weiteren pc-GA genannt. Für die Herstellung der Konstrukte pc-*GAsyngag* und pc-*GATDsyngag* wurden die Gene *syngag* und *TDsyngag* mit den Oligonukleotiden GA-*Nsyngag*-5' (AATGAAGACATAGGTATGGCGCC AGGGCCAGCGTG) und BGHR3' (CTAGAAGGCACAGTCGAGGCTG) durch PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit *Bbs*I und *Xho*I verdaut und in den mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bsm*BI und *Xho*I linearisierten Vektor pc-GA kloniert. Die dadurch entstandenen Konstrukte wurden im Weiteren als pc-*GAsyngag* und pc-*GATDsyngag* bezeichnet.

Der retrovirale Vektor M387 wurde von D. von Laer (GSH, Frankfurt) zur Verfügung gestellt und kürzlich im Detail beschrieben (Egelhofer, 2004). Die Gene *TDsyngag* und *GATDsyngag* wurden mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide GA-*Not*-5' (ACTTAGCGGCCGC ATGGGAGGTGCAGGTGCC) bzw. *syngag*-*Not*-5' (AATAGCGGCCGCATGGCGCCAGGG CCAGCGT) und *syngag*-rev-*Eco* (CGTATGAATTCTCAGTTTCCTGCCTCTCGGTG) amplifiziert. Die PCR Produkte wurden mit *Eco*RI und *Not*I verdaut und in den entsprechend linearisierten Vektor M387 kloniert, wodurch die Plasmide M-*GATDsyngag* und M-*TDsyngag* entstanden. Eine schematische Darstellung der in der Arbeit hergestellten und verwendeten Konstrukte findet sich in Abbildung 3-2-1.

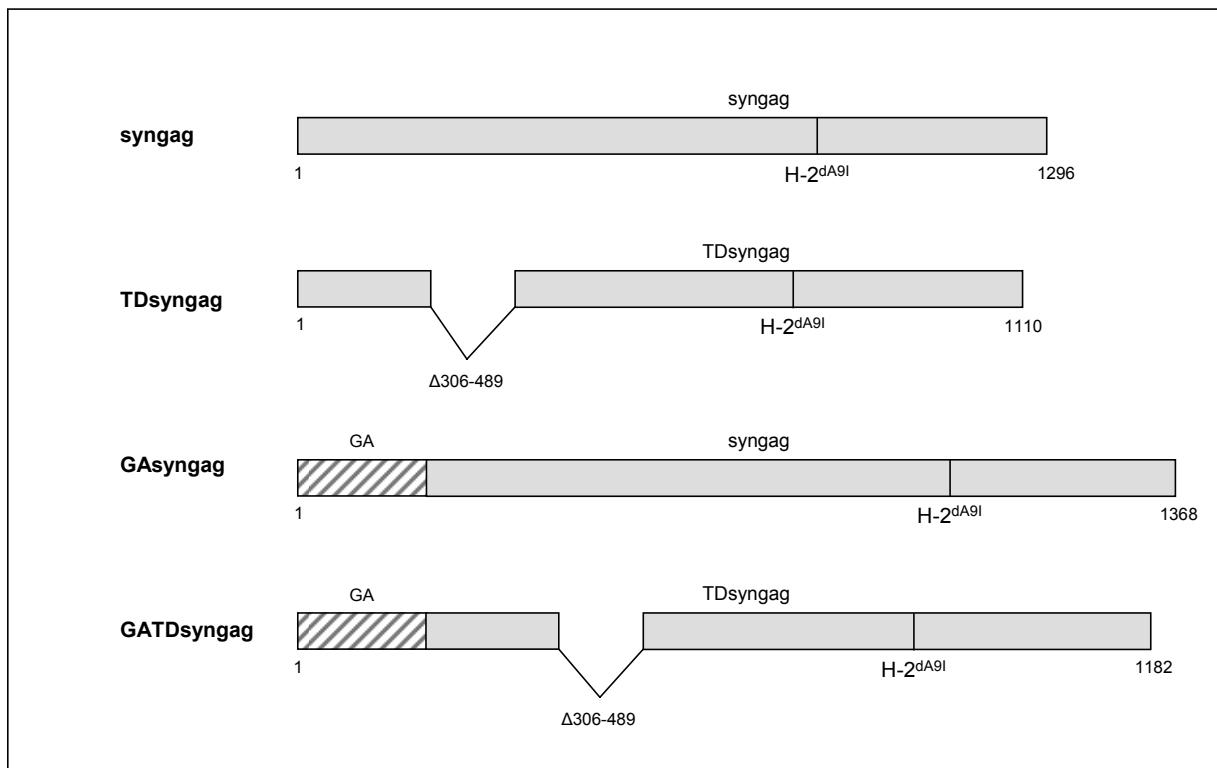


Abbildung 3.2-1: Schematische Darstellung der verwendeten Gag bzw. TDGag Expressionsvektoren mit und ohne GA. Kodon und RNA-optimierte synthetische Gene wurden für die Expression des kompletten Gag Proteins (syngag) und der transdominant negativen Form TDGag (TDsyngag) mit einer Deletion von 183 Nukleotiden (306-489nt) verwendet. Zusätzlich wurden beide Gene N-terminal mit dem Gen fusioniert, dass für einen Bereich von 24 Aminosäuren kodiert, der nur aus Glycin und Alanin besteht (GA-syngag und GATDsyngag). Innerhalb der oben abgebildeten Konstrukte befindet sich das murine, H-2^d restriktierte p24 CTL Epitop A9I (aa 197-205; AMQMLKETI).

3.2.3 Einfluss von GA auf die inhibitorischen Eigenschaften von TDsyngag

Um zu überprüfen, ob das transdominante Gag seine inhibitorischen Eigenschaften bzgl. der HIV-1 Replikation trotz der Fusion mit dem 24 Aminosäure langen Bereich beibehält, wurden Infektionsstudien durchgeführt. Hierfür wurden durch Transduktion mit retrovirkalen Partikeln PM1-Zellen (humane T-Zellen) generiert, die TDGag und GATDgag stabil exprimieren. PM1 Zellen, die nur den Leervektor M387 (Abb. 3-2-2 A) bzw. den Vektor M87o (enthält den Klasse-1 Inhibitor C46) enthalten, wurden als Kontrollen verwendet. Die Transgen-exprimierenden Zellen wurden schließlich mit den CXCR4-trophen HIV-1_{NL4-3}, den CCR5-trophen HIV-1_{JRFL} und den dualtrophischen HIV-1_{D117II} Stämmen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,01 infiziert. Alle 2-3 Tage wurde ein Aliquot des Zellkulturüberstandes entnommen; mittels quantitativen p24-ELISA aus den Überständen wurde die HIV Replikation über 14 Tage hinweg beobachtet.

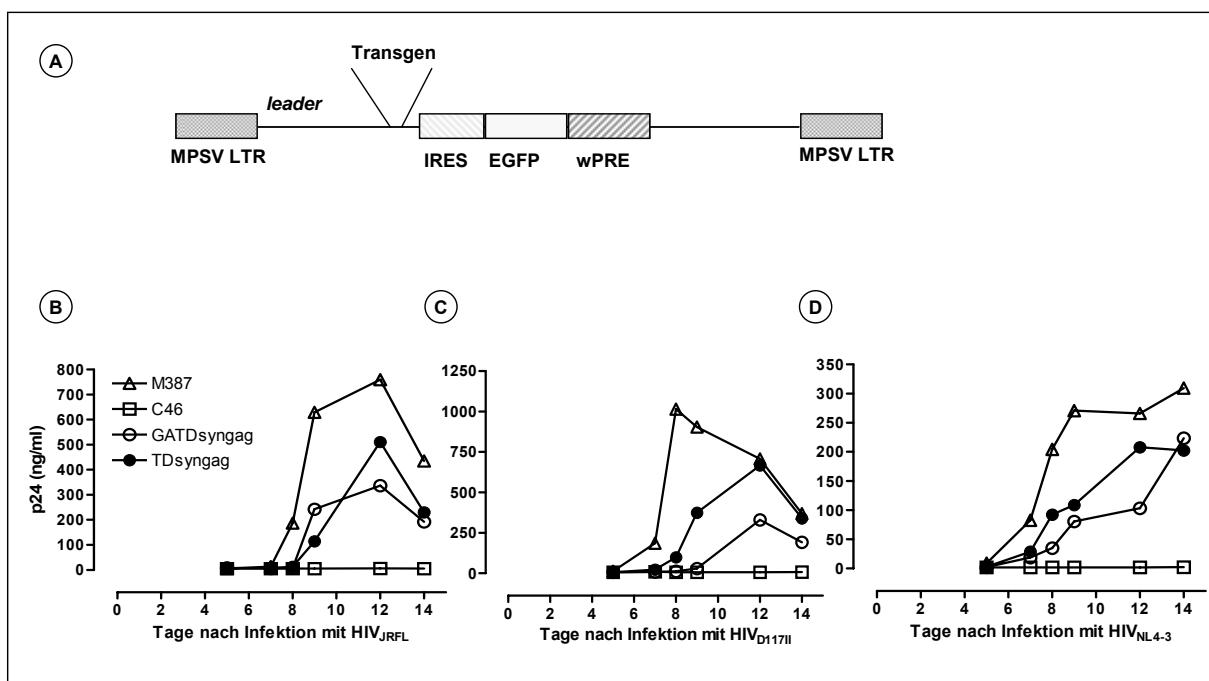


Abbildung 3.2-2: Einfluss von GA auf die antivirale Aktivität von TDGag. (A) Schematische Darstellung des auf dem MLV basierenden Transfervektors M387. Der retrovirale Vektor M387 besteht aus den 5'-LTR (long terminal repeat) und 3'-LTR des Myeloproliferativen Sarkom-Virus (MPSV), einer EMCV IRES (Encephalomyocarditis-Virus internal ribosome entry site), EGFP (enhanced green fluorescence protein) als Markergen und einem wPRE (posttranskriptionelles regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis-Virus). (B,C,D) Replikationskinetik in den Mock- (M387), C46 (M87o), TDsyngag- und GATDsyngag-Zelllinien nach Infektion mit drei verschiedenen HIV-1 Laborstämmen (B) HIV_{JRFL}; (C) HIV_{D117II}; (D) HIV_{NL4-3}. Die PM1 Zelllinien wurden mit den HI-Virusstämmen NL4-3, D117II und JRFL mit einer MOI von 0,01 infiziert. Alle 2-3 Tage wurden Proben des Überstandes zur Bestimmung des p24-Gehaltes genommen. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Aus Gründen der Übersicht wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken ($\pm 0,1-50,1$) verzichtet.

Im Vergleich zu den nicht geschützten Kontrollzellen (M387-PM1) wurde die HIV-1 Replikation in den PM1-Zellen, die TDGag und GATDGag exprimierten, signifikant (bis zu 90% an Tag 8 der Replikation von HIV_{D117II}) gehemmt (Abb. 3.2-2 B, C, D). In den Kontrollzellen, die den Eintrittsinhibitor C46 exprimieren, wird die Replikation der drei Virusstämme um ca. 99 % gehemmt. Nach Infektion mit den CCR5-trophen Stamm JRFL (Abb. 3.2-2 B) erreichte die Replikation in den Kontrollzellen M387 an Tag 12 ihr Maximum. Gemessen am Maximum der Kontrolle betrug die Hemmung von HIV_{JRFL} durch TDsyngag 32 % und durch GATDsyngag 55 %. Das dualtrophe Virus D117II (Abb. 3.2-2 C) erreichte die maximale Replikation an Tag 8. In Zellen, die mit TDsyngag transduziert waren, wurde die HIV_{D117II}-Replikation zu 90 % inhibiert. Die Hemmung, die durch GATDsyngag erzielt wurde, beläuft sich auf 98 %. Die Replikation des CXCR4-trophen HIV-Stamms NL4-3 (Abb. 3.2-2 D) erreicht an Tag 14 ihr Maximum, daran gemessen konnte TDsyngag um 27 % hemmen und GATDsyngag um 34 %. TDsyngag hemmt die Replikation aller getesteten HI-Viren. Die Hemmung der Replikation durch das Konstrukt GATDsyngag war immer stärker als durch TDsyngag.

3.2.4 Einfluss von GA auf die molekularbiologischen Eigenschaften

3.2.4.1 Nachweis der Expression von Gag und TDGag mit Gly-Ala

Nach dem Nachweis der Funktionalität *in vitro* sollte die Gag-Expression mit den beschriebenen Expressionsplasmiden in transient transfizierten eukaryontischen Zellen analysiert werden. Dazu wurde die humane Zelllinie 293T mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zelllysate präpariert und die exprimierte Gag-Menge mittels Immunoblot-Analysen unter Verwendung p24-spezifischer Antikörper sowie quantitativ im ELISA bestimmt (Abb. 3-2-3 A und B).

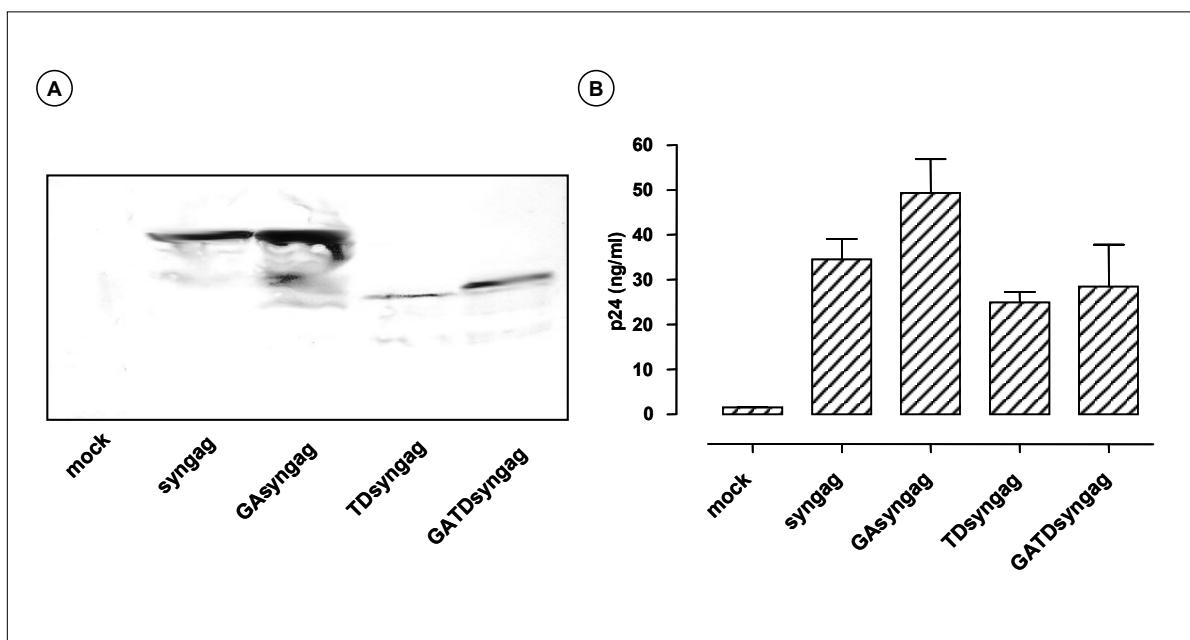


Abbildung 3.2-3: Nachweis und Quantifizierung der Expression der gag- und TDgag-Gene. (A) Lysate mit pcDNA3.1, pc-syngag, pc-GAsyngag, pc-TDsyngag oder pc-GATDsyngag transfizierter 293T-Zellen wurden mittels Western Blot mit einem Gag-spezifischen anti-CA Kaninchenserum analysiert. Dazu wurden 50 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen und über ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. (B) Die Gag-Konzentration in den Zelllysaten wurden mittels ELISA quantifiziert.

Nach Transfektion der verschiedenen für das Gag Polyprotein kodierenden Expressionsvektoren konnten durch ELISA- und Western Blot-Analysen Unterschiede zwischen den Genprodukten von, mit pc-syngag und pc-GAsyngag bzw. pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag transfizierten Zellen festgestellt werden. Zum einen wird durch die Fusion mit dem GA-Bereich die Größe des Proteins erhöht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Proteinmengen der GA-fusionierten Genprodukte stets höher waren, als bei den ursprünglichen Konstrukten. Die Menge an intrazellulärem Gag war in Zellen, die mit den GA-Fusionskonstrukten pc-GAsyngag und pc-GATDsyngag transfiziert worden waren, um durchschnittlich 14-30 % erhöht, verglichen mit den Ausgangskonstrukten pc-syngag und pc-TDsyngag.

3.2.4.2 Synthese und Export Gag-spezifischer RNA

Um zu bestimmen, ob die festgestellten Unterscheide in der Protein Expression auf der Ebene des RNA-Exports reguliert werden, wurde des Weiteren das Verhältnis der nukleären und cytoplasmatischen Gag-spezifischen RNA Transkripte nach Transfektion der humanen Zelllinie (293T) mit den jeweiligen Gag Expressionskonstrukten im Northern Blot und Light Cycler Analysen untersucht (Abb. 3-2-4 A und B).

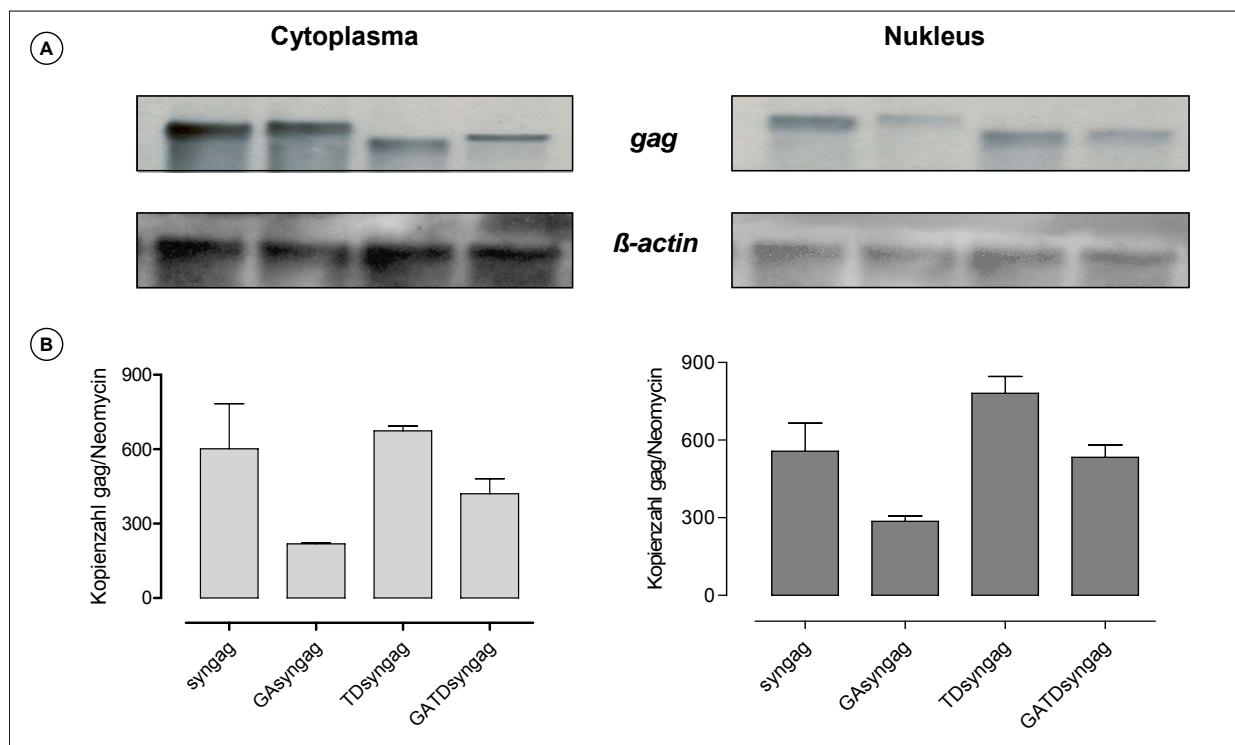


Abbildung 3.2-4: Untersuchungen zum Einfluss von GA auf die RNA-Stabilität und die RNA-Menge. Light Cycler und Northern Blot Analysen Gag-spezifischer RNA-Transkripte im Nukleus bzw. exportierter RNA im Cytoplasma von mit pc-syngag, pc-GAsyngag, pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag transfizierten 293T Zellen. (A) Je 10 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die verschiedenen RNA-Spezies mit einer DIG-markierten DNA Sonde detektiert. (B) Gag-Transkripte wurden mit Neomycin Transkripten normalisiert, welche als interne Kontrolle ebenfalls quantifiziert wurden. Die Kalkulation der Kopienzahl wurde anhand eines externen Standards berechnet.

Dabei konnte zunächst beobachtet werden, dass alle Gag-spezifischen RNA-Spezies vorhanden waren und die RNA-Mengen in Kern und Cytoplasma kaum Unterschiede aufwiesen. Dahingegen konnten deutlich mehr Gag-spezifische RNAs ohne GA-Domäne nachgewiesen werden als entsprechende Spezies mit GA-Domäne. Nach Transfektion von pc-syngag konnte im Cytoplasma um den Faktor 3 und im Nukleus um den Faktor 1,9 mehr spezifische RNA detektiert werden, als nach Transfektion des analogen Expressionskonstruks mit GA (pc-GAsyngag). Für die transdominanten Gag-Varianten pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag konnte entsprechendes gezeigt werden. Im Cytoplasma konnten 1,6 und im Zellkern 1,5 mal mehr Gag-spezifische RNA detektiert werden, wenn die Zellen mit dem transdominanten Gag-Konstrukt ohne GA-Domäne transfiziert wurden.

3.2.4.3 Bestimmung der Halbwertszeit *in vivo* exprimierter Gag und GAGag Proteine

Zur genauen Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) bzw. der Degradation der Antigene *in vivo*, wurden humane 293T Zellen mit den Expressionsvektoren pc-syngag, pc-GAsyngag, pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag transfiziert. Anschließend wurde die Abnahme der intrazellulären Gag-Menge in Gegenwart des Translationsinhibitors Cycloheximid über 2 Stunden hinweg verfolgt, indem zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe (30 h nach Transfektion) des Inhibitors die Zelllysate gewonnen und analysiert wurden (Abb. 3-2-5 A). Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an Gag-Polyprotein über den Versuchszeitraum von zwei Stunden in Zellen, die mit pc-syngag transfiziert worden waren, deutlich abnahm. Im Gegensatz dazu konnte nach Transfektion mit pc-GAsyngag gezeigt werden, dass die Menge an Gag-Protein über diesen Zeitraum konstant bleibt. Die transdominant negativen Konstrukte pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag wiesen die gleichen Eigenschaften bezüglich ihrer Stabilität auf. Durch gegen β -Actin gefärbte Immunoblots konnte gezeigt werden, dass Cycloheximid keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat. Durch dieses Experiment wurde deutlich, dass das HI-virale Strukturprotein Gag durch Fusion eines GA-Bereichs stabilisiert werden kann.

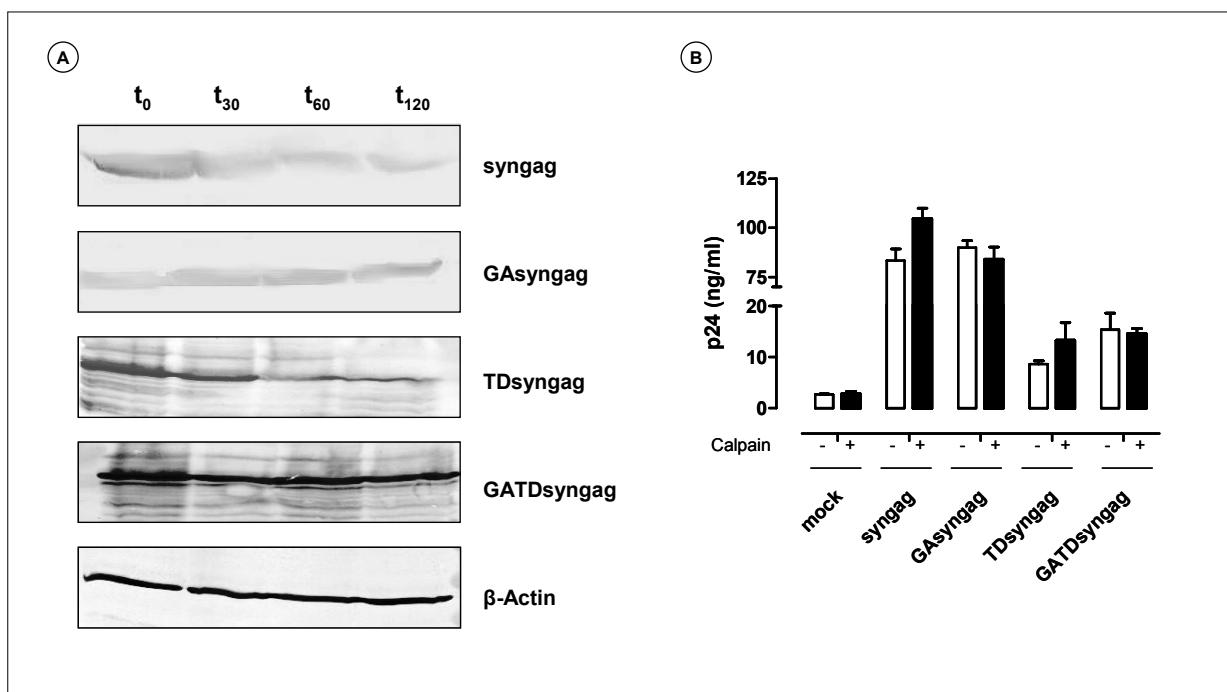


Abbildung 3.2-5: Einfluss von GA auf die Proteininstabilität und den Abbau durch das Proteasom. Bestimmung der Stabilität des Gag-Proteins und dessen Degradation durch das Proteasom nach Transfektion von 293T Zellen mit den Expressionskonstrukten pcDNA3.1, pc-syngag, pc-GAsyngag, pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag. (A) 30 h nach Transfektion wurde durch Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid (10 μ g/ml) die Proteinneusynthese gehemmt und die Degradation der Proteine über einen Zeitraum von 2 h beobachtet. Die Stabilität von β -Actin wurde im Verlauf ebenfalls analysiert, ein repräsentativer Blot ist abgebildet. (B) 36 h nach Transfektion wurde der Proteasomenhemmer Calpain (2 ng/ml) zugegeben, und weitere 12 h später wurden die Proteinmengen mittels ELISA bestimmt. Die Verwendung von Calpain (+) bzw. das Fehlen von Calpain (-) ist angezeigt. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

Des Weiteren wurden 293T Zellen mit den gleichen Konstrukten transfiziert und 36 h nach Transfektion wurde der Proteasomenhemmer Calpain ins Medium gegeben. Die Zellen wurden schließlich 48 h *post transfectionem* geerntet und der p24 Gehalt der Zelllysate wurde durch quantitativen ELISA bestimmt (Abb.3-2-5 B). Die Menge an p24 in den Zelllysaten der Zellen, die mit pc-GAsyngag und pc-GATDsyngag transfiziert wurden, erhöhte sich auch nach Behandlung mit Calpain nicht. Im Fall von GAGag betrug die Menge an p24 in Abwesenheit von Calpain 89 ng/ml und mit Calpain 83 ng/ml. Analoges gilt für GATDgag; hier lagen die Mengen ohne Calpain bei 15 ng/ml und mit dem Proteasomenhemmer bei 14 ng/ml.

Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die mit pc-syngag und pc-TDsyngag transfiziert wurden, *per se* geringere Proteinexpression. Die Inkubation der transfizierten Zellen mit dem Proteasomenhemmer Calpain führt zu signifikant erhöhten p24 Mengen. Für Gag betragen die detektierten Mengen 83 ng/ml ohne Calpain und 104 ng/ml mit Calpain. Auch für TDgag konnte gezeigt werden, dass die Menge an detektiertem Protein zunimmt (8 ng/ml zu 13 ng/ml). Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass der Glycin-Alanin-Bereich die Proteine Gag und TDgag stabilisiert, indem die Degradation durch das Proteasom verhindert bzw. verringert wird.

3.2.5 Untersuchungen der immunogenen Eigenschaften der GA-Fusionskonstrukte

In den folgenden immunologischen Studien sollte der Einfluss des GA-Bereichs auf die Induktion einer Gag-spezifischen humoralen und vor allem zellulären Immunantwort untersucht werden. Um die Immunantworten zu vergleichen, wurden weibliche Balb/c Mäuse i.m. mit jeweils 60 µg Plasmid-DNA immunisiert. Für den Versuch wurden den Mäusen folgende Plasmide injiziert: pc-syngag, pc-GAsyngag, pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag, sowie pcDNA3.1 als Negativkontrolle. Die Mäuse wurden in Woche 1 grundimmunisiert und in Woche 4 und 7 jeweils *geboostet*.

3.2.5.1 Induktion einer Gag-spezifischen humoralen Immunantwort

Die humorale Immunantwort nach DNA-Immunisierung wurde bestimmt, indem die Seren der individuellen Mäuse mittels Antikörper-ELISA auf die Bildung Gag-spezifischer Antikörper untersucht wurden. Jede Maus wurde vor Beginn der Studie auf das Vorhandensein etwaiger bestehender humoraler Antworten getestet. Die Vakzinierung mit pc-syngag und pc-GAsyngag resultierte in fast identisch hohen Gag-spezifischen Antikörpertiter, im Mittel aus den fünf Mäusen war der Titer 100.000 (Abb. 3.2-6).

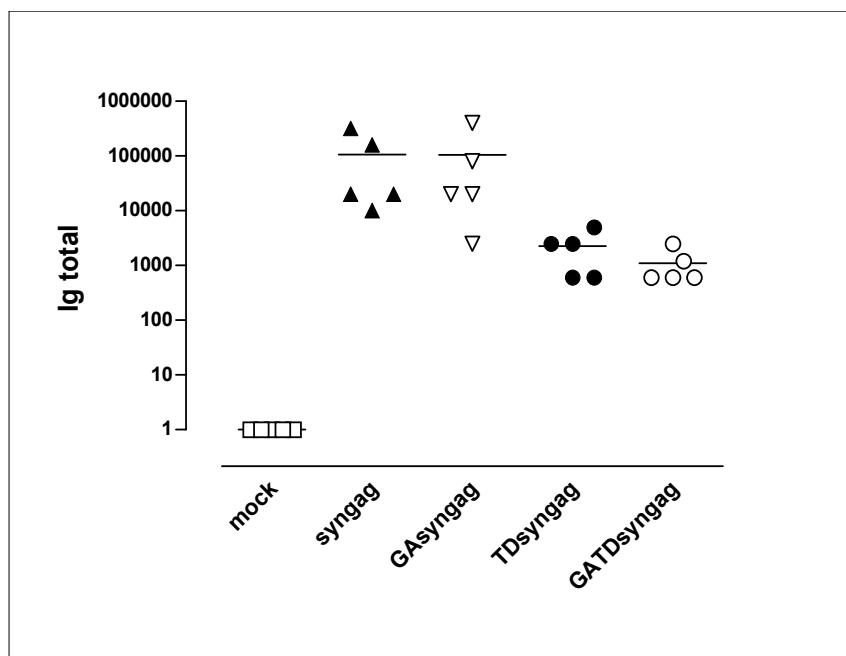


Abbildung 3.2-6: Humorale Immunantwort nach i.m. DNA-Immunisierung verschiedener Gag-Konstrukte. Balb/c Mäuse wurden 3 x im Abstand von je drei Wochen mit je 60 µg der angegebenen Plasmid-DNA (pcDNA3.1, pc-syngag, pc-GAsyngag, pc-TDsyngag, pc-GATDsyngag) immunisiert. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden die Gag-spezifischen Ig-Titer der immunisierten Versuchstiere im ELISA ermittelt. Die Titer korrespondieren mit dem reziproken Wert der höchsten Serumverdünnung, deren O.D. Wert 3 x höher war als der Wert der entsprechenden Verdünnung einer nicht-immunisierten Kontrolle.

Im Gegensatz dazu waren die spezifischen Titer, die nach Injektion von pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag induziert wurden um den Faktor 50 (TDsyngag) bis 100 (GATDsyngag) reduziert verglichen mit den beiden Gag-codierenden Konstrukten. Die Titer pc-GATDsyngag immunisierter Mäuse (1100) waren um die Hälfte geringer als die pc-TDsyngag vakzinierter Mäuse (2200).

3.2.5.2 Induktion einer Gag-spezifischen zellulären Immunantwort

Zur Bestimmung der zellulären Immunantwort der Mäuse nach intramuskulärer DNA-Immunisierung wurden den Tieren eine Woche nach der letzten Immunisierung die Milzen entfernt und daraus die Splenozyten präpariert. Das aus p24 (CA) stammende 9-mer Peptid A9I (AMQMLKETI), das als murines H-2^d-restringiertes p24 CTL Epitop bekannt ist (Selby, 1997; Nakamura, 1997), wurde für die Stimulation und das Auslesen verwendet. Das 10-mer Peptid R10I (RGPGRAFVTI), ein bekanntes H-2^d-restringiertes V3/IIIB-spezifisches CTL Epitop (Takahashi, 1988; Hanke, 1998), wurde als Kontrollpeptid verwendet. Die Induktion einer starken zellulären Immunantwort wurde im Detail über die Messung der INF γ -Induktion mit verschiedenen Testmethoden bestimmt.

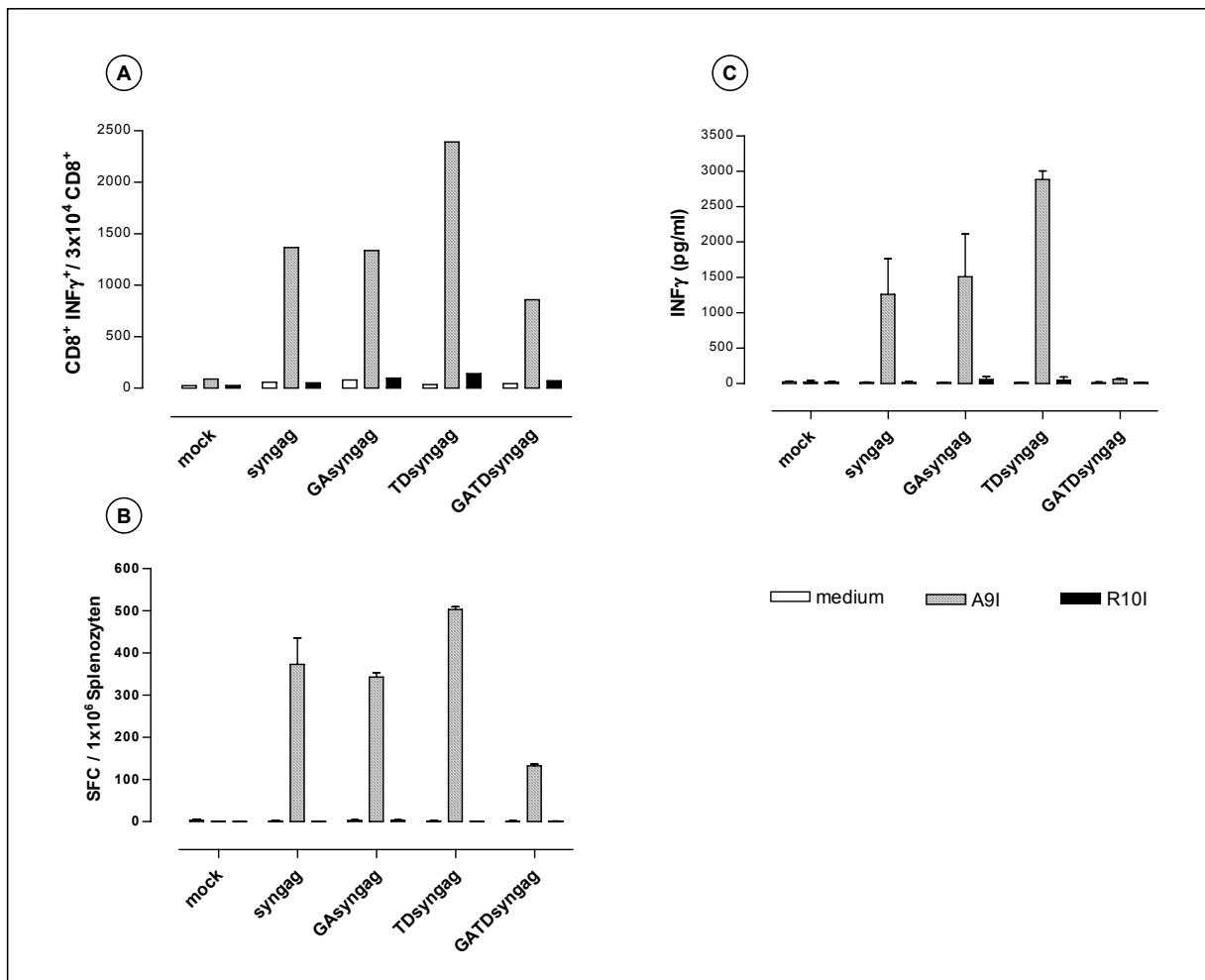


Abbildung 3.2-7: Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten nach i.m. DNA Immunisierung. Balb/c Mäuse wurden 3x im Abstand von drei Wochen mit 60 µg pc-DNA3.1, pc-syngag, pc-GASyngag, pc-TDsyngag und pc-GATDsyngag immunisiert. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden die Splenozyten aus den Milzen isoliert und (A) die Anzahl von IFN γ produzierenden CD8 $^{+}$ Splenozyten mittel intrazellulärer Färbung ermittelt, (B) die Anzahl IFN γ sezernierender Splenozyten nach *in vitro* Restimulation (24 h) mit 10 µg Peptid (ELISPOT-Assay) bestimmt, sowie (C) die Freisetzung von IFN γ innerhalb von 48 h in den Überstand mit 10 µg spezifischem Peptid *in vitro* restimulierter Splenozyten im ELISA gemessen. A9I = spezifisches Gag Peptid; R10I = unrelevantes V3/IIIB-Peptid, Medium = mit Medium stimulierte Splenozyten; mock = mit pcDNA3.1 immunisierte Mäuse

Die Gag-spezifische zelluläre Immunantwort *in vivo* wurde durch intrazelluläres IFN γ -staining (Abb. 3.2-7 A), ELISPOT assay (Abb. 3.2-7 B) und einen IFN γ -spezifischen ELISA (Abb. 3.2-7 C) gemessen. Wie in Abbildung 3.2-7 zu sehen, war die CD8 $^{+}$ T-Zell assoziierte Produktion von IFN γ für pc-syngag und pc-GASyngag vergleichbar hoch. Ein Abfall der IFN γ -Produktion konnte in pc-GATDsyngag immunisierten Mäusen festgestellt werden, wohingegen für pc-TDsyngag ohne den GA-Bereich die zelluläre Immunantwort am stärksten war. Diese Daten zeigen, dass der Glycin-Alanin-Bereich in Kombination mit dem Volllänge-Gag die Induktion von CTL nicht verhindert, sehr wohl aber in Verbindung mit dem transdominanten Konstrukt (pc-GATDsyngag) eine deutliche Reduktion der IFN γ -Produktion bewirkt.

3.2.5.3 Bestimmung der spezifischen Lyse Gag- und GAGag-exprimierender Zellen

Ossevoort *et al.* demonstrierten, dass der komplette GA-Bereich (239 Aminosäuren) aus EBNA-1, fusioniert mit dem β -Galactosidase-Gen, die Induktion einer spezifischen CTL Antwort nicht verhindert. Dieser Effekt wird auf *crosspriming* zurückgeführt, d.h. das von den produzierenden Zellen freigesetzte Protein wird von anderen Zellen aufgenommen und dort prozessiert und präsentiert. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass durch die Fusion mit dem GA die Erkennung der β -Galactosidase exprimierenden Zellen durch spezifische CTL verhindert wird (Ossevoort, 2003). Gag und die davon abgeleiteten Proteine mit und ohne GA werden von den Zellen in den Überstand sezerniert; diese Tatsache stützt die Meinung und die Möglichkeit, dass die Aktivierung der CTL indirekt über einen Weg, der nicht von der GA-Aktivität behindert wird, erfolgt.

Im Folgenden sollte getestet werden, ob Zielzellen, die GAGag exprimieren, von Gag-spezifischen CTL erkannt und lysiert werden. Hierfür wurden Balb/c Mäuse zweimal im Abstand von drei Wochen mit pc-syngag i.m. immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen entnommen und daraus die Splenozyten präpariert; diese wurden im nachfolgenden Zytotoxizitäts-Test als Effektorzellen eingesetzt. Als Zielzellen wurden retroviral transduzierte P815 (Balb/c Mastozytomzelllinie) verwendet. Die generierten P815 Zellen enthalten alle GFP als Reportergen und zusätzlich entweder syngag, GAsyngag, TDsyngag oder GATDsyngag. Als Positivkontrolle wurden in dem Assay P815-Zellen eingesetzt, die mit dem Gag-spezifischen H-2^d Peptid (A9I) gepulst waren. Die Splenozyten der immunisierten und nicht immunisierten Mäuse wurden nach der Präparation zur *in vitro* Restimulation für 5 Tage mit bestrahlten, das entsprechende Transgen exprimierende P815 inkubiert. Anschließend wurden die restimulierten Effektoren zusammen mit den Zielzellen in einen Zytotoxizitäts-Test eingesetzt; durch die LDH Freisetzung wird die spezifische Lyse bestimmt.

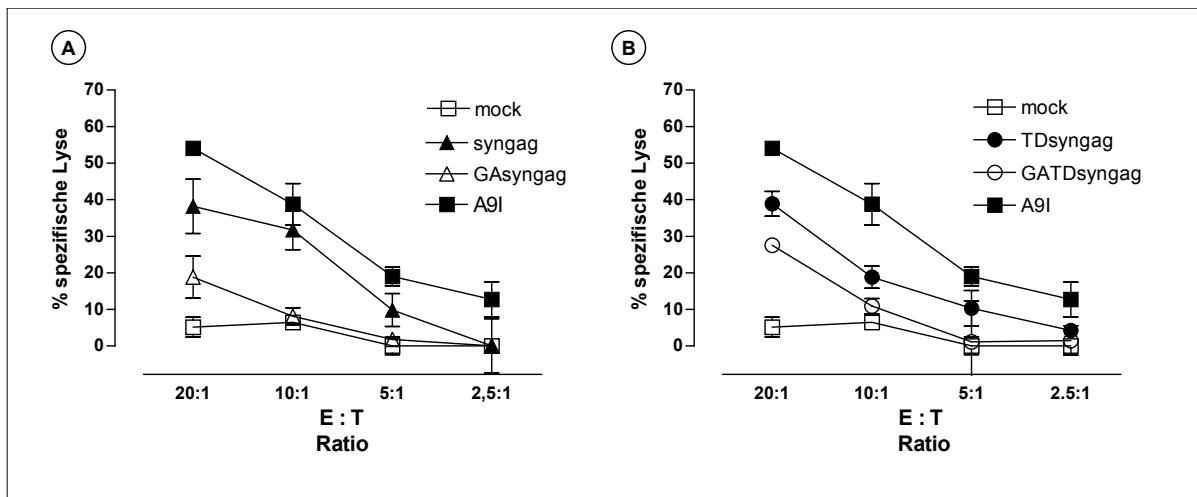


Abbildung 3.2-8: Bestimmung der spezifischen Lyse Gag-exprimierender P815-Zellen durch CD8⁺-Zellen. Weibliche Balb/c Mäuse wurden 2 x im Abstand von drei Wochen mit 60 µg pc-syngag Plasmid-DNA i.m. (*tibialis anterior*) immunisiert. Die Splenozyten der immunisierten Mäuse wurden im Zytotoxizitäts-Test als Effektorzellen eingesetzt. Die mit Peptid (A91) gepulsten P815-Zellen bzw. die stabil (A) Gag, GAGag, (B) TDGag oder GATDGag-exprimierenden P815-Zellen wurden als Zielzellen in den Test eingesetzt. Die Gag-spezifische CD8⁺-induzierte Zelllyse wurde über die LDH-Freisetzung bestimmt. (mock = nicht-immunisierte Balb/c-Mäuse desselben Alters)

Die spezifische Lyse von GAGag exprimierenden P815 Zellen konnte zu 50 % reduziert werden im Vergleich zu P815 die Gag exprimieren (Abb. 3.2-8 A). Die spezifische Lyse war um ca. 25 % verringert, wenn die Zellen GATDGag im Vergleich zu TDGag exprimierten (Abb. 3.2-8 B).

Sowohl Gag als auch GAGag sind im Stande eine starke Immunantwort zu induzieren, jedoch ist die Erkennung der Zellen durch Gag-spezifische CTL signifikant reduziert, wenn das Protein N-terminal durch einen Bereich aus Glycin und Alanin geschützt ist. Die Erkennung und die spezifische Lyse von Zellen die Gag oder TDGag exprimieren ist vergleichbar, aber GA reduziert diese spezifische Lyse um 25-50%. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die induzierte Immunantwort auf Grund von cross-Präsentation zustande kommt, aber die Zellen mit GA fusionierten Proteinen vor CTL induzierter Lyse geschützt sind.

3.2.5.4 Bestimmung der *in vivo* Zytotoxizität von GAGag-exprimierender Zellen

Zur Bestimmung der *in vivo* Zytotoxizität der Gag- und GAGag-exprimierenden P815 Zellen wurden diese i.v. in mit pc-syngag immunisierte Mäuse injiziert und ihr Verbleib in den Mäusen untersucht. Hierfür wurden weibliche Balb/c Mäuse zweimal im Abstand von drei Wochen i.m. mit pc-syngag immunisiert. Die P815 Zelllinien *syngag*, *GAsyngag*, *TDsyngag*, *GATDsyngag* und GFP wurden mit Mitomycin C behandelt, um weitere Zellteilungen zu verhindern. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff CMTMR „Cell Tracker Orange“ in unterschiedlichen Konzentrationen gefärbt, um die Populationen unterscheiden zu können. Die Kontrollzellen, die nur GFP exprimieren, wurden mit einer niedrigen (0,5 µM)

Konzentration CMTMR gefärbt, und die P815 Zellen, die Gag oder TDGag exprimieren, wurden mit einer hohen (10 μ M) Konzentration CMTMR gefärbt. Nachdem die Zellen intensiv gewaschen worden waren, wurden Kontrollzellen (P815-GFP) und Zielzellen (z.B. P815-syngag) jeweils im Verhältnis 1:1 gemischt und den Mäusen intravenös injiziert. Nach 5 h wurde den Mäusen ca. 200-300 μ l Blut entnommen und mittels FACS-Analysen die CMTMR-gefärbten Zellen detektiert (Abb. 3.2-9).

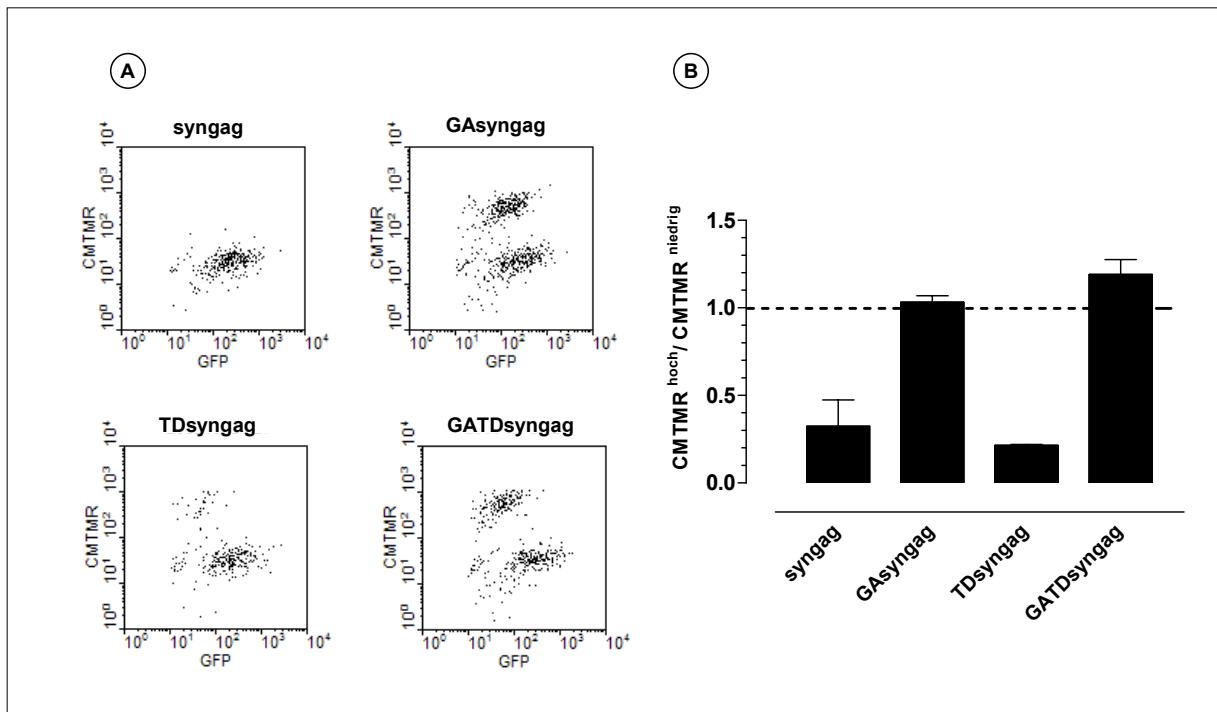


Abbildung 3.2-9: Bestimmung der *in vivo* Zytotoxizität Gag-exprimierender P815-Zellen in mit pc-syngag DNA-immunisierten Balb/c Mäusen. Die Versuchstiere wurden 2x mit 60 μ g Plasmid DNA i.m. (*tibialis anterior*) immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden den Mäusen intravenös je 1×10^7 P815 Zellen, die nur GFP exprimieren und mit 0,5 μ M CMTMR inkubiert worden waren (CMTMR^{niedrig}) und je 1×10^7 P815 Zellen, die eine Variante von Gag exprimieren und mit 10 μ M CMTMR inkubiert worden waren (CMTMR^{hoch}), injiziert. Die Zellen wurden vor der Injektion mit Mitomycin C behandelt, um weitere Zellteilungen zu unterbinden. 5h nach Injektion wurde den Mäusen Schwanzblut entnommen und dieses mittels FACS-Analyse auf die fluoreszenzmarkierten Zellen untersucht. (A) Repräsentative Abbildungen der FACS-Analysen für jede Gruppe. (B) Die durchschnittliche Ratio hoch markierter zu niedrig markierter Zellen in den Mäusen (CMTMR^{hoch}/CMTMR^{niedrig}). Ein Wert von 1 bedeutet, dass weder Kontrollzellen noch Zielzellen lysiert wurden, ein Wert <1 die spezifische Lyse der Gag-exprimierenden Zellen. Das Experiment wurde mit drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

Nach 20 h sollten die P815-Zellen im Blut der Mäuse ein zweites mal untersucht werden, dazu wurde erneut Blut genommen; es konnten jedoch weder Zielzellen noch Kontrollzellen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die relativ großen P815 Zellen im Gewebe (z.B. in den Lymphknoten) stecken bleiben oder sich dort akkumulieren. In den *in vivo* CTL assays konnte gezeigt werden, dass starke Antigen-spezifische lytische Aktivität gegen Gag- oder TDGag-exprimierende Zellen bestehen. In den Mäusen, die eine 1:1 Mischung von Kontrollzellen und Gag-P815 bzw. TDGag-P815 erhielten, konnten nach 5 h nur noch die Kontrollzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass gegen die GAGag- bzw. GATDgag-exprimierenden P815 keine lytische Aktivität besteht, nach 5 h konnten die gleichen Mengen an Kontrollzellen wie auch Zielzellen nachgewiesen werden. Durch die Angabe der *killing*-Ratio GFP-P815 / Gag-P815 kann gezeigt werden, wie stark die Erkennung der Zellen ist; 1 bedeutet, die Zellen werden nicht

lysiert, < 1 bedeutet die Zielzellen werden lysiert und > 1 heißt die Kontrollzellen werden lysiert. Die durchschnittliche *killing*-Ratio Gag-P815/GFP-P815 bzw. TDGag-P815/GFP-P815 beträgt zwischen 0,3 und 0,2, wohingegen für die beiden mit GA geschützten Zelllinien GAGag-P815 und GATDGag-P815 die durchschnittliche Ratio 1 beträgt, was bedeutet, dass die Zielzellen nicht erkannt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Zellen, deren Antigene mit einem 24 aa langem Glycin-Alanin-Bereich fusioniert sind, vor CTL Lyse geschützt sind.

3.2.6 Zusammenfassung

Ein allgemeines Problem in Gentherapiestategien ist die Immunreaktion des Wirts gegen den eingebrachten Vektor oder das kodierte Transgen. Durch die Fusion eines 24 Aminosäuren langen Glycin-Alanin-Bereiches, der vom EBNA-1 Protein abgeleitet ist, an den N-Terminus des Transgens, kann dessen Degradation durch das Proteasom verringert oder verhindert werden und somit auch die Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen. Die GATDGag-Mutanten interferieren genauso effizient mit der Replikation von Wildtypviren wie TDGag, d.h. die zusätzlichen 24 Aminosäuren haben auf die transdominante Wirkung des Proteins keinen negativen Einfluss. Es konnte im Gegenteil gezeigt werden, dass die GA-Fusionskonstrukte die HIV-Replikation sogar noch stärker inhibieren.

Durch qualitative und quantitative Untersuchungen wurde festgestellt, dass sich die Größe der Proteine durch Fusion mit GA minimal erhöht, aber auch die Menge an exprimiertem Protein zunimmt. Dieser Effekt beruht nicht etwa auf einer erhöhten RNA-Stabilität bzw. RNA-Mengen, sondern, wie auch bei EBNA-1, auf der verminderten Degradation des Proteins durch das Proteasom.

DNA-Immunisierungen zeigten, dass sehr wohl Antikörper und spezifische CTL gegen die GA-Proteine (GAGag und GATDGag) induziert werden, dieses Ergebniss ist aber auf Cross-Präsentation zurückzuführen. Die Erkennung Gag-exprimierender Zellen durch CD8⁺ T-Zellen kann drastisch reduziert bzw. sogar gänzlich verhindert werden, wenn die Zellen das Transgen mit GA exprimieren.

Die Verwendung des GA-Bereichs in Gentherapieansätzen ist demnach eine effektive Strategie, um die Stabilität eines Proteins zu erhöhen und die Erkennung transgener Zellen durch das Immunsystem zu verhindern, ohne dabei die Funktion des Transgens zu beeinflussen.

3.3. Inhibition der HIV-1-Replikation durch Gag basierte Minigene mit minimaler potentieller Immunogenität

3.3.1 Minigene als Inhibitoren der HIV-Replikation

Wie bereits in Kapitel 3.1 gezeigt werden konnte, inhibieren induzierbare transdominante Gag-Varianten die Replikation von HIV-1 *in vitro*. Durch diverse Modifikationen, z.B. die Einführung weiterer Deletionen oder die Fusion von 24aa Glycin-Alanin, konnte die Immunogenität der Transgene erheblich reduziert werden. Zur weiteren Optimierung von Hemmwirkung und Immunogenität sollten im Folgenden transdominante, von HIV-1 Gag abgeleitete Oligopeptide (Minigags) generiert werden. Hierfür wurden die minimalen Bereiche, die noch zur Interaktion mit dem Volllänge-Gag fähig sind (Zabransky, 2002), verwendet. Ferner sollten Kombinationen der Oligopeptide (*L2*, *NCp1* und *LNCp1*) mit dem immunsuppressiven GA-Linker generiert werden. Um die Sicherheit der Transgene weiter zu erhöhen, wurde der HIV-LTR als Promotor benutzt, um die Konstrukte Tat-induzierbar exprimieren zu können. Die so generierten Konstrukte sollten zunächst in transienten Inhibitionsversuchen auf ihre Hemmwirkung untersucht und die stärksten Inhibitoren identifiziert werden. Die transdominante Wirkung sollte im Weiteren durch Infektionsversuche mit HI-Virus in transduzierten Zelllinien verglichen werden. Zur immunologischen Charakterisierung dieser potentiellen Transgen-Kandidaten sollten im Folgenden die zellulären Parameter nach i.m. Immunisierung mit Plasmid-DNA im C57BL/6-Mausmodell detailliert untersucht werden.

3.3.2 Herstellung der Minigen-Plasmid Konstrukte

Für die Minigag-Konstrukte wurden zwei Bereiche im Gag-Leserahmen gewählt, die noch zur Interaktion mit dem Volllänge-Gag fähig sind (Zabransky, 2002). Das erste Gen *L2* (138 bp, 46 aa) besteht aus dem C-terminalen Teil von p24^{CA} und dem N-terminalen Teil des p7^{NC} (Abb. 3.3-1). Das *NCp1*-Gen (180 bp, 60 aa) umfasst den C-terminalen Teil des p7^{NC} und das p1-Protein. Des Weiteren wurde eine dritte Variante *LNCp1* (246 bp, 82 aa), durch Fusion der beiden Gene generiert. Die kodierenden Sequenzen der transdominanten Minigag-Gene *L2*, *NCp1* und *LNCp1* wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden L2-f (5'-C AGACTGAATTCGAAGACTGAGGTATGGAGGCCATGAGCCAGGTG-3'), L2-r (5'-CTACG CGGGCCGCTTAACGTCTACCATGCCCTTCTCCTGGGGCGCG-3'), NCp1-f (5'-GGC TGAATTCGAAGACTGAGGTATGGTGAAGTGCTTCAACTGCGGC-3') und NCp1-r (5'-GCT GAAGCGGCCGCTTAACGTCTACCATGAAGTTGCCGGCCTGCCCTT-3') amplifiziert. Zur Herstellung der Minigag-Gene diente *syngag*, ein kodonoptimiertes HIV-1 *gag* Gen (Graf, 2000), als *template*. Die erhaltenen Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*

und *NotI* verdaut und in das *EcoRI* und *NotI* linearisierte pcDNA3.1 Plasmid kloniert. Die so neu entstandenen Plasmide wurden im Folgenden als pc-*L2*, pc-*NCp1* und pc-*LNCp1* bezeichnet (Abb.3.3-1).

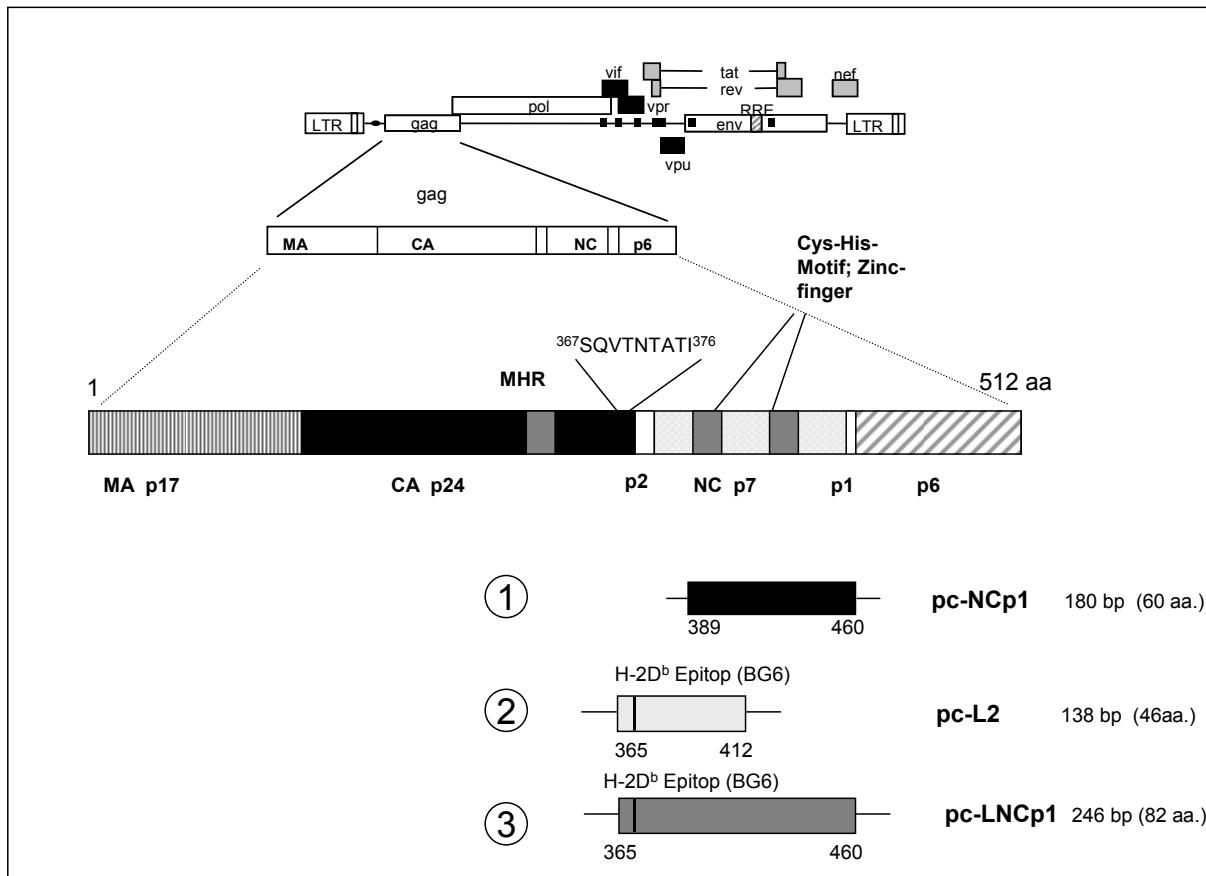


Abbildung 3.3-1: Schematische Darstellung der transdominannten Minigaggene. (1) pc-NCp1, (2) pc-L2 und (3) pc-LNCp1. Die Kodon optimierten Gensequenzen der definierten minimalen Regionen, die zur Interaktion mit Gag fähig sind, wurden mittels PCR hergestellt. In den oben abgebildeten Konstrukten (2&3) befindet sich das murine, H-2D^b restringierte p24 CTL Epitop B6G (aa 367-376; SQVTNTATTI).

Die Herstellung des GA-Expressionsplasmids pc-GA (Abb. 3.3-2 (1)) wurde unter Kapitel 3.1.1 im Detail beschrieben. Um den 24-mer GA-Bereich 5' an die Gene *L2*, *NCp1* und *LNCp1* zu fusionieren, wurde das Plasmid pc-GA mit den Restriktionsenzymen *BbsI* und *NotI* verdaut; hierbei wurde gleichzeitig das Stopkodon eliminiert. Die *BbsI/NotI* verdauten Fragmente *L2*, *NCp1* und *LNCp1* wurden anschließend über Ligation in das linearisierte pc-GA Plasmid eingeführt. Die generierten Konstrukte (Abb 3.3-2 (5-7)) wurden pc-GAL2, pc-GANCP1 und pc-GALNCp1 genannt.

Um den GA-Bereich 3' an die Fragmente zu fusionieren, wurden die Plasmide pc-*L2*, pc-*NCp1* und pc-*LNCp1* mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BsmBI* verdaut; hierbei ist wiederum das Stopkodon deletiert worden. Das Plasmid pc-GA wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *BsmBI* linearisiert und die Minigag-Fragmente in den Vektor ligiert. Die entstandenen (Abb. 3.3-2 (2-4)) Konstrukte wurden pc-*L2GA*, pc-*NCp1GA* und pc-*LNCp1GA* genannt. Zusätzlich wurden weitere Kombinationen der TD Minigags mit dem GA-Bereich

hergestellt, die nach dem gleichen Schema kloniert wurden. Alle so hergestellten Konstrukte wurden in das pcDNA3.1 Expressionsplasmid, das entweder den CMV Promotor/Enhancer (Abb. 3.3-2 (8-12)) oder den HIV-1 LTR (Abb. 3.3.-4) enthielt, kloniert.

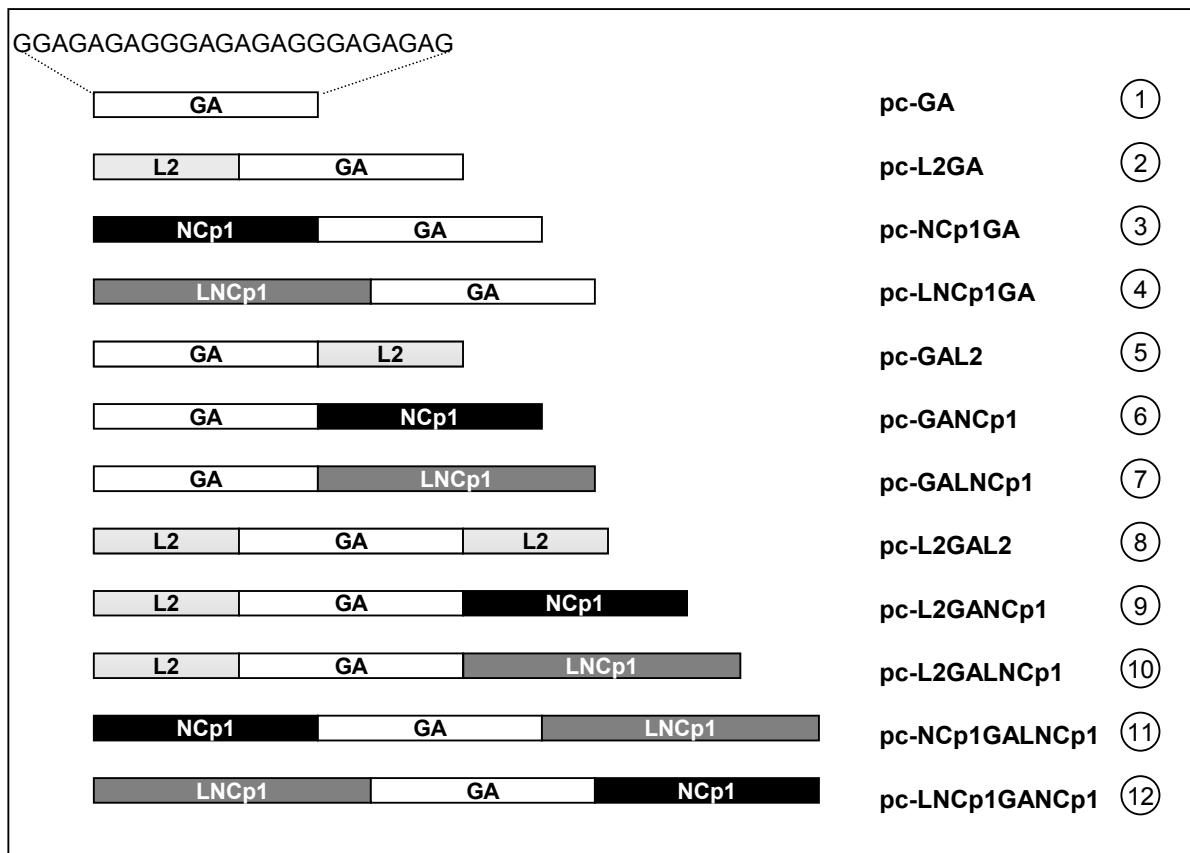


Abbildung 3.3-2: Schematische Darstellung der Minigag-Kombinationsvektoren. Das GA-Gen kodiert für 24 Aminosäuren ausschließlich Glycin und Alanin (1). Das GA-Gen wurde entweder am C-Terminus (2-4) bzw. am N-Terminus (5-7) an die Minigag-Gene fusioniert. Zusätzlich wurden Konstrukte hergestellt, die aus zwei transdominannten Genen und dem GA-Gen als Linker bestehen (8-12).

Für die Transduktion von Zelllinien wurden zusätzlich einige Konstrukte in den retroviralen Transfervektor M387 kloniert. Hierfür wurden die Gene *L2GAL2* und *L2GALNCp1* über PCR mit den Oligonukleotiden L2-5' (AATAGCGGCCGCATGGAGGCCATGAGCCAG) und L2-3'(TTTAGAATTCTAGCCCTTCCCTGGGGC) oder NCp1-3'(TTAGAATTCTAGAAGTTGCCGGCCTGCC) amplifiziert und die Schnittstellen *NotI* (5') und *EcoRI* (3') eingeführt. Die Tat-induzierbaren Konstrukte wurden invers in den retroviralen Vektor M387 kloniert, um etwaige Interferenzen mit dem MPSV-LTR Promotor zu verhindern. Hierfür wurden die Gene *L2GAL2* und *L2GALNCp1* mit dem LTR Promotor mittels PCR amplifiziert, dabei wurden die Oligonukleotide LTR-EcoRI (ACGTCGTCTCAAATTCTGGAGGGCTAATTCACTCC) und POLYA-NotI (CTACGCGTCTAGGCCGCCATAGAGCCCACCGCATTCC) verwendet. Die mit *EcoRI* und *NotI* verdaulichen PCR Produkte wurden über die Schnittstellen *EcoRI* und *NotI* in den retroviralen Vektor M387 eingeführt.

3.3.3 Hemmwirkung der Minigene auf Virusfreisetzung und Infektiosität der Nachkommenviren

Um zunächst die inhibitorischen Eigenschaften der TDMinigag-Gene zu testen, wurden transiente Transfektionsstudien durchgeführt. Hierfür wurden humane H1299 Lungenkarzinomzellen mit den Minigag-Plasmiden und einem proviralen HIV-1 Klon (pHX10) cotransfiziert. Um die Hemmung durch die Minigag-Gene zu bestimmen, wurden die Partikel Freisetzung und die Infektiosität der freigesetzten Virionen überprüft. Der p24 Gehalt im Zellkulturüberstand wurde bestimmt und MAGI-Zellen mit dem Überstand aus der Transfektion infiziert (Abb.3.3-3).

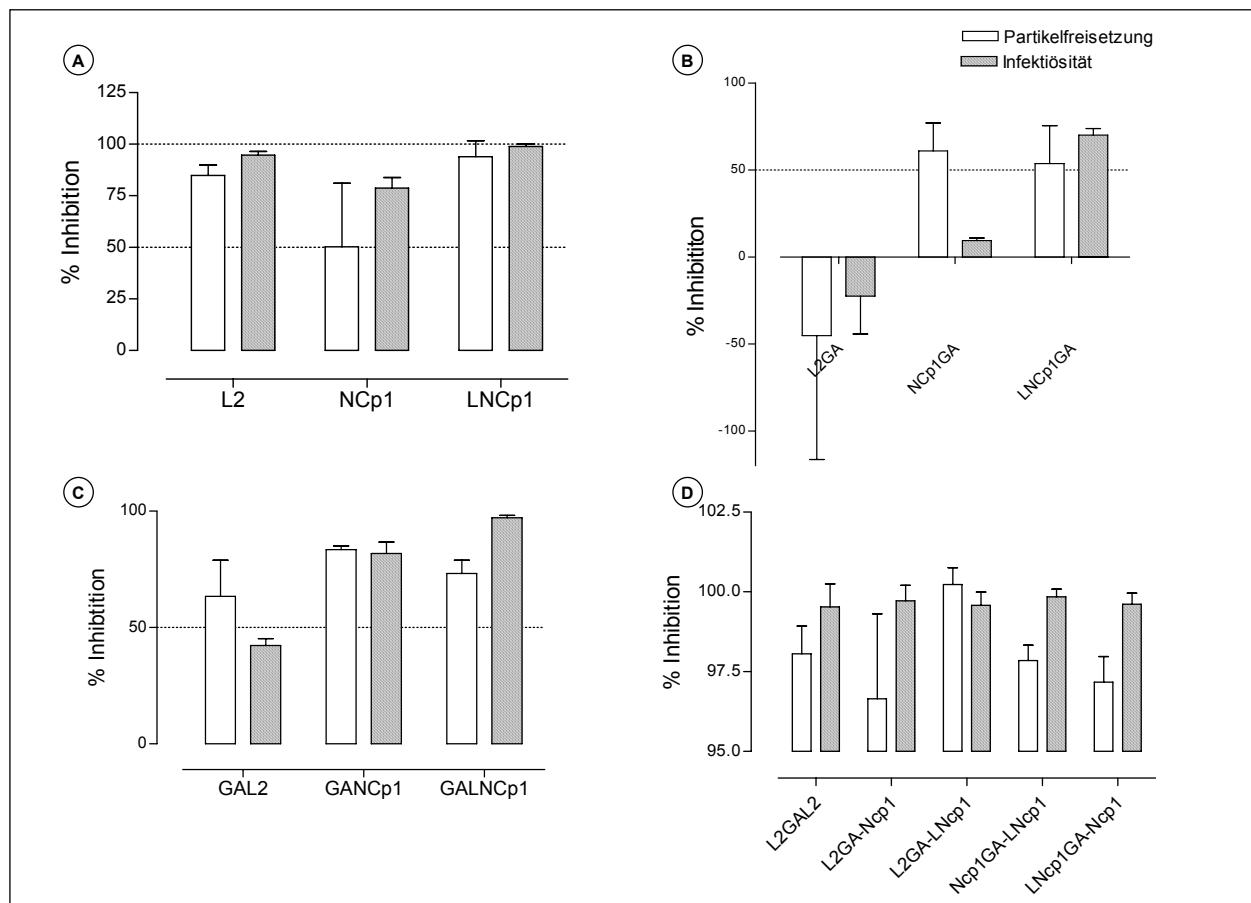


Abbildung 3.3-3: Hemmung der HIV-1 Freisetzung aus transfizierten Zellen durch Cotransfektion mit transdominanen Minigag-Konstrukten. H1299 Zellen wurden mit proviraler HIV-1 Plasmid-DNA (pHX10) und den angegebenen Minigag-Konstrukten oder pcDNA3.1 als Negativkontrolle cotransfiziert und für 48h kultiviert. Mittels ELISA wurde der p24 Gehalt im Überstand bestimmt; bezogen auf die Infektionskontrolle (pHX10 + pcDNA3.1) wurden die % Hemmung berechnet. Die Hemmung der Infektiosität der Nachkommenviren wurde bestimmt, indem MAGI -Zellen mit den Überständen infiziert wurden; und wiederum anhand der Infektionskontrolle (pHX10 + pcDNA3.1) wurde die Hemmung der Infektiosität berechnet. Hemmung durch die Minigag-Konstrukte (A), durch Minigag-Konstrukte mit GA (B) & (C) und durch die Kombinationen aus zwei TD-Genen und GA (D).

Es konnte gezeigt werden, dass die individuellen Minigag-Konstrukte pc-*L2*, pc-*NCp1* und pc-*LNCp1* (Abb. 3.3-3 A) die Partikelfreisetzung um 50 % bis 93 % inhibieren, wobei die stärkste Hemmung für pc-*LNCp1* zu beobachten war (*L2*: 84% \pm 5,15; *NCp1*: 50% \pm 30,78; *LNCp1*: 93% \pm 7,71). Ferner wurde durch alle drei Konstrukte die Infektiosität der Virionen um 78 % bis 98 % reduziert (*L2*: 94% \pm 1,74; *NCp1*: 78% \pm 5,13; *LNCp1*: 98% \pm 1,28). So konnte gezeigt werden, dass durch die Minigag-Konstrukte größten Teils die Freisetzung der

Virionen gehemmt wird. Zudem erwiesen sich die Partikel, die dennoch aus den Zellen knospen, als überwiegend nicht mehr infektiös.

3.3.3.1 Inhibitorische Eigenschaften der Minigene, der Minigen-Kombinationen und der Einfluss von GA

Durch das Anfügen des GA-Bereichs sollte die Stabilität der Minigag-Proteine erhöht und die Immunogenität bzw. die Erkennung der exprimierenden Zellen verringert werden. Zur Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften wurden jeweils zwei Minigag-Gene kombiniert. Die Wirkung der GA-Fusion, am N-Terminus oder C-Terminus auf die inhibitorischen Eigenschaften wurden wiederum in transienten Inhibitionsstudien untersucht (siehe Abb. 3.3-3 B, C). Ebenso wurde die Konstrukte, die aus zwei Minigag-Genen und dem GA-Bereich bestehen bezüglich ihrer Hemmwirkung auf die HIV-Freisetzung untersucht (Abb. 3.3-3 D)

Alle getesteten Minigag-Gene zeigten eine signifikante Inhibition von Partikelfreisetzung und Infektiösität. Eine Ausnahme bildete die Variante pc-L2GA (Abb. 3.3-3 B), die Partikelfreisetzung wurde um 45 % und die Infektiösität der Nachkommen Viren um 22 % erhöht, im Vergleich zur nicht gehemmten Kontrolle. Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Fusion des GA-Bereichs an die Gene mit reduzierter Hemmung verbunden war (Abb. 3.3-3 B), wohingegen die N-terminale Fusion die antivirale Wirkung verstärkte (Abb. 3.3-3 C). Die Kombinationen aus zwei Minigenen und dem GA-Bereich als Linker (Abb. 3.3-3 D), erreichten unabhängig von den verwendeten Modulen sehr hohe Inhibitionswerte. Fast vollständige Hemmung konnte für die Konstrukte pc-L2GAL2, pc-L2GANCp1, pc-L2GALNCp1, pc-NCp1GALNCp1 und pc-LNCp1GANCp1 gezeigt werden; die Inhibition aller Kombinationskonstrukte betrug im Mittel 98 %.

3.3.3.2 Hemmung der HIV-Freisetzung durch Tat-induzierbare Minigenkombinationen

Zur weiteren Verbesserung der Kombinations-Minigene bzgl. ihrer potentiellen Immunogenität, wurden die Gene unter die transkriptionelle Kontrolle des HIV-1 LTR-Promoters gestellt (Abb. 3.3-4). Dadurch sollten die Transkription und somit auch die Expression erst stattfinden, wenn die Zelle mit HIV-1 infiziert ist. Mit dieser Strategie werden zwei neue Aspekte eingeführt: ersten sollte somit verhindert werden, dass CTL gegen das Transgen induziert werden und zweitens kann der eingebrachte LTR als *decoy* für Tat fungieren.

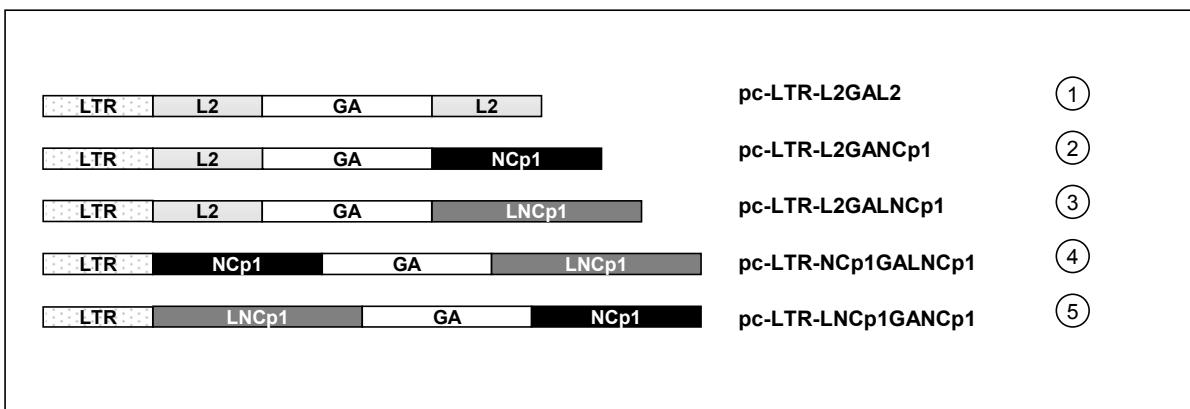


Abbildung 3.3-4: Schematische Darstellung der Tat-abhängigen Minigag-Kombinationsvektoren. Durch den Austausch des konstitutiven CMV-Promotors gegen den HIV-1 LTR-Promotor wurde die Transkription der Konstrukte Tat-induzierbar gemacht.

Analog zu den vorangegangenen Versuchen, wurden H1299 Zellen mit den Tat-induzierbaren, transdominanten Konstrukten oder pcDNA3.1 und einem proviralen HIV Klon (pHXB10) transfiziert, um den inhibitorischen Effekt zu bestätigen. Alle getesteten Tat-induzierbaren Konstrukte zeigten eine Hemmung der Partikelfreisetzung und Infektiösität der Nachkommenviren von mehr als 95 % (Abb. 3.3-5 A).

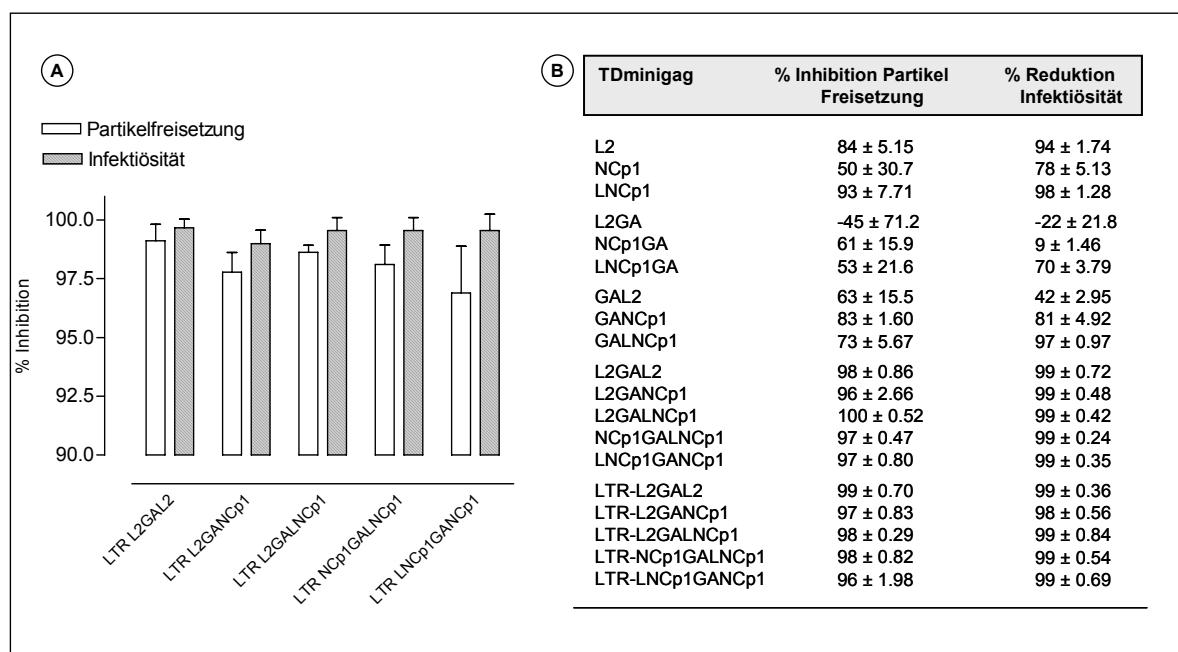


Abbildung 3.3-5: Hemmung in HIV-1 transinfizierten Zellen durch Cotransfektion von Tat-induzierbaren transdominanten Minigag-Konstrukten. (A) H1299 Zellen wurden mit proviraler HIV-1 Plasmid-DNA (pHXB10) und den angegebenen Minigag-Konstrukten oder pcDNA3.1 cotransfiziert und für 48h kultiviert. Mittels ELISA wurde der p24 Gehalt im Überstand bestimmt, bezogen auf die Infektionskontrolle (pHXB10 + pcDNA3.1) wurden die % Hemmung berechnet. Die Hemmung der Infektiösität der Nachkommenviren wurde durch Infektion von MAGI-Zellen mit Zellkulturüberstand bestimmt, anhand der Infektionskontrolle (pHXB10 + pcDNA3.1) wurde die Hemmung der Infektiösität berechnet. (B) Auflistung der gemittelten Inhibitionswerte der Minigag Konstrukte. Angegeben sind die Mittelwerte aus mind. 4 transienten Inhibitionstudien und die Standardabweichung.

Die Tabelle 1 (Abb. 3.3-5 B) gibt einen Überblick über die getesteten Minigag-Konstrukte und ihre Hemmwerte im Vergleich. Die Untersuchungen zur Immunogenität und den inhibitorischen Eigenschaften der Konstrukte wurden nur noch mit den besten Konstrukten aus den vorangegangenen Tests durchgeführt.

3.3.4 Untersuchungen zu den immunogenen Eigenschaften der Minigag-Fusionskonstrukte

In den folgenden immunologischen Studien sollten die induzierten zellulären Immunantworten der verschiedenen Minigag-Konstrukte im Vergleich zu pc-syngag untersucht werden. Um zu vergleichen, wie stark die Immunantworten sind, die die Minigag-Konstrukte induzieren, wurden weibliche C57BL/6 Mäuse i.m. mit 60 µg Plasmid-DNA immunisiert. Für den Versuch wurden den Mäusen folgende Plasmide injiziert: pc-syngag, pc-LNCp1, pc-L2GAL2, pc-L2GANCp1 und pc-L2GALNCp1, sowie pcDNA3.1 als Negativkontrolle. Die Mäuse wurden in Woche 1 grundimmunisiert und in Woche 4 und 7 jeweils geboostet.

Da das HI-Virus in Mauszellen nicht replizieren kann und auch die Tat-abhängige Initiation der Transkription in Nagetieren nicht funktionell ist, können die Tat-induzierbaren Konstrukte nicht in Mausstudien untersucht werden.

3.3.4.1 Bestimmung der spezifischen zellulären Immunantworten

Zur Bestimmung der zellulären Immunantworten nach intramuskulärer DNA Immunisierung wurden den Tieren eine Woche nach der letzten Immunisierung die Milzen entnommen und daraus die Splenozyten präpariert. Das aus p24^{CA} stammende 9-mer Peptid BG6 (SQVTNTATI), das als murines H-2D^b-restringiertes p24 CTL Epitop bekannt (Paliard, 1998) und im L2-Gen (5-13 aa) vorhanden ist, wurde für die Stimulation und das Auslesen verwendet. Das 10-mer Peptid R10I (RGPGRAFVTI), ein bekanntes H-2^d-restringiertes V3/IIIB-spezifisches CTL Epitop (Takahashi, 1988; Hanke, 1998), wurde als Kontrollpeptid verwendet. Die Induktion einer starken zellulären Immunantwort wurde im Detail über die Messung der INF γ -Induktion mit verschiedenen Testmethoden charakterisiert, zum einen durch intrazelluläres IFN γ -staining und zum anderen im ELISPOT-assay gemessen (Abb. 3.3-6).

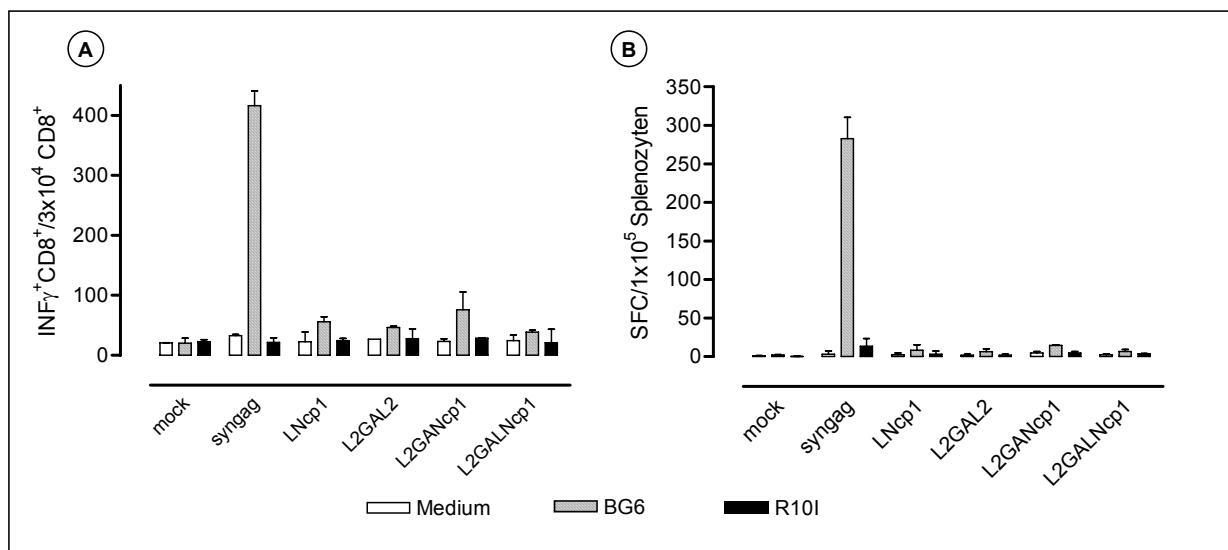


Abbildung 3.3-6: Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantwort nach i.m. DNA Immunisierung. Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden 3x im Abstand von drei Wochen mit jeweils 60 μ g an Plasmid DNA pc-DNA3.1, pc-syngag, pc-LNcp1, pc-L2GAL2, pc-L2GANCp1 oder pc-L2GALNcp1 immunisiert. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden die Splenozyten aus den Milzen isoliert und (A) die Anzahl von INF γ produzierenden CD8+ Splenozyten mittel intrazellulärer Färbung ermittelt sowie (B) die Anzahl INF γ sezernierender Splenozyten nach *in vitro* Restimulation (24h) mit 10 μ g Peptid (ELISPOT-Assay) bestimmt, (BG6= spezifisches Gag Peptid; R10I= unrelevantes V3/IIB-Peptid, Medium= mit Medium stimulierte Splenozyten; mock= mit pcDNA3.1 immunisierte Mäuse)

Mit beiden Testmethoden konnte gezeigt werden, dass die CD8 $^{+}$ assoziierte Produktion von IFN γ nach Immunisierung mit pc-syngag am stärksten ist. Im Vergleich dazu konnte ein deutlicher Abfall (9 - 47-fach) der IFN γ -Produktion in mit Minigag-Plasmiden immunisierten Mäusen festgestellt werden. Die Plasmide pc-L2GAL2 und pc-L2GALNcp1 induzierten IFN γ -Werte, die kaum oder gar nicht über denen der unspezifischen Kontrolle lagen. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Minigag-Konstrukte an sich keine starke zelluläre Immunantwort induzieren, wobei die Konstrukte L2GAL2 und L2GALNcp1 die schwächsten Antworten auslösen.

3.3.5 Inhibitorische Eigenschaften der Minigag-Konstrukte

3.3.5.1 Inhibitionsstudien in transduzierten PM1 Zellen

Um das inhibitorische Potential der TDMinigag Gene in einer Gentherapie-Situation zu untersuchen, wurden humane PM1 Zellen mit dem retroviralen Transfervektor M387 transduziert. Der Vektor enthielt entweder L2GAL2, L2GALNcp1, LTR-L2GAL2 oder LTR-L2GALNcp1, wobei die LTR-Konstrukte in reverser Orientierung kloniert wurden, um mögliche transkriptionelle Interferenzen zu vermeiden. Der entry-Inhibitor C46 wurde als Positivkontrolle (Egelhofer, 2004), M387 ohne Insert als Negativkontrolle, verwendet. Die Zellen wurden nach Transduktion durch FACS-Sorting auf GFP-positive Zellen angereichert; die so angereicherten Kulturen waren zu über 90 % GFP positiv. Die transduzierten PM1 wurden mit HIV_{NL4-3} mit einer MOI von 0,1 infiziert. Proben der Zellkulturüberstände wurden alle 2-3 Tage genommen und mittels ELISA auf ihren p24 Gehalt hin untersucht (Abb. 3.3-7).

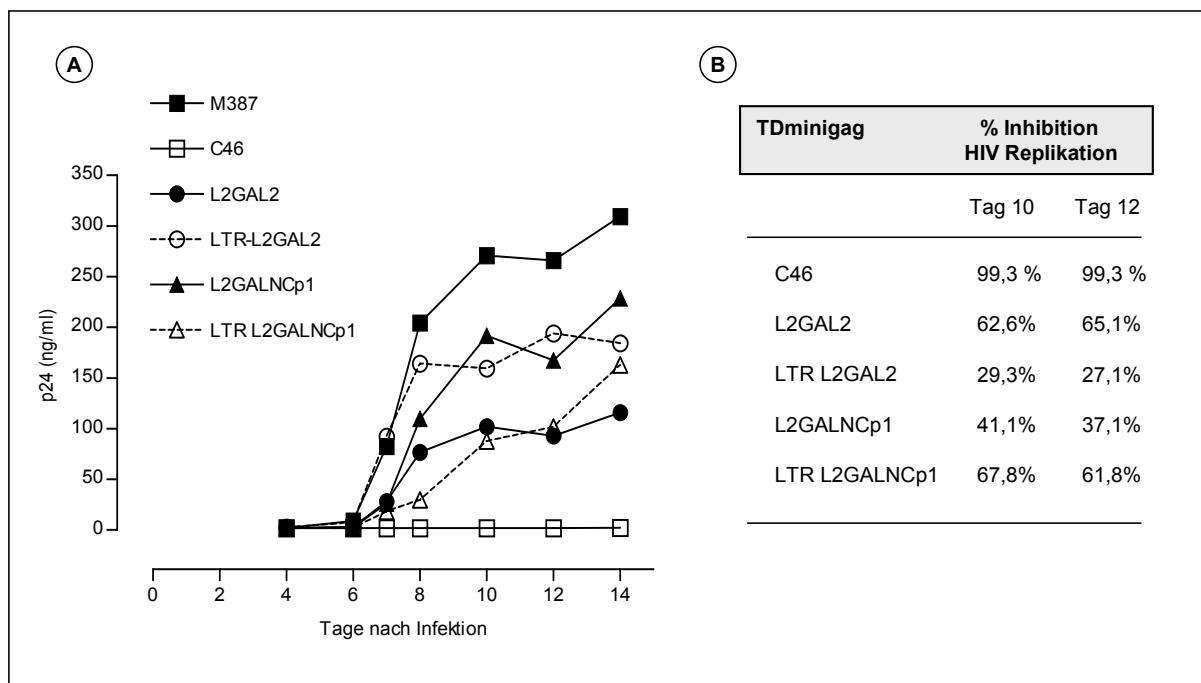


Abbildung 3.3-7: (A) **Antivirale Aktivität der Minigag-Konstrukte.** Die Minigag exprimierenden Zelllinien L2GAL2, LTR-L2GAL2, L2GALNCp1 und LTR-L2GALNCp1 (PM1) wurden mit dem HIV-1 Laborstamm NL4-3 mit einer MOI von 0,1 infiziert. Alle 2-3 Tage wurden Proben vom Überstand genommen, um mittels ELISA den p24 Gehalt zu bestimmen. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. (B) Tabellarische Übersicht der Inhibition der HIV-1 Replikation an Tag 10 und Tag 12 in Prozent, gemessen an den mit M387 transduzierten Kontrollzellen.

Unter diesen Bedingungen wurde die HIV-1 Replikation in *L2GALNCp1*-PM1 nur sehr schwach (~28 %) gehemmt. Auch konnte für die PM1-LTR-L2GAL2 Zellen nur geringe antivirale Aktivität gezeigt werden: die Inhibition der HIV Replikation betrug 40 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu war die Replikation von HIV_{NL4-3} zwischen 62 %-67 % gehemmt, wenn die Zellen konstitutiv L2GAL2 oder Tat-induzierbar LTR-L2GALNCp1 exprimierten. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass L2GAL2 konstitutiv bzw. LTR-L2GALNCp1 Tat-abhängig exprimiert starke Inhibitoren der späten Phase der HIV- Replikation sind.

3.3.6 Zusammenfassung

Transdominant negative Gag-Mutanten sind starke Inhibitoren des HIV *assembly* und der Partikelfreisetzung. Aufgrund der hohen Immunogenität von Gag ist es nötig, transdominante Varianten mit geringer Immunogenität und dennoch starker Hemmwirkung zu entwickeln, um zu verhindern, dass die transduzierten Zellen nach Reinfusion *in vivo* durch spezifische CD8⁺ Zellen lysiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die minimalen Domänen, die noch zu einer Interaktion mit Gag befähigt sind, gute antivirale Eigenschaften besitzen. Um diese Hemmwirkung zu erhöhen, wurden die Minigag-Gene kombiniert und zusätzlich mit einem immunsuppressiven Linker versehen. Die so entstandenen Konstrukte zeigten eine starke antivirale Wirkung, waren dabei aber um ein Vielfaches geringer immunogen als Gag. Zusätzlich wurden Tat-induzierbare Konstrukte generiert, um die Sicherheit und die Effizienz noch weiter zu erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass die Replikation von HIV-1 in Zellen, die die transdominanten Minigags stabil exprimieren, signifikant reduziert wird. Des Weiteren wurde durch diese Minigags eine drastisch reduzierte CTL Antwort im Vergleich zu dem Volllänge-Gag induziert. Die Ergebnisse dieser Studie bestärken das Rational transdominanter Gag-Derivate als potentielle Gentherapie-Kandidaten bei einer Infektion mit HIV.

4. Diskussion

4.1. HIV Gentherapie

Durch die Einführung von HAART Mitte der Neunziger konnte die Überlebenszeit von HIV-Infizierten deutlich erhöht werden. Eine völlige Eradikation der Viren ist jedoch aufgrund der fehlenden Potenz der Medikamente nicht möglich. Die Viren verstecken sich in der latenten Phase über lange Zeiträume in Zellen und können nicht eliminiert werden.

Der Immundefekt bei einer HIV-Infektion ist auf die sinkende Zahl und Spezifität an T-Helferzellen zurückzuführen. Diese CD4⁺T-Zellen gezielt durch Transplantation von Zellen zu ersetzen, kann die Immunfunktionen wieder normalisieren. Das Überleben dieser CD4⁺T-Zellen kann durch gleichzeitigen Schutz vor der Infektion und Replikation von HIV durch anti-HIV Gene gesichert werden. Patienten, die nicht optimal auf HAART ansprechen, könnten durch derartige gentherapeutische Ansätze behandelt werden. Eine Reihe theoretischer Überlegungen führten zur Ansicht, dass Erfolg versprechender ist, die Provirusintegration oder die Virusreifung zu verhindern, als die Produktion viraler Proteine in infizierten Zellen zu inhibieren. Eine Kombination antiviraler Gene, die gleichzeitig den Viruseintritt und die Virusfreisetzung hemmen, scheint die wirkungsvollste Strategie zu sein. Transgene, die in der späten Phase der HIV-Replikation wirksam sind, sogenannte Klasse III Gene (Abb 1-7), bringen der T-Zelle keinen selektiven Vorteil im Gegensatz zu Genen, die den Viruseintritt verhindern (Klasse I). Eine Kombination aus einem Klasse I und einem Klasse III Gen bietet Schutz vor der Entstehung resistenter Viren. Mathematische Berechnungen und Wahrscheinlichkeiten haben gezeigt, dass diese Kombination die beste und sicherste ist (von Laer, 2006). Nur ein kleiner Teil aller T-Zellen eines Patienten kann *ex vivo* manipuliert werden und deswegen hängt der therapeutische Erfolg von der Akkumulation und Überlebensdauer der genmodifizierten Zellen durch *in vivo* Selektion nach Infusion in den Patienten ab.

Entscheidend für die Beurteilung klinischer Studien ist zum einen die Kapazität der genmodifizierten Zellen zur Regeneration und zum anderen, inwieweit nachgelagert die Virusreplikation im Patienten beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Zwillingstudie unterstützen die Hypothese, dass anti-HIV-Gene den CD4⁺T-Zellen einen Überlebensvorteil und HIV⁺-Patienten einen potentiellen Nutzen bieten können (Morgan, 2005). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die CD4⁺T-Zellen *ex vivo* zu transduzieren und um das 10 bis 1000-fache zu expandieren. Die transduzierten Zellen, die ein oder zwei anti-HIV Transgene (RevM10, anti-TAR) trugen, hatten einen Überlebensvorteil gegenüber Kontrollzellen, die mit dem Leervektor behandelt worden waren. Zudem konnte in einem Patienten, der aus gesundheitlichen Gründen

HAART unterbrechen musste, beobachtet werden, dass die Viruslast durch die gentherapeutische Behandlung um die Hälfte reduziert wurde. Diese Studie hat gezeigt, dass eine Gentherapie von HIV potentiell möglich und durchführbar ist. Sie zeigte aber auch, dass weitere Entwicklungen und Verbesserungen bezüglich der Vektoren, der Applikation und im Besonderen der anti-HIV Transgene nötig sind. In der vorliegenden Arbeit sollte ein transdominant negativ wirkendes Gag-Derivat entwickelt und evaluiert werden, dass einerseits eine starke antivirale Aktivität, aber andererseits nur geringe potentielle Immunogenität aufweist.

4.2. Hemmung der HIV-1-Replikation durch induzierbare transdominante Gag-Mutanten

Für fast alle Schritte der HIV-Replikation sind inhibitorische Gene beschrieben. Einige Gene, wie transdominantes Tat und Rev oder die vom RRE oder TAR abgeleiteten kompetitiven RNA-Elemente, hemmen die Expression von viralen Strukturproteinen auf der Ebene der Transkription oder des RNA-Exports. Andere Genprodukte, wie transdominantes Gag, hemmen die Bildung von infektiösen Viruspartikeln aus vorhanden Proteinbausteinen. Am hoffnungsvollsten scheint eine Kombination antiviraler Gene, wenn gleichzeitig der Viruseintritt und die Virusfreisetzung gehemmt werden. Die genmodifizierten Zellen, die HIV-abgeleitete Proteine exprimieren, müssen jedoch vor der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem geschützt sein.

In diesem Teil der Arbeit wurden verschiedene Systeme untersucht, um mit deren Hilfe die Expression antiviraler Transgene durch regulatorische HIV-Proteine induzierbar zu machen. Indem die Expression erst nach Infektion der Zelle stattfindet, sollte die Immunogenität reduziert werden. Die Verwendung kodonoptimierter Gensequenzen schließt zudem Rekombinationen mit den Wildtyp-Viren aus. Es ist seit langem bekannt, dass transdominante Gag-Mutanten mit der Replikation von HIV interferieren, indem sie den Zusammenbau der Viren und deren Freisetzung verhindern (Trono, 1989; Sakai, 1995). Die Reduktion der Virusvermehrung kann durch die Inhibition der Virusfreisetzung auf sehr spezifische Weise erfolgen. Deletionen im Gag vermittelt einen transdominant negativen Effekt auf die Neubildung und Freisetzung von Nachkommenviren (von Poblotzki, 1993; Furuta, 1997; Shimano, 1998). Diese Deletionen liegen im p17^{MA}, im Übergangsbereich p17^{MA}/p24^{CA} und in der C-terminalen Domäne des p24^{CA}. Der genaue Wirkmechanismus des transdominant negativen Effektes ist nicht aufgeklärt. Einige Anhaltspunkte deuten jedoch auf einen Einfluss der reduzierten Cyclophilin A Bindekapazität des mutierten p24^{CA} (Chiu, 2002) und auf ein verändertes Membran-targeting von der Plasmamembran zur ER-Membran bei Deletionen im p17^{MA} (Facke, 1993; Ono, 2004) hin. Da Gag ein sehr stark

multimerisierendes Polyprotein ist und eine exakte Zusammenlagerung für die korrekte Ausbildung von HIV-Partikeln notwendig ist (Wilk, 2001), liegt es nahe, dass transdominante Gag-Derivate mit funktioneller *assembly*-Domäne (C-terminale Domäne des p24^{CA}) durch eine Bindung an Wildtyp-Gag-Proteine den Zusammenbau von HIV Capsiden direkt beeinträchtigt und so nachweislich zu einer Hemmung der HIV-Replikation führen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Tat-, Rev- oder Tat/Rev-abhängige transdominante negative Gag-Mutanten hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit und inhibitorischen Eigenschaften *in vitro* untersucht. Ein induzierbares System könnte die Sicherheit, die man für eine Langzeit-Behandlung der HIV-Infektion durch Gentherapie benötigt, gewährleisten. Um das Überleben der transduzierten Zellen *in vivo* zu sichern, muss garantiert sein, dass sie nicht von spezifischen CD8⁺T-Zellen erkannt und lysiert werden. Im Fall von transdominanten Gag-Mutanten kann dies erreicht werden, indem deren Expression der Transgene erst durch regulatorische HIV-Proteine und somit erst im Fall einer Infektion mit HIV-Viren induziert wird. Zusätzlich muss der Entstehung replikationskompetenter Viren durch Rekombinationen zwischen HIV und den eingesetzten Transgenen oder Retroviren vorgebeugt werden. Das zu verhindern gelingt durch Veränderung der kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen, so dass Homologien zwischen dem Transgen und dem Wildtyp-Virus ausgeschlossen sind. Ausgehend von einem synthetischen, transdominanten Gag-Konstrukt (*TDsyngag*), dessen Kodonwahl eine starke und Rev-unabhängige Proteinexpression gewährleistet (Graf, 2000), wurden die induzierbaren Gene generiert. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, wie die Rev-unabhängige Expression von HIV-1 Gag-Pol erreicht werden kann (Zolotukhin, 1994; Srinivasakumar, 1999; Schneider, 1997; Rizvi, 1996; Gasmi, 1999; Kotsopoulou, 2000). Diese Erkenntnisse wurden genutzt, um transdominante Konstrukte zu generieren, deren Expression genau umgekehrt wieder Rev-, Tat-, oder Rev/Tat-abhängig ist (siehe Abb. 3.1-1; Abb. 3.1-2). Ausgehend von einem unabhängig exprimierten *gag*-Konstrukt, wurde durch die Verwendung verschiedener Promotoren und verändertem Kodongebrauch eine partielle Abhängigkeit von HIV erreicht. Die Gefahr der Rekombination mit Wildtyp-Virus wird reduziert, wenn synthetische Gensequenzen verwendet werden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit auch kodonoptimierte, konsitutiv exprimierte Konstrukte untersucht. Einige Studien haben sich mit HIV-induzierbaren Systemen für die Hemmung der HIV-Replikation beschäftigt. Beispielsweise wurden konditionell replikationsdefiziente Viren eingesetzt, die erst in Anwesenheit eines Wildtyp-Helferviruses replizieren können und durch ihre Interferenz die Vermehrung des Wildtyp-Viruses inhibieren (Dropulic, 1996). Des Weiteren konnte die Effektivität eines durch HIV-1 Tat aktivierbaren System *in vitro* demonstriert werden, bei dem die Transkription einer gegen HIV-1 Rev gerichteten shRNA (*short hairpin*) aktiviert wurde (Unwalla, 2004). Transdominant negative Effekte gegen HIV-1 wurden bereits auf diverse Prozesse im viralen Lebenszyklus gerichtet, zum Beispiel eine Interferenz mit

dem Wirtszell CCR5 (Chemokinrezeptor 5), der einen wichtigen Korezeptor für bestimmte HIV-Subtypen darstellt. Die Erfolgserwartungen in diesen Ansatz stützen sich auf die Tatsache, dass Personen mit einer Homozygotie für die 32 bp-Deletionsmutante Δ 32-CCR5, resistent gegen makrophagotrophe Viren sind. In Studien konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch eine transominante Mutante die Membranexpression von CCR5 signifikant reduziert wird (Luis Abad, 2003; Venkatesan, 2002). Ein weiteres Beispiel für eine transdominant negative Mutante ist das HIV-1 Vpr Protein. Vpr kann die Arretierung der Zellen in der G2 Zellzyklus-Phase induzieren (Hrimech, 2002). Durch eine Mutation der 73sten Aminosäure im Vpr entstehen Viren mit einer geringeren transkriptionellen Aktivität. Diese Viren haben zudem die Fähigkeit verloren, die Zellen in der G2-Phase zu arretieren. Die Verabreichung abgeschwächter viraler Proteine zur Interferenz mit den normalen viralen Komplexen kann für neuartige Therapien enorm wichtig sein.

In dieser Arbeit wurden transdominante Gag-Mutanten, die entweder konstitutiv, Rev-, Tat- oder Rev/Tat-abhängig (siehe Abb. 3.3-1; Abb. 3.1-2) exprimiert wurden, hergestellt und untersucht. Hinsichtlich der Expression und deren Induzierbarkeit erfüllten sich die in sie gerichteten Erwartungen. Die Expression des konstitutiven Konstrukts (CMV-TDsyngag) erfolgte in hohem Maße und ohne Zugabe weiterer Faktoren (siehe Abb. 3.1-3). Die Rev-abhängige Expression des Konstrukts CMV-UTR-TDwtgag-RRE, die ohne Rev kaum nachweisbar war, wurde durch Cotransfektion von Rev um ein Vielfaches erhöht (siehe Abb. 3.1-3). Die Induktion der Konstrukte LTR-TDsyngag durch Tat war zwar deutlich, aber dennoch im Vergleich zur konstitutiven bzw. Rev-abhängigen Expression geringer (Abb. 3.1-3). Die der HIV-Wildtyp-Situation ähnliche Expressions-Strategie (LTR-UTR-TDwtgag-RRE) konnte durch Zugabe jeweils nur eines Faktors, Tat oder Rev, nicht signifikant erhöht werden (siehe Abb. 3.1-4). Die Zugabe beider benötigter Faktoren konnte die Expression jedoch erheblich steigern. Hinsichtlich der Expression und der Induzierbarkeit ist die Induktion durch Rev stärker als die durch Tat. Die Induktion des Tat /Rev-abhängigen Konstruktes (LTR-UTR-wtgag-RRE) erreichte die mit Abstand am schwächsten Expression. In den transienten Inhibitionstests zur Virusfreisetzung und Infektiosität zeigten alle TD-Konstrukte Hemmungen der Virusfreisetzung von annähernd 100 % (siehe Abb. 3.1-5 A). Dabei unterschieden sich die Konstrukte in ihrer Kapazität kaum voneinander. Eine Ausnahme bildete das Tat/Rev induzierbare Konstrukt LTR-UTR-TDwtgag-RRE, welches die Virusfreisetzung wesentlich schlechter inhibierte als die übrigen Konstrukte. Durch die Einführung einer weiteren Deletion (Δ 2) in p24^{CA}, durch die die Zahl der CTL-Epitope (Los Alamos HIV Datenbank; <http://hiv-web.lanl.gov/content/index>) verringert werden sollte, entstanden die Konstrukte CMV-TDsyngag Δ 2, LTR-TDsyngag Δ 2, CMV-UTR-TDwtgag Δ 2-RRE und LTR-UTR-TDwtgag Δ 2-RRE (siehe Abb. 3.1-1; Abb. 3.1-2). Aufgrund fehlender Antikörper zur Detektion der neu generierten Konstrukte konnte kein Nachweis der

Expression erfolgen. Die $\Delta 2$ -Konstrukte inhibierten die HIV-Freisetzung und reduzierten die Infektiosität der Nachkommenviren ebenso gut wie die größeren Vorläuferkonstrukte (siehe Abb. 3.1-5 A,B). Wiederum war die Hemmung, die durch das Tat/Rev-abhängige Konstrukt erzielte wurde, die geringste. In ersten Versuchen zur Inhibition der Konstrukte in stabilen Zelllinien wurden Jurkat-Zellen mit den $\Delta 2$ -Konstrukten transfiziert und anschließend mit HIV_{NL4-3} infiziert. Es zeigte sich, dass die Inhibition durch das konstitutive und das Rev-abhängige Konstrukt am stärksten war (siehe Abb. 3.1-6). Das Tat-abhängige Konstrukt inhibierte die HIV-Replikation wesentlich schlechter und das Tat/Rev abhängige Konstrukt zeigte keine Hemmung. Somit wurde das Tat/Rev-abhängige Konstrukt von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Die Infektionsversuche in stabil transduzierten PM1 Zellen zeigten ein ähnliches Ergebnis. Wiederum war die Inhibition der HIV-Replikation am besten durch das konstitutive bzw. Rev-abhängige Konstrukt (siehe Abb. 3.1-7). Eine Hemmung durch das Tat-abhängige Konstrukt konnte nicht nachgewiesen werden.

Obwohl die Expression eines dominant negativen Gag-Polyproteins generell mit potenter antiviraler Aktivität assoziiert ist, ist ein Rest von HIV-Replikation in den Zellen, die CMV-TD_{syngag} $\Delta 2$ oder CMV-UTR-TD_{wtgag} $\Delta 2$ -RRE beinhalten, zu beobachten. In den Kulturen, die mit den Konstrukten LTR-TD_{syngag} $\Delta 2$ oder LTR-UTR-TD_{wtgag} $\Delta 2$ -RRE transduziert worden waren, ließ sich nur eine sehr schwache Inhibition der HIV-Replikation beobachten. Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für diese Ergebnisse; eine ist, dass eine geringe Expression der Gag-Mutanten nicht ausreicht, um die HIV-1 Replikation zu blockieren. Transdominant negative Konstrukte sind am wirkungsvollsten, wenn sie überexprimiert werden. Zudem scheint auch der Zeitpunkt der Expression eine entscheidende Rolle zu spielen. Durch Transgenprodukte, die bereits zum Zeitpunkt der Infektion in der Zelle vorlagen, konnte die Virusreplikation in hohem Maße inhibiert werden. Die Rev-abhängige Expression der Transgene scheint ebenfalls ausreichend zu sein, die Replikation zu hemmen. Die Tat-abhängige Induktion, von der ein noch zusätzlicher decoy-Effekt erwartet wurde, erwies sich als nicht ausreichend, um einen transdominanten Effekt auf die HIV-Replikation auszuüben. Ein anderer Effekt könnte aber auch für das Scheitern dieser Strategie verantwortlich sein: Die Freisetzung von Nachkommenviren in transienten Tests konnte durch die Expression der Tat-abhängigen Konstrukte inhibiert werden, aber die HIV-Replikation in stabil transduzierten Zellen konnte durch das Tat-abhängige Konstrukt nicht reduziert werden. Die Ursache könnte in der Verwendung des retroviroalen Vektors liegen, denn dieser enthält ebenfalls einen LTR-Promotor retroviroalem Ursprungs. Interferenzen zwischen diesen beiden Promotoren (HIV-LTR und MPSV-LTR) könnten die Ursache für die ausbleibende antivirale Aktivität sein. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Verpackung in die retroviroalen Partikel limitierend war, da es sich bei den Tat-induzierbaren TD_{gag}-Konstrukten, um die größten hier getesteten handelt.

Die besten transdominannten Gag-Konstrukte waren *TDwtgagΔ2* und *TDsyngagΔ2*, wobei sie sich hinsichtlich ihrer inhibitorischen Kapazität kaum unterscheiden. Das Rev-abhängige Konstrukt *TDwtgagΔ2* hat den Vorteil, dass die basale Expression in transduzierten Zellen sehr gering ist und somit unter dem Schwellenwert bleibt, der nötig ist, um durch das Proteasom degradiert zu werden (Yin, 2003). Diese Eigenschaft wäre für die transduzierten Zellen *in vivo* ein Überlebensvorteil. Ein Nachteil dieser Strategie ist es allerdings, dass die Gensequenz mit der Wildtyp-Sequenz identisch ist und somit Rekombinationen nicht ausgeschlossen werden können.

Das zweite Konstrukt, dass hervorragende antivirale Eigenschaften besitzt, das *TDsyngagΔ2*-Gen weist keinerlei Homologie zur HIV-Wildtyp-Sequenz auf, demnach kann es nicht zu Rekombinationen kommen. Die konstitutive und hohe Expression eines potentiell immunogenen Proteins ist allerdings für die *in vivo* Applikation ein großes Problem.

Für die Anwendung transdominanter synthetischer Gag-Konstrukte muss deren Immunogenität reduziert werden bzw. muss verhindert werden, dass die transduzierten Zellen von CD8⁺T-Zellen erkannt und lysiert werden. Im folgenden Kapitel wird der Einfluss eines immunsuppressiven Linkers auf die Immunogenität von TDGag diskutiert.

4.3. Einfluss einer 24 Aminosäuren Glycin-Alanin Domäne auf Funktion, und Stabilität transdominanter Proteine und deren Erkennung durch spezifische CTL

Wie unter Kapitel 4.1 bereits erläutert wurde, ist es für das Überleben transduzierter Zellen *in vivo* essentiell, nicht von CD8⁺T-Zellen erkannt und lysiert zu werden. Dieses kann erreicht werden, indem die Expression der Transgene erst nach Infektion der Zelle stattfindet und somit bis dahin keine Antigenpeptidpräsentation über MHC Klasse-I erfolgt. Jedoch hat sich gezeigt, dass die HIV-Replikation am besten durch konstitutive bzw. Rev-abhängig exprimierte Konstrukte gehemmt wird. Das Rev-abhängige Konstrukt hat einen Nachteil gegenüber dem konstitutiven Gag-Konstrukt: durch das Verwenden der Wildtypsequenz kann es zu Rekombinationen mit dem Wildtypvirus kommen. Der Nachteil einer konstitutiven und hohen Expression, wie sie bei Verwendung der synthetischen Gag-Gene vorliegt, besteht in der potentiellen Immunogenität des Transgen-Produkts. Dadurch besteht die Gefahr, dass transduzierte T-Zellen in HIV⁺-Patienten schnell lysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Strategie entwickelt werden, die die Transgene bzw. die genmodifizierten Zellen vor Erkennung und Lyse durch CTL schützt.

Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, um sich vor dem Immunsystem des Wirts zu verbergen (Tortorella, 2000). Während der Virusinfektion werden die viralen Genprodukte degradiert und die so entstandenen Antigenpeptide von MHC Klasse I Molekülen präsentiert.

Auf diese Weise können CTL früh reagieren und die infizierte Zelle eliminieren. Um nicht erkannt zu werden, exprimieren Viren Proteine, welche die Präsentation von Antigenen über MHC Klasse-I Moleküle verhindern. HIV beispielsweise reguliert durch Nef und Vpu die Zahl der MHC-Moleküle herab, indem die MHC Klasse-I Moleküle der Endozytose zugeführt werden (Cohen, 1999) und Vpu die neusynthetisierten Moleküle destabilisiert (Kerkau, 1997). Einen früheren Schritt der Antigenpräsentation verhindert das *immediate early* Protein ICP47 von HSV (Herpes-Simplex Virus), indem es an TAP (Transporter der Antigenprozessierung) bindet und die Peptidtranslokation in das endoplasmatische Retikulum verhindert (Hill, 1995). Als Module zur Vermeidung der Lyse transduzierter Zellen in einem gentherapeutischen Ansatz kommen diese Strategien jedoch nicht in Frage. Zellen ohne MHC Klasse-I Moleküle auf der Oberfläche werden ebenfalls von CTL erkannt und lysiert und eine Blockade von TAP inhibiert außer der Antigenpräsentation weitere zelluläre Vorgänge, deren Auswirkungen nicht absehbar sind. Präferentiell sollten Vorgänge inhibiert werden, die nur das Antigen und dessen Prozessierung betreffen. EBV-infizierte B-Zellen exprimieren während der Latenz das Epstein-Barr nukleäre Antigen-1 (EBNA-1) und das *latent* membrane Protein-1 (LMP-1). Spezifische EBNA-1 CTL werden während der T-Zell-Entwicklung generiert, aber bei einer EBV-Infektion nicht aktiviert (Khanna, 1995). EBNA-1 ist ein Phosphoprotein, dass einen 239-Aminosäuren langen Bereich von Glycin-Alanin Wiederholungen enthält, der die Degradation verhindert (Levitskaya, 1997). Andere EBV Proteine, wie z.B. EBNA-2, -3, und -4 verfügen nicht über einen solchen Glycin-Alanin-Bereich und deren Degradationsprodukte werden über MHC Klasse-I präsentiert (Murray, 1990). Diese GA-Region wird dafür verantwortlich gemacht, dass EBNA-1 vor dem Abbau durch das Proteasom geschützt ist (Levitskaya, 1995), jenem Vorgang, bei dem falsche, kaputte oder fremde Proteine entsorgt werden und die entstandenen Peptide nachfolgend auf MHC Klasse-I Moleküle beladen werden und CTL präsentiert werden (Yewdell, 2003). Der Mechanismus, durch den GA diesen Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Weg inhibiert, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Die GA-Domäne könnte den Proteasomen-abhängigen proteolytischen Abbau einerseits aufgrund der sterischen Beschaffenheit verhindern, andererseits könnte die Kapazität des Zielproteins reduziert werden, an Komponenten des Ubiquitin-abhängigen Proteasomen-Abbau zu binden (Levitskaya, 1997). Kleine, synthetische von GA-abgeleitete Peptide verhindern nicht die Polyubiquitinierung, wohl aber die stabile Assoziation des Proteins mit dem Proteasom (Sharipo, 1998). Durch die Einführung eines starken Degradationssignals in EBNA-1 kann die Blockade des proteasomalen Abbaus umgangen werden. Das deutet darauf hin, dass der Umsatz natürlicher Substrate durch GA-ähnliche Sequenzen, die den Abbausignalen entgegenwirken fein abgestimmt wird (Dantuma, 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der durch Glycin-Alanin erzielte Schutz vor proteasomalem Abbau durch Kombination der N-end Regel

(N-terminale Aminosäure entscheidet über die Halbwertszeit des Proteins) mit kotranslationaler Ubiquitinierung aufgehoben werden kann. Das führt zu dramatisch reduzierten Halbwertszeiten von EBNA-1, durch intrazelluläre Degradation und resultiert in erhöhter Erkennung durch CD8⁺T-Zell *in vitro* und *in vivo* (Tellam, 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer 24 Aminosäuren-langen Glycin–Alanin-Domäne, auf die Funktion, Stabilität und die immunologischen Eigenschaften des synthetischen, transdominant negativen Gag untersucht werden (siehe Abb. 3.2-1). Untersuchungen haben demonstriert, dass 24 Aminosäuren Glycin–Alanin ausreichend sind, Proteine vor der Proteolyse durch das Proteasom zu schützen (Masucci, 2000). Die Größe der generierten TD-Gene sollte zudem so klein wie möglich gehalten werden, um die Verpackungskapazität des retrovirusalen Vektors nicht zu überschreiten. Zunächst sollte getestet werden, ob die sehr guten inhibitorischen Eigenschaften des transdominant negativen Gag (TDGag) auch nach der Fusion mit dem Glycin–Alanin Bereichs (GA) erhalten bleiben. Es zeigte sich, dass das modifizierte GATDGag die virale Replikation in den transduzierten Zellen stärker als TDGag inhibiert (siehe Abb. 3.2-2 B, C, D). Die Replikation des makrophagotrophen HIV_{D117II} wurde durch GATDGag sogar um 50 % stärker gehemmt, als durch das TDGag-Protein. Die inhibitorischen Eigenschaften, d.h. die Funktion des transdominanten Gags, bleiben erhalten bzw. werden sogar verbessert.

Die Funktion des GA-Bereichs ist übertragbar, eine Eigenschaft, die vielen Degradationssignalen gemein ist (Dantuma, 2000). Die meisten Peptide, die über MHC Klasse-I den T-Zellen präsentiert werden, sind ein Produkt der proteasomalen Degradation. Die 24 aa GA-Domäne, die in dieser Arbeit verwendet wurde, hat die antiviralen Eigenschaften der transdominanten Gene nicht negativ beeinflusst (siehe Abb. 3.2-2). Im Gegenteil, die inhibitorische Kapazität von GATDGag bezüglich der Hemmung verschiedener HIV Isolate war signifikant höher als die des TDGag. Expressionsversuche demonstrierten, dass die Proteinmengen von GAGag oder GATDGag höher sind als die der Gag-Proteine ohne den GA-Bereich (siehe Abb. 3.2-3). Die erhöhten Mengen an Protein, die in Zusammenhang mit GA-Fusion nachgewiesen wurden, können die Erklärung für die besseren Inhibitionsergebnisse sein. Wichtig für eine starke Inhibition der Replikation ist eine frühe und hohe Expression der transdominanten Proteine. Es gibt die Meinung, dass der Effekt von GA darauf beruht, dass die EBNA-1 Proteinmenge den für den Abbau durch das Proteasom nötigen Schwellenwert nicht überschreitet (Yin, 2003). Die Fusion von GA hatte auf die Gag-Mengen den genau gegenteiligen Effekt, demnach kann ein Schutz vor dem Abbau nicht an der Proteinquantität liegen. Die durchgeführten RNA-Analysen zeigten zudem, dass GA-Fusion in reduzierten RNA-Mengen resultiert (siehe Abb. 3.2-4). Die GA-Domäne hat demnach keine stabilisierende Wirkung auf die RNA, somit sind die erhöhten Proteinmengen kein Resultat gesteigerter RNA-Mengen bzw. RNA-Stabilität. Aufgrund

dieser Ergebnisse wurden Untersuchungen zum Einfluss von GA auf die Degradation der Proteine durchgeführt. Durch Studien in Anwesenheit von Cycloheximid, das die Proteinsynthese inhibiert, konnte gezeigt werden, dass die Proteine, die mit GA fusioniert waren im Zeitverlauf stabil waren, wohingegen die entsprechenden Proteine ohne GA abgebaut werden (siehe Abb. 3.2-5 A). GA erhöht demnach die Stabilität der Proteine. Um zu zeigen, dass diese Stabilitätssteigerung ein Resultat des fehlenden Abbaus durch das Proteasom ist, wurden Versuche mit einem Proteasomeninhibitor durchgeführt. Diese zeigten deutlich, dass die Mengen an Protein mit GA konstant bleiben, da die Degradation durch das Proteasom verhindert war (siehe Abb. 3.2-5 B). Die Mengen der Proteine ohne GA stiegen deutlich an, wenn das Proteasom gehemmt war. Das bedeutet die 24 Aminosäuren GA erhöhen die Proteinstabilität und dadurch die Proteinmengen, indem die Degradation durch das Proteasom verhindert wird.

Das EBNA-1 Protein hat die Fähigkeit, die endogene Präsentation von EBNA-1 CTL-Epitopen zu verhindern (Levitskaya, 1995; Sharipo, 1998; Blake, 1997; Levitskaya, 1997). Durch Fusion der kompletten GA-Domäne an Reportergene konnte gezeigt werden, dass dadurch nur die endogen synthetisierten Proteine vor dem Abbau geschützt werden, jedoch crosspräsentation von Antigenen nicht verhindert wird (Ossevoort, 2003). Zudem verhindert EBNA-1 die direkte Erkennung durch CD4⁺ T-Helferzellen, da der *steady state level* unter der für eine effiziente Präsentation auf MHC Klasse-II nötigen Schwellenwert liegt (Mautner, 2001). Wie Ossevoort *et al.* zeigten, verhindert der GA-Bereich von EBNA-1 die Erkennung der Zellen durch spezifische CTL, nicht aber deren Induktion. Dementsprechend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach Immunisierung von Plasmid-DNA die Versuchstiere Immunantworten gegen die applizierten GAgag-Konstrukte generierten (siehe Abb. 3.2-6; Abb. 3.2-7). Die zellulären und humoralen Immunantworten gegen Gag und GAGag waren vergleichbar hoch. Die CTL-Antwort gegen TDGag jedoch war die stärkste und signifikant höher als gegen Gag. GATDsyngag induzierte eine sehr geringe Aktivierung von spezifischen CTL. Die Induktion von spezifischen Antikörpern zeigte dasselbe Ergebnis. Das Protein TDGag ist möglicherweise durch Größe und Konformation dazu geeignet, extrem schnell und gut prozessiert zu werden. Durch Präsentation vieler Antigenpeptide werden starke Immunantworten generiert, die TDsyngag zu einem effektiven Immunogen machen. Da durch den GA-Bereich die Degradation durch das Proteasom verhindert wird, sollte somit die Präsentation von Peptiden über MHC Klasse-I an CTL und daran anschließend die spezifische Lyse der Zellen blockiert werden. Die Erkennung und Lyse der GA-Gag exprimierenden Zellen *in vitro* ist verglichen mit den Gag exprimierenden Zellen, signifikant reduziert, wie in den *in vitro* Zytotoxizitäts-Studien gezeigt wurde (siehe Abb. 3.2-8). Die *in vivo* Studie in Mäusen zeigt deutlich, dass durch GA bzw. durch eine erhöhte Proteinstabilität die Erkennung und Lyse der Zellen verhindert wird (siehe Abb. 3.2-9). Die das native Gag

oder TDGag exprimierenden Zellen konnten in mit pc-syngag immunisierten Mäusen kaum oder gar nicht mehr nachgewiesen werden. Die Zellen, die Gag oder TDGag mit GA-fusioniert exprimierten, wurden, genauso wie die Kontrollzellen, nicht lysiert. Das bedeutet, dass durch die Fusion mit dem immunsuppressiven GA-Linker die spezifische Erkennung und Lyse von Transgen-exprimierenden Zellen *in vitro* und *in vivo* reduziert ist. In dieser Studie konnte für zwei Proteine (Gag und TDGag) gezeigt werden, dass der Effekt von GA, durch Proteasomen-Block vor spezifischer Lyse zu schützen, auch erhalten bleibt, wenn der Bereich auf 24 Aminosäuren eingegrenzt wird. Der Ansatz, die Immunogenität des Transgens zu reduzieren, kann die Risiken minimieren, die mit anderen immunsuppressiven Ansätzen verbunden sind. Die generelle Suppression des Immunsystems beispielsweise erhöht das Risiko opportunistischer Infektionen. Vor allem für die HIV Gentherapie beinhaltet der GA-Ansatz in Kombination mit den transdominanten Gag einige positive Effekte: (i) das transdominante Protein wird überexprimiert und ist stabil, was zu einer starken Inhibition der HIV-Replikation führt, (ii) CD8⁺ CTL gegen das Antigen werden induziert, d.h. mit HIV-1 infizierte Zellen, die das native Proteine exprimieren, werden von ihnen erkannt und lysiert und (iii) Zellen, die das Transgen exprimieren, werden nicht erkannt und lysiert, und ihr Überleben *in vivo* kann somit verlängert werden. Der GA-Bereich macht es möglich, potentiell immunogene Proteine für Gentherapie Ansätze zu nutzen. Obwohl die Expression des transdominanten Gag konstant für eine Reduktion der HIV-Replikation sorgt, kann noch restliche HIV-Replikation in Zellkultur beobachtet werden. Die Anwendung transdominanter Gag-Mutanten führt zu reduzierter und verzögerter Replikation, jedoch kann die Replikation dadurch nie vollständig inhibiert werden. Die transdominanten Gag-Mutanten mit GA, als Schutz vor CTL-induzierter Lyse, können zur Entwicklung einer erfolgreichen kombinatorischen Gentherapie-Strategie beitragen.

4.4. Inhibition der HIV-1-Replikation durch Minigene

Aus dem ersten Teil (4.2) der Arbeit geht hervor, dass ein kodonoptimiertes Konstrukt konstitutiv exprimiert, der beste Inhibitor der HIV Replikation ist. Im zweiten Teil (4.3) konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die synthetischen, kodonoptimierten Gag-Mutanten durch die Fusion mit einem Glycin-Alanin Bereich vor der Degradation durch das Proteasom zu schützen. Somit wird die Erkennung und Lyse der transduzierten Zellen durch spezifische CTL *in vivo* reduziert und das Überleben der genmodifizierten Zellen verlängert. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es möglich ist, die Größe der transdominanten Konstrukte weiter zu reduzieren, ohne dabei die inhibitorischen Eigenschaften zu verlieren. Zum einen könnten somit die immunogenen Eigenschaften des Transgen-Produkts reduziert werden. Zum anderen könnte die Zahl der Transgene in einem retrovirusalen Vektor erhöht werden, da die RNA-Verpackungskapazität ein limitierender Faktor ist.

Hierfür wurden die minimalen Domänen aus dem HIV-1 Gag (siehe Abb. 3.3-1) auf ihre inhibitorischen Eigenschaften *in vitro* getestet. Das Gag Polyprotein spielt die zentrale Rolle beim Zusammenbau von HIV-1. Kürzlich wurden minimale Regionen von Gag identifiziert (Minigag), die die Fähigkeit besitzen, effizient an das Gag-Protein zu binden (Zabransky, 2002). Diese Regionen bestehen aus dem N-terminalen Teil des Nukleokapsid-Proteins ($p7^{NC}$), einschließlich des ersten Zink-Finger-Motivs und der Interaktions- (I-) Domäne. Nur Proteine, die diese Teile des $p7^{NC}$ enthielten, zeigten starke Interaktionen mit dem Volllängen-Gag. Zusätzlich zu der ohnehin geringeren Immunogenität wurden die stabilisierenden Eigenschaften des Glycin-Alanin Bereichs genutzt (siehe Abb. 3.3-2), um die transduzierten T-Zellen wie in Kapitel 4.3 bereits beschrieben zusätzlich vor der Erkennung und Lyse durch spezifische CTL zu schützen.

In dieser Arbeit wurde demonstriert (siehe Kap. 4.3), dass ein Glycin-Alanin Bereich von 24 Aminosäuren Länge ausreichend ist, um Gag und transdominantes Gag vor der Degradation durch das Proteasom zu schützen. Neben der Erhöhung der Stabilität konnte auch gezeigt werden, dass die Zellen vor Erkennung durch spezifische CTL geschützt sind. Diesen Linker mit den Minigag-Konstrukten zu verknüpfen, sollte zur Stabilitätsverbesserung der sehr kleinen Proteine beitragen, aber wiederum auch die Immunogenität der Transgene für *in vivo* Anwendungen verringern. In Kapitel 4.2 wurden transdominante TDGag-Konstrukte untersucht, deren Transkription unter Kontrolle des HIV-LTR stand. Die Kombination aus LTR-Promotor und *TDgag*-Genen erwies sich bezüglich der Induzierbarkeit als Erfolg. Die basale Expression ohne Tat war sehr gering, konnte jedoch durch Zugabe von Tat signifikant erhöht werden. Die Freisetzung von Nachkommenviren in transienten Tests konnte durch die Expression der Tat-abhängigen Konstrukte fast bis zu 100 % inhibiert werden. Die Replikation von HIV in stabil transduzierten Zellen konnte allerdings durch das Tat-abhängige Konstrukt nicht reduziert werden. Es ist möglich, dass die Ursache für das Scheitern dieser Strategie in der Verwendung des retrovirusalen Vektors liegt. Dieser enthält ebenfalls einen LTR-Promotor retrovirusalen Ursprungs. Interferenzen zwischen diesen beiden Promotoren könnten die Ursache für die ausbleibende antivirale Aktivität sein. Da es sich bei den Tat-induzierbaren *TDsyngag*-Konstrukten, um die größten hier getesteten handelt, besteht zudem die Möglichkeit, dass die Verpackung in die retrovirusalen Partikel limitierend war.

Um nun zu prüfen, ob tatsächlich die Größe der Gene ausschlaggebend war, wurden Minigag-Konstrukte in Kombination mit dem HIV-LTR hergestellt (siehe Abb. 3.3-4) und untersucht. Die zusätzliche Induktion der Genexpression durch Tat erhöht, wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben, die Sicherheit um ein Maß, wie sie für eine Langzeit-Therapie von HIV nötig wäre.

Die transdominant negativen Minigag-Konstrukte erwiesen sich als starke und effektive Inhibitoren der HIV-Replikation (siehe Abb. 3.3-3). Sie hemmen, indem sie mit dem Viruszusammenbau und der Freisetzung von Nachkommen - Viren interferieren. In transienten Inhibitionsstudien erwiesen sich die drei Minigag-Konstrukte *L2*, *NCp1* und *LNcp1* als gute Inhibitoren (siehe Abb. 3.3-3 A). Nach Fusion der Konstrukte mit dem Glycin-Alanin-Bereich zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Hemmwirkung der Transgene und zwar abhängig davon, ob der GA-Bereich N- oder C-terminal an das Gen fusioniert war. Die C-terminal mit dem GA-Bereich verlängerten Konstrukte (siehe Abb. 3.3-3 B) zeigten wesentlich schlechtere Inhibitionsvermögen als die vergleichbaren Konstrukte, die N-terminal mit GA verlinkt waren (siehe Abb. 3.3-3 C). Ein möglicher Grund für diese ineffiziente Hemmwirkung könnte eine verringerte Proteinstabilität sein. Am N-Terminus eines Proteins gelegen schützt der GA-Bereich vor dem Abbau durch das Proteasom, wohingegen die C-terminale Fusion mit GA im Gegenteil die Stabilität herabsetzt und den Abbau eventuell sogar erleichtert. Der Effekt des Konstrukts *L2GA*, die Partikelfreisetzung und die Infektiosität der Partikel zu erhöhen, kann auf Proteinebene nicht erklärt werden. Eventuell hat das *L2GA*-Konstrukt Einfluss auf die Genregulation und erhöht die Transkription der HI-viralen Gene.

Die inhibitorischen Eigenschaften der Minigene mit GA waren zwar gut, aber noch nicht vergleichbar mit denen der *TDgag*-Varianten. Aus diesem Grund wurden Kombinationen aus zwei Minigenen und der GA-Region generiert (siehe Abb. 3.3-2). Alle neu entstandenen Minigag-Konstrukte inhibierten die Virusfreisetzung in den transienten Versuchen zu über 95 % (siehe Abb. 3.3-3 D). Die dennoch freigesetzten Partikel erwiesen sich aber im MAGI-Assay als nicht mehr infektiös. Die Einführung des HIV-LTR als Transkriptionskontrolle hatte auf die inhibitorischen Eigenschaften der Minigag-Konstrukte keinerlei negativen Einfluss (siehe Abb. 3.3-5). Auch hier betrug die Inhibition der Partikelfreisetzung durchwegs über 95 % und auch die Infektiosität der freigesetzten Viren war um mindestens 98 % reduziert. Alle getesteten Kombinations-Konstrukte, auch die Tat-induzierbaren, erwiesen sich als sehr gute und effiziente Inhibitoren der HIV-Freisetzung und waren in der Lage, die Infektiosität der Nachkommenviren effektiv zu reduzieren. In den nachfolgenden Infektionsstudien wurden zwei Minigag-Konstrukte (*L2GAL2* und *L2GALNCp1*) konstitutiv und Tat-induzierbar auf ihre inhibitorischen Eigenschaften hin untersucht (siehe Abb. 3.3-7). Die Konstrukte *L2GAL2* und *LTR-L2GALNCp1* zeigten gute und effiziente Hemmwirkung auf die HIV-Replikation. Im Gegensatz dazu hatten die Konstrukte *LTR-L2GAL2* und *L2GALNCp1* kaum bis gar keinen Einfluss auf die Replikation von HIV. Das kleinste Minigag-Konstrukt *L2GAL2* ist in der Lage, die Replikation zu inhibieren, wenn es bereits in großen Mengen in der Zelle vorhanden ist, bevor diese von HIV infiziert ist. Liegt es aber Tat-induzierbar in der Zelle vor und wird erst exprimiert, wenn die Zelle infiziert ist, bleibt die HIV-Vermehrung unbeeinflusst. Exakt das

Gegenteil gilt für das größte Minigag-Konstrukt *L2GALNCp1*. Tat-induzierbar ist es ein hervorragender Hemmer der HIV-Replikation, wohingegen das konstitutiv exprimierte Konstrukt keinen nennenswerten Einfluss auf die Replikation hat.

Für die *in vivo* Applikation der Minigag-Konstrukte als anti-HIV Transgene ist deren Immunogenität von großer Bedeutung. Gag ist, wie auch in dieser Arbeit bereits gezeigt (siehe Kapitel 4.3), ein sehr starkes Immunogen, für gentherapeutische Ansätze hingegen ist die Immunogenität der Konstrukte von Nachteil. Transgen-exprimierende T-Zellen werden von spezifischen CTL erkannt und lysiert. Um das Eliminieren der transduzierten Zellen zu verhindern, sollten die angewendeten Transgene so wenig immunogen wie möglich sein. Wie bereits gezeigt vermittelt der GA-Bereich neben erhöhter Stabilität auch einen Schutz vor Degradation durch das Proteasom und somit vor Präsentation von CTL-Epitopen auf der Zelloberfläche. Die Minigene bestehen zudem ausschließlich aus den Bereichen, die für die Interaktion mit Gag nötig sind, d.h. die Zahl der möglichen CTL Epitope ist relativ gering im Vergleich mit dem Volllänge-Gag-Protein. Durch diese Modifikationen sollte die Immunantwort, die von den Minigenen induziert wird, relativ gering ausfallen. Es konnte in den Immunisierungsstudien gezeigt werden, dass die Immunantworten, die durch die gestesteten Minigag-Varianten induziert wurden, im Vergleich zu dem Volllänge-Gag signifikant reduziert waren (siehe Abb. 3.3-6). Da die induzierten Immunantworten kaum den Wert der Mock-Kontrolle überschreiten, kann auch davon ausgegangen werden, dass die transduzierten Zellen nicht lysiert werden.

Das Potential von Minigag-Konstrukten als Module in der anti-HIV Gentherapie ist aufgrund ihrer guten inhibitorischen und immunologischen Eigenschaften sehr hoch. Sie haben Vorteile vor allem hinsichtlich (i) ihrer geringen Immunogenität, (ii) ihrer Größe, die es erlaubt weitere antivirale Module in eine Retrovirus einzubauen, ohne die Verpackungsgröße zu überschreiten und (iii) ihrer antiviralen Eigenschaften, die sie in Bezug auf die Replikation von HIV zeigen.

5. Resumee / Ausblick

Die HIV-1-Replikation wird am effektivsten durch TDGag-Konstrukte inhibiert, die konstitutiv oder Rev-abhängig exprimiert werden, im Gegensatz zu Tat- oder Tat/Rev-abhängigen Transgenen. Das Überleben transduzierter Zellen, die eine starkes Antigen exprimieren, kann *in vivo* gesichert werden, indem ein immunsuppressiver GA-Bereich an das Transgen fusioniert wird. Das Protein mit GA-Bereich wird nicht degradiert und somit findet keine Präsentation von Antigenpeptiden über MHC Klasse-I statt. Die minimalen Bereiche (Minigag), die noch zur Interaktion mit Gag fähig sind, inhibieren die HIV-1-Replikation. Die antivirale Aktivität dieser Minigags kann gesteigert werden, indem man sie untereinander und mit dem GA-Bereich kombiniert.

Die Kapazitäten der Minigene konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig erarbeitet werden. Der Einfluss von GA auf die Erkennung und Lyse transduzierter Zellen im Kontext der Minigag-Gene sollte evaluiert werden. Hierfür sollten Zytotoxizitäts-Test, ähnlich denen, die mit GATDsyngag durchgeführt werden. Da die inhibitorischen Eigenschaften der Minigag-Konstrukte nicht eindeutig als positiv zu werten sind, könnten diese verbessert werden, indem diese durch weitere Minigag-Gene verlängert werden. Zusätzliche Untersuchungen zur Stabilität der Minigene könnte Aufschluss darüber geben, ob die GA-Region Einfluss auf die Stabilität hat. Molekularbiologische Untersuchungen könnten klären, weshalb die Menge an freigesetzten Viren und deren Infektiosität erhöht wird, wenn in der Zelle gleichzeitig L2GA exprimiert wird.

Unabhängige Testungen der inhibitorischen Eigenschaften der Konstrukte *TDwtgagΔ2*, *TDsyngagΔ2* und *L2GAL2* am Paul-Ehrlich-Institut (Langen) ergaben, dass die Replikation von HIV-1 am besten durch *TDsyngagΔ2* inhibiert wird. Zudem wurde festgestellt, dass *TDsyngagΔ2* ebenfalls in der Lage ist, die Replikation von HIV-2 zu hemmen. Diese Erkenntnisse und die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit führten dazu, weitere präklinische Testungen mit diesem Konstrukt durchzuführen. Zunächst werden an nicht-humanen Primaten Untersuchungen zur Verträglichkeit und Toxikologie durchgeführt. Zudem sollen diese Versuche erste Erkenntnisse zum Überleben transduzierter Zellen im Affenmodell liefern. Gleichzeitig wird die Kombination aus dem Eintrittsinhibitor C46 und dem *TDsyngagΔ2* getestet, sowohl hinsichtlich der Expression der Transgene als auch ihrer kummulativen Wirkung und Sicherheit. Des Weiteren ist es nötig, *in vitro* Zellen, die beide Transgene exprimieren mit HI-Viren zu infizieren, die bereits resistent gegen den Eintrittsinhibitor C46 sind. Die Reservisten-Funktion, die dem *TDsyngagΔ2* in der Kombinationstherapie hat, soll somit untersucht werden.

Nach hoffentlich erfolgreichen präklinischen Studien sollen klinische Tests folgen, und vielleicht ist es in einigen Jahren möglich, HIV-Patienten anstelle der HAART eine alternative Behandlungsmöglichkeit, nämlich eine HIV-Gentherapie, anzubieten.

6. Zusammenfassung

Die genetische Modifikation von T-Lymphozyten zum Schutz vor der Infektion der Zellen bietet eine alternative Behandlungsform von HIV⁺ Patienten zur HAART. Die Expression eines entry-Inhibitors erbringt transduzierten Zellen unter dem Druck einer Infektion einen selektiven Vorteil. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass gegen den Inhibitor resistente Viren auftreten. Um diesen resistenten HIV-Varianten keine Möglichkeit zur Ausbreitung im Patienten zu geben, müssen die Zellen mit einem zweiten anti-HIV-Gen ausgestattet werden. Mathematische Berechnungen haben gezeigt, dass die Kombination aus einem Inhibitor der frühen Replikationsphase und einem Hemmer der späten Replikationsphase die beste Verbindung ist. Transdominante HIV-1 Gag-Mutanten sind starke Inhibitoren der späten Phase der HIV-Replikation, indem sie mit dem Zusammenbau der Virionen und deren Freisetzung interferieren. Das Ziel dieser Arbeit war es, transdominante Gag-Varianten herzustellen und deren Wirksamkeit zu testen. Besonders wichtig war hierbei die Immunogenität der Gag-Varianten, die für die *in vivo* Applikation in HIV⁺-Patienten eine entscheidende Rolle spielt, da im Patienten T-Zellen, die das starke Antigen Gag exprimieren, von spezifischen CTL erkannt und lysiert werden.

Ausgehend von einer kodonoptimierten, transdominanten Gag-Variante (*TDsyngag*) sollten zunächst Derivate erstellt werden, die erst transkribiert bzw. exprimiert werden, wenn die dafür nötigen regulatorischen Proteine in Folge einer Infektion mit dem HI-Virus vorhanden sind. Die Untersuchungen ergaben, dass die Konstrukte, die Rev-induzierbar bzw. konstitutiv exprimiert werden, die Replikation von HIV in Zellkultur am effektivsten reduzierten. Die Tat- und die Tat/Rev-induzierbare Strategie zeigte jedoch keine antivirale Wirkung.

Zudem wurde eine Region im p24^{CA} deletiert, die besonders viele CTL-Epitope aufweist, was die Immunogenität der Konstrukte reduzieren sollte. Durch die Einführung dieser Deletion verloren die Konstrukte nicht an inhibitorischer Kapazität. Da jedoch ein Rev-induzierbares Wildtyp-Konstrukt den Sicherheitsansprüchen einer Gentherapie durch die Möglichkeit der Rekombination mit HIV nicht entspricht, wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

Die Fusion der konstitutiv exprimierten TDGag-Varianten mit einem immunsuppressiven GA-Bereich sollte die *in vivo* Anwendung möglich machen. Der GA-Bereich erhöht die Stabilität von TDGag, indem die Degradation durch das Proteasom blockiert wird. Die erhöhten Proteinmengen, die auf Grund des fehlenden Abbaus entstehen, führen zu gesteigerter Inhibition der HIV-1-Replikation. Des Weiteren werden keine Antigenpeptide über MHC Klasse-I präsentiert und somit sind die Zellen im Mausmodell *in vitro* und *in vivo* vor der Lyse durch CTL geschützt. Zur weiteren Optimierung der transdominanten Mutanten wurden die minimalen Bereiche von Gag (Minigag), die noch zur Interaktion mit dem gesamten Protein fähig sind, als Effektoren verwendet. Hierbei konnten Konstrukte definiert

werden, die eine starke inhibitorische Wirkung auf die Replikation von HIV *in vitro* haben, jedoch aufgrund ihrer Größe und der Verbindung mit dem suppressiven Linker GA sehr geringes immunologisches Potential haben. Zudem erwies sich ein Minigag-Konstrukt auch Tat-induzierbar als guter Inhibitor.

Es wurde zum einen mit dem immunsuppressiven Linker GA ein Werkzeug gefunden, dass es ermöglicht, potentiell immunogene Transgen-Produkte für gentherapeutische Zwecke zu verwenden. Zum anderen wurden mit den konstitutiv exprimierten *TDsyngag*-Varianten und den Minigag-Konstrukten Transgene entwickelt deren Anwendung durch ihre inhibitorische Wirkung auf die HIV-Replikation und ihrer immunologischen Eigenschaften potentiell möglich ist. Diese Konstrukte werden derzeit in Kombination mit einem Inhibitor der frühen Phase der HIV-Replikation in Affenstudien getestet – die Anwendung im Menschen wird bereits erwogen.

7. Literaturverzeichnis

Aiken C, Trono D.

Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis.

J Virol. 1995 Aug;69(8):5048-56.

Asjo B, Sharma UK, Morfeldt-Manson L, Magnusson A, Barkhem T, Albert J, Olausson E, Von Gegerfelt A, Lind B, Biberfeld P, et al.

Naturally occurring HIV-1 isolates with differences in replicative capacity are distinguished by in situ hybridization of infected cells.

AIDS Res Hum Retroviruses. 1990 Oct;6(10):1177-82.

Baldwin CE, Sanders RW, Deng Y, Jurriaans S, Lange JM, Lu M, Berkhout B.

Emergence of a drug-dependent human immunodeficiency virus type 1 variant during therapy with the T20 fusion inhibitor.

J Virol. 2004 Nov;78(22):12428-37.

Baldwin CE, Sanders RW, Berkhout B.

Inhibiting HIV-1 entry with fusion inhibitors.

Curr Med Chem. 2003 Sep;10(17):1633-42. Review.

Baltimore D.

Gene therapy. Intracellular immunization.

Nature. 1988 Sep 29;335(6189):395-6.

Barbaro G, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT.

Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome.

Curr Pharm Des. 2005;11(14):1805-43.

Battiste JL, Mao H, Rao NS, Tan R, Muhandiram DR, Kay LE, Frankel AD, Williamson JR.

Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex.

Science. 1996 Sep 13;273(5281):1547-51.

Bernard NF, Yannakis CM, Lee JS, Tsoukas CM.

Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV-exposed seronegative persons.

J Infect Dis. 1999 Mar;179(3):538-47.

Birnboim HC, Doly J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Blake N, Haigh T, Shaka'a G, Croom-Carter D, Rickinson A.

The importance of exogenous antigen in priming the human CD8+ T cell response: lessons from the EBV nuclear antigen EBNA1.

J Immunol. 2000 Dec 15;165(12):7078-87.

Blankson JN, Finzi D, Pierson TC, Sabundayo BP, Chadwick K, Margolick JB, Quinn TC, Siliciano RF.

Biphasic decay of latently infected CD4+ T cells in acute human immunodeficiency virus type 1 infection.

J Infect Dis. 2000 Dec;182(6):1636-42.

Blesch A.

Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer.

Methods. 2004 Jun;33(2):164-72.

- Bour S, Perrin C, Streb K.
Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity.
J Biol Chem. 1999 Nov 19;274(47):33800-6.
- Bradford MM.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.
- Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG, Fuller SD.
Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores.
EMBO J. 2003 Apr 1;22(7):1707-15.
- Buck HM, Koole LH, van Genderen MH, Smit L, Geelen JL, Jurriaans S, Goudsmit J.
Phosphate-methylated DNA aimed at HIV-1 RNA loops and integrated DNA inhibits viral infectivity.
Science. 1990 Apr 13;248(4952):208-12.
- Buonocore L, Rose JK.
Blockade of human immunodeficiency virus type 1 production in CD4+ T cells by an intracellular CD4 expressed under control of the viral long terminal repeat.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Apr 1;90(7):2695-9.
- Bushman FD.
Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control.
Curr Top Microbiol Immunol. 2002;261:165-77. Review.
- Caplen NJ, Kinrade E, Sorgi F, Gao X, Gruenert D, Geddes D, Coutelle C, Huang L, Alton EW, Williamson R.
In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE.
Gene Ther. 1995 Nov;2(9):603-13.
- Carr A.
Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor.
N Engl J Med. 2003 Oct 30;349(18):1770-1;
- Carrieri P, Spire B, Duran S, Katlama C, Peyramond D, Francois C, Chene G, Lang JM, Moatti JP, Leport C; APROCO Study Group.
Health-related quality of life after 1 year of highly active antiretroviral therapy.
J Acquir Immune Defic Syndr. 2003 Jan 1;32(1):38-47.
- Carrington M, Dean M, Martin MP, O'Brien SJ.
Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences.
Hum Mol Genet. 1999;8(10):1939-45. Review.
- Chen Z, Zhou P, Ho DD, Landau NR, Marx PA.
Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry.
J Virol. 1997 Apr;71(4):2705-14.
- Chiu HC, Wang FD, Yao SY, Wang CT.
Effects of gag mutations on human immunodeficiency virus type 1 particle assembly, processing, and cyclophilin A incorporation.
J Med Virol. 2002 Oct;68(2):156-63.
- Chouquet C, Autran B, Gomard E, Bouley JM, Calvez V, Katlama C, Costagliola D, Riviere Y; IMMUNOCO Study Group.
Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection.
AIDS. 2002 Dec 6;16(18):2399-407.

Chun TW, Davey RT Jr, Ostrowski M, Shawn Justement J, Engel D, Mullins JI, Fauci AS.
Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy.
Nat Med. 2000 Jul;6(7):757-61.

Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF.
Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection.
Nature. 1997 May 8;387(6629):183-8.

Clapham PR, McKnight A.
HIV-1 receptors and cell tropism.
Br Med Bull. 2001;58:43-59. Review.

Clesham GJ. Gene therapy made difficult.
Heart. 1998 Oct;80(4):313-4.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P.
Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells.
Science. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5.

Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D.
The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells.
Immunity. 1999 Jun;10(6):661-71.

Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR.
Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals.
J Exp Med. 1997 Feb 17;185(4):621-8.

Curiel TJ, Cook DR, Wang Y, Hahn BH, Ghosh SK, Harrison GS.
Long-term inhibition of clinical and laboratory human immunodeficiency virus strains in human T-cell lines containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene.
Hum Gene Ther. 1993 Dec;4(6):741-7.

d'Arminio Monforte A, Lepri AC, Rezza G, Pezzotti P, Antinori A, Phillips AN, Angarano G, Colangeli V, De Luca A, Ippolito G, Caggesi L, Soscia F, Filice G, Gritti F, Narciso P, Tirelli U, Moroni M.
Insights into the reasons for discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy (HAART) regimen in a cohort of antiretroviral naive patients. I.CO.N.A. Study Group. Italian Cohort of Antiretroviral-Naive Patients.
AIDS. 2000 Mar 31;14(5):499-507.

Dantuma NP, Heessen S, Lindsten K, Jellne M, Masucci MG.
Inhibition of proteasomal degradation by the gly-Ala repeat of Epstein-Barr virus is influenced by the length of the repeat and the strength of the degradation signal.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jul 18;97(15):8381-5.

Das SR, Jameel S.
Biology of the HIV Nef protein.
Indian J Med Res. 2005 Apr;121(4):315-32. Review.

De Guzman RN, Turner RB, Summers MF.
Protein-RNA recognition.
Biopolymers. 1998;48(2-3):181-95. Review.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996 Sep 27;273(5283):1856-62. Erratum in: *Science* 1996 Nov 15;274(5290):1069.

Derdowski A, Ding L, Spearman P.

A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol*. 2004 Feb;78(3):1230-42.

Dismuke DJ, Aiken C.

Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *J Virol*. 2006 Apr;80(8):3712-20.

Dornburg R, Pomerantz RJ.

HIV-1 gene therapy: promise for the future. *Adv Pharmacol*. 2000;49:229-61. Review.

Duran S, Saves M, Spire B, Cailleton V, Sobel A, Carrieri P, Salmon D, Moatti JP, Leport C; APROCO Study Group.

Failure to maintain long-term adherence to highly active antiretroviral therapy: the role of lipodystrophy. *AIDS*. 2001 Dec 7;15(18):2441-4.

Dybul M, Nies-Kraske E, Daucher M, Hertogs K, Hallahan CW, Csako G, Yoder C, Ehler L, Sklar PA, Belson M, Hidalgo B, Metcalf JA, Davey RT, Rock Kress DM, Powers A, Fauci AS.

Long-cycle structured intermittent versus continuous highly active antiretroviral therapy for the treatment of chronic infection with human immunodeficiency virus: effects on drug toxicity and on immunologic and virologic parameters. *J Infect Dis*. 2003 Aug 1;188(3):388-96.

Eckert DM, Kim PS.

Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11187-92.

Egelhofer M, Brandenburg G, Martinus H, Schult-Dietrich P, Melikyan G, Kunert R, Baum C, Choi I, Alexandrov A, von Laer D.

Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J Virol*. 2004 Jan;78(2):568-75.

Ehrlich LS, Liu T, Scarlata S, Chu B, Carter CA.

HIV-1 capsid protein forms spherical (immature-like) and tubular (mature-like) particles in vitro: structure switching by pH-induced conformational changes.

Biophys J. 2001 Jul;81(1):586-94. Erratum in: *Biophys J* 2001 Nov;81(5):2992.

Embreton J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT.

Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS.

Nature. 1993 Mar 25;362(6418):359-62.

Ewart GD, Sutherland T, Gage PW, Cox GB.

The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol*. 1996 Oct;70(10):7108-15.

Facke M, Janetzko A, Shoeman RL, Krausslich HG.

A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum.

J Virol. 1993 Aug;67(8):4972-80.

Farnet CM, Haseltine WA.

Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex.

J Virol. 1991 Apr;65(4):1910-5.

Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy.

Nat Med. 1999 May;5(5):512-7.

Finzi D, Siliciano RF.

Viral dynamics in HIV-1 infection.

Cell. 1998 May 29;93(5):665-71. Review.

Fischer AC, Ruvolo PP, Burt R, Horwitz LR, Bright EC, Hess JM, Beschorner WE, Hess AD.

Characterization of the autoreactive T cell repertoire in cyclosporin-induced syngeneic graft-versus-host disease. A highly conserved repertoire mediates autoaggression.

J Immunol. 1995 Apr 15;154(8):3713-25.

Freed EO.

Viral late domains.

J Virol. 2002 May;76(10):4679-87. Review.

Freed EO.

HIV-1 replication.

Somat Cell Mol Genet. 2001 Nov;26(1-6):13-33. Review.

Friedman PA, Kaufman S, Kang ES.

Nature of the molecular defect in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia.

Nature. 1972 Nov 17;240(5377):157-9.

Furuta RA, Shimano R, Ogasawara T, Inubushi R, Amano K, Akari H, Hatanaka M, Kawamura M, Adachi A.

HIV-1 capsid mutants inhibit the replication of wild-type virus at both early and late infection phases.

FEBS Lett. 1997 Sep 29;415(2):231-4.

Gallego O, de Mendoza C, Perez-Elias MJ, Guardiola JM, Pedreira J, Dalmau D, Gonzalez J, Moreno A, Arribas JR, Rubio A, Garcia-Arata I, Leal M, Domingo P, Soriano V.

Drug resistance in patients experiencing early virological failure under a triple combination including indinavir.

AIDS. 2001 Sep 7;15(13):1701-6.

Gasmi M, Glynn J, Jin MJ, Jolly DJ, Yee JK, Chen ST.

Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors.

J Virol. 1999 Mar;73(3):1828-34.

Goel A, Mazur SJ, Fattah RJ, Hartman TL, Turpin JA, Huang M, Rice WG, Appella E, Inman JK.

Benzamide-based thiolcarbamates: a new class of HIV-1 NCp7 inhibitors.

Bioorg Med Chem Lett. 2002 Mar 11;12(5):767-70.

Goodchild J, Agrawal S, Civeira MP, Sarin PS, Sun D, Zamecnik PC.

Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligodeoxynucleotides.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Aug;85(15):5507-11. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Mar;86(5):1504.

Gougeon ML, Colizzi V, Dalgleish A, Montagnier L.

New concepts in AIDS pathogenesis.

AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 Mar;9(3):287-9. Review.

- Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE.
The Trojan exosome hypothesis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 16;100(19):10592-7.
- Graf M, Bojak A, Deml L, Bieler K, Wolf H, Wagner R.
Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression.
J Virol. 2000 Nov;74(22):10822-6
- Graham FL, van der Eb AJ.
Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5.
Virology. 1973 Aug;54(2):536-9.
- Greenberg M, Cammack N, Salgo M, Smiley L.
HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy.
Rev Med Virol. 2004 Sep-Oct;14(5):321-37. Review.
- Greene WC, Peterlin BM.
Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy.
Nat Med. 2002 Jul;8(7):673-80. Review.
- Hadida F, Vieillard V, Mollet L, Clark-Lewis I, Baggolini M, Debre P.
Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells.
J Immunol. 1999 Aug 1;163(3):1105-9.
- Haffar O, Bukrinsky M.
Nuclear translocation as a novel target for anti-HIV drugs.
Expert Rev Anti Infect Ther. 2005 Feb;3(1):41-50. Review.
- Harrich D, Hooker B.
Mechanistic aspects of HIV-1 reverse transcription initiation.
Rev Med Virol. 2002 Jan-Feb;12(1):31-45. Review.
- Harrich D, Ulich C, Gaynor RB.
A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription.
J Virol. 1996 Jun;70(6):4017-27.
- He G, Ylisastigui L, Margolis DM.
The regulation of HIV-1 gene expression: the emerging role of chromatin.
DNA Cell Biol. 2002 Oct;21(10):697-705. Review.
- Hengel RL, Kennedy MS, Steketee RW, Thea DM, Abrams EJ, Lambert G, McDougal JS.
Neutralizing antibody and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1998 Apr 10;14(6):475-81.
- Hermankova M, Siliciano JD, Zhou Y, Monie D, Chadwick K, Margolick JB, Quinn TC, Siliciano RF.
Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo.
J Virol. 2003 Jul;77(13):7383-92.
- Hildinger M, Dittmar MT, Schult-Dietrich P, Fehse B, Schnierle BS, Thaler S, Stiegler G, Welker R, von Laer D.
Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry.
J Virol. 2001 Mar;75(6):3038-42.
- Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H, Johnson D.
Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity.
Nature. 1995 Jun 1;375(6530):411-5.

Hirsch I, Spire B, Tsunetsugu-Yokota Y, Neuveut C, Sire J, Chermann JC. Differences in replication and cytopathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are not determined by long terminal repeats (LTR). *Virology*. 1990 Aug;177(2):759-63.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995 Jan 12;373(6510):123-6.

Hrimech M, Yao XJ, Branton PE, Cohen EA. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G(2) cell cycle arrest: Vpr interferes with cell cycle signaling cascades by interacting with the B subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A. *EMBO J*. 2002 Jul 15;21(14):3918.

Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*. 1996 Nov;2(11):1240-3.

Humeau LM, Binder GK, Lu X, Slepushkin V, Merling R, Echeagaray P, Pereira M, Slepushkina T, Barnett S, Dropulic LK, Carroll R, Levine BL, June CH, Dropulic B. Efficient lentiviral vector-mediated control of HIV-1 replication in CD4 lymphocytes from diverse HIV+ infected patients grouped according to CD4 count and viral load. *Mol Ther*. 2004 Jun;9(6):902-13.

Isel C, Karn J. Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol*. 1999 Jul 30;290(5):929-41.

Iwatani Y, Song SK, Wang L, Planas J, Sakai H, Ishimoto A, Cloyd MW. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu modifies viral cytopathic effect through augmented virus release. *J Gen Virol*. 1997 Apr;78 (Pt 4):841-6.

Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*. 2002 Jul 25;418(6896):435-8.

Jooss K, Ertl HC, Wilson JM. Cytotoxic T-lymphocyte target proteins and their major histocompatibility complex class I restriction in response to adenovirus vectors delivered to mouse liver. *J Virol*. 1998 Apr;72(4):2945-54.

Jordan A, Defechereux P, Verdin E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J*. 2001 Apr 2;20(7):1726-38.

Kao S, Khan MA, Miyagi E, Plishka R, Buckler-White A, Strelbel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol*. 2003 Nov;77(21):11398-407.

Karlsson A, Parsmyr K, Sandstrom E, Fenyo EM, Albert J. MT-2 cell tropism as prognostic marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol*. 1994 Feb;32(2):364-70.

Karn J. Tackling Tat. *J Mol Biol*. 1999 Oct 22;293(2):235-54. Review.

- Kay MA, Holterman AX, Meuse L, Gown A, Ochs HD, Linsley PS, Wilson CB. Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4Ig administration. *Nat Genet.* 1995 Oct;11(2):191-7.
- Kazmierski W, Bifulco N, Yang H, Boone L, DeAnda F, Watson C, Kenakin T. Recent progress in discovery of small-molecule CCR5 chemokine receptor ligands as HIV-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2003 Jul 3;11(13):2663-76. Review. Erratum in: *Bioorg Med Chem.* 2003 Sep 1;11(18):4155.
- Kerkau T, Bacik I, Bennink JR, Yewdell JW, Hunig T, Schimpl A, Schubert U. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med.* 1997 Apr 7;185(7):1295-305.
- Khanna R, Burrows SR, Steigerwald-Mullen PM, Thomson SA, Kurilla MG, Moss DJ. Isolation of cytotoxic T lymphocytes from healthy seropositive individuals specific for peptide epitopes from Epstein-Barr virus nuclear antigen 1: implications for viral persistence and tumor surveillance. *Virology.* 1995 Dec 20;214(2):633-7.
- Khanna R, Burrows SR, Kurilla MG, Jacob CA, Misko IS, Sculley TB, Kieff E, Moss DJ. Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):169-76.
- Kilby JM, Eron JJ. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med.* 2003 May 29;348(22):2228-38. Review.
- Kimpton J, Emerman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J Virol.* 1992 Apr;66(4):2232-9.
- Kjems J, Askjaer P. Rev protein and its cellular partners. *Adv Pharmacol.* 2000;48:251-98. Review.
- Kleiman L, Cen S. The tRNALys packaging complex in HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Sep;36(9):1776-86. Review.
- Kofman A, Graf M, Bojak A, Deml L, Bieler K, Kharazova A, Wolf H, Wagner R. HIV-1 gag expression is quantitatively dependent on the ratio of native and optimized codons. *Tsitolgiia.* 2003;45(1):86-93.
- Kolls JK, Lei D, Odom G, Nelson S, Summer WR, Gerber MA, Shellito JE. Use of transient CD4 lymphocyte depletion to prolong transgene expression of E1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 1996 Mar 1;7(4):489-97.
- Konforti BB, Koziolkiewicz MJ, Konarska MM. Disruption of base pairing between the 5' splice site and the 5' end of U1 snRNA is required for spliceosome assembly. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):863-73.
- Koonin EV, Abagyan RA. TSG101 may be the prototype of a class of dominant negative ubiquitin regulators. *Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):330-1.

Koot M, Schellekens PT, Mulder JW, Lange JM, Roos MT, Coutinho RA, Tersmette M, Miedema F. Viral phenotype and T cell reactivity in human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic men treated with zidovudine. *J Infect Dis.* 1993 Sep;168(3):733-6.

Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, Wolinsky SM, Zhang L, Guo Y, Deutsch L, Phair J, Neumann AU, Ho DD. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med.* 1998 Mar;4(3):350-3.

Kostrikis LG, Cao Y, Ngai H, Moore JP, Ho DD. Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F, and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *J Virol.* 1996 Jan;70(1):445-58.

Kotsopoulou E, Kim VN, Kingsman AJ, Kingsman SM, Mitrophanous KA. A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J Virol.* 2000 May;74(10):4839-52.

Kupfer B, Kaiser R, Rockstroh JK, Matz B, Schneweis KE. Role of HIV-1 phenotype in viral pathogenesis and its relation to viral load and CD4+ T-cell count. *J Med Virol.* 1998 Nov;56(3):259-63.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lafeuillade A, Khiri H, Chadapaud S, Hittinger G, Halfon P. Persistence of HIV-1 resistance in lymph node mononuclear cell RNA despite effective HAART. *AIDS.* 2001 Oct 19;15(15):1965-9.

Lambotte O, Chaix ML, Gubler B, Nasreddine N, Wallon C, Goujard C, Rouzioux C, Taoufik Y, Delfraissy JF. The lymphocyte HIV reservoir in patients on long-term HAART is a memory of virus evolution. *AIDS.* 2004 May 21;18(8):1147-58.

Lanman J, Sexton J, Sakalian M, Prevelige PE Jr. Kinetic analysis of the role of intersubunit interactions in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein assembly in vitro. *J Virol.* 2002 Jul;76(14):6900-8.

Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology.* 2005 Feb 22;2(1):11.

Levin R, Mhashilkar AM, Dorfman T, Bukovsky A, Zani C, Bagley J, Hinkula J, Niedrig M, Albert J, Wahren B, Gottlinger HG, Marasco WA. Inhibition of early and late events of the HIV-1 replication cycle by cytoplasmic Fab intrabodies against the matrix protein, p17. *Mol Med.* 1997 Feb;3(2):96-110.

Levitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 11;94(23):12616-21.

- Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG, Masucci MG.
Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1.
Nature. 1995 Jun 22;375(6533):685-8.
- Levy-Mintz P, Duan L, Zhang H, Hu B, Dornadula G, Zhu M, Kulkosky J, Bizub-Bender D, Skalka AM, Pomerantz RJ.
Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase.
J Virol. 1996 Dec;70(12):8821-32. Erratum in: J Virol 1998 Apr;72(4):3505-6. J Virol 2001 Jan;75(2):1092-3.
- Lin YL, Mettling C, Portales P, Reynes J, Clot J, Corbeau P.
Cell surface CCR5 density determines the postentry efficiency of R5 HIV-1 infection.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15590-5.
- Lisziewicz J, Sun D, Weichold FF, Thierry AR, Lusso P, Tang J, Gallo RC, Agrawal S.
Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 16;91(17):7942-6.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR.
Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.
Cell. 1996 Aug 9;86(3):367-77.
- Lohrengel S, Hermann F, Hagmann I, Oberwinkler H, Scrivano L, Hoffmann C, von Laer D, Dittmar MT.
Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to membrane-anchored gp41-derived peptides.
J Virol. 2005 Aug;79(16):10237-46.
- Lori F, Guallini P, Galluzzi L, Lisziewicz J.
Gene therapy approaches to HIV infection.
Am J Pharmacogenomics. 2002;2(4):245-52. Review.
- Luis Abad J, Gonzalez MA, del Real G, Mira E, Manes S, Serrano F, Bernad A.
Novel interfering bifunctional molecules against the CCR5 coreceptor are efficient inhibitors of HIV-1 infection.
Mol Ther. 2003 Sep;8(3):475-84.
- Lusso P, Cocchi F, Balotta C, Markham PD, Louie A, Farci P, Pal R, Gallo RC, Reitz MS Jr.
Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1.
J Virol. 1995 Jun;69(6):3712-20.
- MacDonald KS, Fowke KR, Kimani J, Dunand VA, Nagelkerke NJ, Ball TB, Oyugi J, Njagi E, Gaur LK, Brunham RC, Wade J, Luscher MA, Krausa P, Rowland-Jones S, Ngugi E, Bwayo JJ, Plummer FA.
Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection.
J Infect Dis. 2000 May;181(5):1581-9.
- Magierowska M, Theodorou I, Debre P, Sanson F, Autran B, Riviere Y, Charron D, Costagliola D.
Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals.
Blood. 1999 Feb 1;93(3):936-41.

- Marcello A, Giaretta I.
Inducible expression of herpes simplex virus thymidine kinase from a bicistronic HIV1 vector.
Res Virol. 1998 Nov-Dec;149(6):419-31.
- Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR.
Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif.
Cell. 2003 Jul 11;114(1):21-31.
- Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D.
HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation.
Nat Med. 2003 Nov;9(11):1398-403.
- Martinez MA, Clotet B, Este JA.
RNA interference of HIV replication.
Trends Immunol. 2002 Dec;23(12):559-61.
- Masucci MG, Dantuma NP.
Reply to 'Ubiquitin/proteasome system'
Nat Biotechnol. 2000 Aug;18(8):807.
- Mebatsion T, Finke S, Weiland F, Conzelmann KK.
A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells.
Cell. 1997 Sep 5;90(5):841-7.
- Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA.
Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma.
Science. 1996 May 24;272(5265):1167-70. Erratum in: Science 1997 Jan 3;275(5296):14.
- Meylan PR, Guatelli JC, Munis JR, Richman DD, Kornbluth RS.
Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages.
Virology. 1993 Mar;193(1):138-48.
- Migueles SA, Connors M.
The Role of CD4(+) and CD8(+) T Cells in Controlling HIV Infection.
Curr Infect Dis Rep. 2002 Oct;4(5):461-467.
- Milner JM, Rowan AD, Elliott SF, Cawston TE.
Inhibition of furin-like enzymes blocks interleukin-1alpha/oncostatin M-stimulated cartilage degradation.
Arthritis Rheum. 2003 Apr;48(4):1057-66.
- Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, Minna JD, et al.
p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features.
Oncogene. 1992 Jan;7(1):171-80.
- Moore JP, Sattentau QJ.
Detecting SIV gp120 and its interaction with soluble CD4 by ELISA.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 Dec;9(12):1297-9.
- Morgan RA, Walker R, Carter CS, Natarajan V, Tavel JA, Bechtel C, Herpin B, Muul L, Zheng Z, Jagannatha S, Bunnell BA, Fellowes V, Metcalf JA, Stevens R, Baseler M, Leitman SF, Read EJ, Blaese RM, Lane HC.
Preferential survival of CD4+ T lymphocytes engineered with anti-human immunodeficiency virus (HIV) genes in HIV-infected individuals.
Hum Gene Ther. 2005 Sep;16(9):1065-74.

- Morgan RA.
Gene therapy for HIV infection.
Clin Exp Immunol. 1997 Jan;107 Suppl 1:41-4.
- Morgan RA, Walker R.
Gene therapy for AIDS using retroviral mediated gene transfer to deliver HIV-1 antisense TAR and transdominant Rev protein genes to syngeneic lymphocytes in HIV-1 infected identical twins.
Hum Gene Ther. 1996 Jun 20;7(10):1281-306.
- Muller WE, Schroder HC, Reuter P, Sarin PS, Hess G, Meyer zum Buschenfelde KH, Kuchino Y, Nishimura S.
Inhibition of expression of natural UAG suppressor glutamine tRNA in HIV-infected human H9 cells in vitro by Avarol.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1988 Aug;4(4):279-86.
- Munz C, Bickham KL, Subklewe M, Tsang ML, Chahroudi A, Kurilla MG, Zhang D, O'Donnell M, Steinman RM.
Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1.
J Exp Med. 2000 May 15;191(10):1649-60.
- Murray JS, Madri J, Tite J, Carding SR, Bottomly K.
MHC control of CD4+ T cell subset activation.
J Exp Med. 1989 Dec 1;170(6):2135-40.
- Nakamura Y, Kameoka M, Tobiume M, Kaya M, Ohki K, Yamada T, Ikuta K.
A chain section containing epitopes for cytotoxic T, B and helper T cells within a highly conserved region found in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein.
Vaccine. 1997 Apr;15(5):489-96.
- Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shiota T.
A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform.
AIDS. 2004 Mar 26;18(5):729-38.
- Nguyen DH, Hildreth JE.
Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts.
J Virol. 2000 Apr;74(7):3264-72.
- Nilsson J, Weis K, Kjems J.
The C-terminal extension of the small GTPase Ran is essential for defining the GDP-bound form.
J Mol Biol. 2002 Apr 26;318(2):583-93.
- Numa F, Hirabayashi K, Tsunaga N, Kato H, O'Rourke K, Shao H, Stechmann-Lebakken C, Varani J, Rapraeger A, Dixit VM.
Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells.
Cancer Res. 1995 Oct 15;55(20):4676-80.
- Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggolini M, Moser B
The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1.
Nature. 1996 Aug 29;382(6594):833-5. Erratum in: Nature 1996 Nov 21;384(6606):288.
- Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ.
Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA.
Science. 1998 Mar 27;279(5359):2103-6.

Ono A, Freed EO.

Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body.

J Virol. 2004 Feb;78(3):1552-63.

Ono A, Freed EO.

Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 20;98(24):13925-30.

Ossevoort M, Visser BM, van den Wollenberg DJ, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ, Toes RE, Hoeben RC.

Creation of immune 'stealth' genes for gene therapy through fusion with the Gly-Ala repeat of EBNA-1. Gene Ther. 2003 Nov;10(24):2020-8.

Paliard X, Doe B, Walker CM.

The T cell repertoire primed by antiviral vaccination is influenced by self-tolerance.

Cell Immunol. 1998 Aug 25;188(1):73-9.

Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS.

HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. Nature. 1993 Mar 25;362(6418):355-8.

Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, et al.

Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition.

Nature. 1991 Dec 12;354(6353):453-9.

Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR.

Science. 1993 Mar 19;259(5102):1749-54.

Pollard VW, Malim MH.

The HIV-1 Rev protein.

Annu Rev Microbiol. 1998;52:491-532. Review.

Poluri A, van Maanen M, Sutton RE.

Genetic therapy for HIV/AIDS.

Expert Opin Biol Ther. 2003 Sep;3(6):951-63. Review.

Popov S, Rexach M, Zybarth G, Reiling N, Lee MA, Ratner L, Lane CM, Moore MS, Blobel G, Bukrinsky M.

Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex.

EMBO J. 1998 Feb 16;17(4):909-17.

Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D.

Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 7;100(1):183-8.

Rabson AB, Koenig S, Daugherty DF, Gendelman HE.

Molecular pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.

Gene Anal Tech. 1988 May-Jun;5(3):41-53. Review.

Ragheb JA, Couture L, Mullen C, Ridgway A, Morgan RA.

Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat/Rev-regulated expression of cytosine deaminase, interferon alpha2, or diphtheria toxin compared with inhibition by transdominant Rev.

Hum Gene Ther. 1999 Jan 1;10(1):103-12.

- Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, Macken CA, Perelson AS, Markowitz M, Ho DD.
The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy.
Nat Med. 2000 Jan;6(1):82-5.
- Ranga U, Woffendin C, Verma S, Xu L, June CH, Bishop DK, Nabel GJ.
Enhanced T cell engraftment after retroviral delivery of an antiviral gene in HIV-infected individuals.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 3;95(3):1201-6.
- Ratner L, Fisher A, Jagodzinski LL, Mitsuya H, Liou RS, Gallo RC, Wong-Staal F.
Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1987 Spring;3(1):57-69.
- Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K, et al.
Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III.
Nature. 1985 Jan 24-30;313(6000):277-84.
- Rickinson AB, Moss DJ.
Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection.
Annu Rev Immunol. 1997;15:405-31. Review.
- Rizvi TA, Schmidt RD, Lew KA, Keeling ME.
Rev/RRE-independent Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element-dependent propagation of SIVmac239 vectors using a single round of replication assay.
Virology. 1996 Aug 15;222(2):457-63.
- Rondon IJ, Marasco WA.
Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases.
Annu Rev Microbiol. 1997;51:257-83. Review.
- Rosenzweig M, Pykett M, Marks DF, Johnson RP.
Enhanced maintenance and retroviral transduction of primitive hematopoietic progenitor cells using a novel three-dimensional culture system.
Gene Ther. 1997 Sep;4(9):928-36.
- Russ AP, Friedel C, Ballas K, Kalina U, Zahn D, Strebhardt K, von Melchner H.
Identification of genes induced by factor deprivation in hematopoietic cells undergoing apoptosis using gene-trap mutagenesis and site-specific recombination.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 24;93(26):15279-84. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Apr 15;94(8):4233.
- Sakai H, Furuta RA, Tokunaga K, Kawamura M, Hatanaka M, Adachi A.
Rev-dependency of expression of human immunodeficiency virus type 1 gag and env genes.
FEBS Lett. 1995 May 29;365(2-3):141-5.
- Sambrook J, Gething MJ.
Protein structure. Chaperones, paperones.
Nature. 1989 Nov 16;342(6247):224-5.
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M.
Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.
Nature. 1996 Aug 22;382(6593):722-5.
- Sandefur S, Smith RM, Varthakavi V, Spearman P.
Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag).
J Virol. 2000 Aug;74(16):7238-49.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Sarver N, Cantin EM, Chang PS, Zaia JA, Ladne PA, Stephens DA, Rossi JJ.
Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents.
Science. 1990 Mar 9;247(4947):1222-5.
- Sastry KJ, Nehete PN, Venkatnarayanan S, Morkowski J, Platsoucas CD, Arlinghaus RB.
Rapid in vivo induction of HIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes by a 15-amino acid unmodified free peptide from the immunodominant V3-loop of GP120.
Virology. 1992 Jun;188(2):502-9.
- Scherr M, Eder M.
Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors.
Curr Gene Ther. 2002 Feb;2(1):45-55. Review.
- Schneider R, Campbell M, Nasioulas G, Felber BK, Pavlakis GN.
Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation.
J Virol. 1997 Jul;71(7):4892-903.
- Schnell MJ, Johnson JE, Buonocore L, Rose JK.
Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection.
Cell. 1997 Sep 5;90(5):849-57.
- Schubert U, Bour S, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Maldarell F, Strebel K.
The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains.
J Virol. 1996 Feb;70(2):809-19.
- Schuitemaker H, Kootstra NA, Koppelman MH, Bruisten SM, Huisman HG, Tersmette M, Miedema F.
Proliferation-dependent HIV-1 infection of monocytes occurs during differentiation into macrophages.
J Clin Invest. 1992 Apr;89(4):1154-60.
- Selby MJ, Doe B, Walker CM.
Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte activity elicited by coimmunization with human immunodeficiency virus type 1 genes regulated by the bacteriophage T7 promoter and T7 RNA polymerase protein.
J Virol. 1997 Oct;71(10):7827-31.
- Sharipo A, Imreh M, Leonchiks A, Imreh S, Masucci MG.
A minimal glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquitinated I kappaB alpha with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis.
Nat Med. 1998 Aug;4(8):939-44.
- Sharkey ME, Teo I, Greenough T, Sharova N, Luzuriaga K, Sullivan JL, Bucy RP, Kostrikis LG, Haase A, Veryard C, Davaro RE, Cheeseman SH, Daly JS, Bova C, Ellison RT 3rd, Mady B, Lai KK, Moyle G, Nelson M, Gazzard B, Shaunak S, Stevenson M.
Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy.
Nat Med. 2000 Jan;6(1):76-81.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH.
Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.
Nature. 2002 Aug 8;418(6898):646-50.
- Shimano R, Iida S, Fukumori T, Yamamoto Y, Kawamura M, Furuta RA, Adachi A.
Inhibition of HIV replication by capsid mutant C6b.
Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jan 14;242(2):313-6.

Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF.

Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells.

Nat Med. 2003 Jun;9(6):727-8.

Smith SM, Markham RB, Jeang KT.

Conditional reduction of human immunodeficiency virus type 1 replication by a gain-of-herpes simplex virus 1 thymidine kinase function.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 23;93(15):7955-60.

Smythe JA, Sun D, Thomson M, Markham PD, Reitz MS Jr, Gallo RC, Lisziewicz J.

A Rev-inducible mutant gag gene stably transferred into T lymphocytes: an approach to gene therapy against human immunodeficiency virus type 1 infection.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26;91(9):3657-61.

Srinivasakumar N, Schuening FG.

A lentivirus packaging system based on alternative RNA transport mechanisms to express helper and gene transfer vector RNAs and its use to study the requirement of accessory proteins for particle formation and gene delivery.

J Virol. 1999 Nov;73(11):9589-98.

Strayer DS, Branco F, Landre J, BouHamdan M, Shaheen F, Pomerantz RJ.

Combination genetic therapy to inhibit HIV-1.

Mol Ther. 2002 Jan;5(1):33-41.

Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE, Gilboa E.

Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication.

Cell. 1990 Nov 2;63(3):601-8.

Takahashi H, Cohen J, Hosmalin A, Cease KB, Houghten R, Cornette JL, DeLisi C, Moss B, Germain RN, Berzofsky JA.

An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 May;85(9):3105-9.

Tamalet C, Fantini J, Tourres C, Yahi N.

Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes.

AIDS. 2003 Nov 7;17(16):2383-8.

Tamalet C, Lafeuillade A, Fantini J, Poggi C, Yahi N.

Quantification of HIV-1 viral load in lymphoid and blood cells: assessment during four-drug combination therapy.

AIDS. 1997 Jun;11(7):895-901.

Tellam J, Sherritt M, Thomson S, Tellam R, Moss DJ, Burrows SR, Wiertz E, Khanna R.

Targeting of EBNA1 for rapid intracellular degradation overrides the inhibitory effects of the Gly-Ala repeat domain and restores CD8+ T cell recognition.

J Biol Chem. 2001 Sep 7;276(36):33353-60.

Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates.

J Virol. 1989 May;63(5):2118-25.

Tiley LS, Cullen BR.

Structural and functional analysis of the visna virus Rev-response element.

J Virol. 1992 Jun;66(6):3609-15.

Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL
Viral subversion of the immune system.
Annu Rev Immunol. 2000;18:861-926. Review.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Trkola A, Ketas TJ, Nagashima KA, Zhao L, Cilliers T, Morris L, Moore JP, Madden PJ, Olson WC.
Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140.
J Virol. 2001 Jan;75(2):579-88.

Trono D, Feinberg MB, Baltimore D.
HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus.
Cell. 1989 Oct 6;59(1):113-20.

Tuldra A, Fumaz CR, Ferrer MJ, Paredes R, Romeu J, Ruiz L, Bayes R, Clotet B.
Psychological impact of structured treatment interruptions in patients with prolonged undetectable HIV-1 viral loads.
AIDS. 2001 Sep 28;15(14):1904-6.

Unwalla HJ, Li MJ, Kim JD, Li HT, Ehsani A, Alluin J, Rossi JJ.
Negative feedback inhibition of HIV-1 by TAT-inducible expression of siRNA.
Nat Biotechnol. 2004 Dec;22(12):1573-8.

Van Maele B, Debyser Z.
HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins.
AIDS Rev. 2005 Jan-Mar;7(1):26-43. Review.

Venkatesan S, Petrovic A, Van Ryk DI, Locati M, Weissman D, Murphy PM.
Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5Delta 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration.
J Biol Chem. 2002 Jan 18;277(3):2287-301.

von Laer D, Hasselmann S, Hasselmann K.
Impact of gene-modified T cells on HIV infection dynamics.
J Theor Biol. 2006 Jan 7;238(1):60-77.

von Poblotzki A, Wagner R, Niedrig M, Wanner G, Wolf H, Modrow S.
Identification of a region in the Pr55gag-polyprotein essential for HIV-1 particle formation.
Virology. 1993 Apr;193(2):981-5.

Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Ge Y, Kalams SA, Walker BD, Pasternack MS, Luster AD.
Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans.
Nature. 1998 Feb 26;391(6670):908-11.

Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.
Antibody neutralization and escape by HIV-1.
Nature. 2003 Mar 20;422(6929):307-12.

Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al.
Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.
Nature. 1995 Jan 12;373(6510):117-22.

- Weiss A, Stobo JD.
Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line.
J Exp Med. 1984 Nov 1;160(5):1284-99.
- Weiss CD, White JM.
Characterization of stable Chinese hamster ovary cells expressing wild-type, secreted, and glycosylphosphatidylinositol-anchored human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein.
J Virol. 1993 Dec;67(12):7060-6.
- Wensing AM, Boucher CA.
Worldwide transmission of drug-resistant HIV.
AIDS Rev. 2003 Jul-Sep;5(3):140-55. Review.
- Wilk T, Gross I, Gowen BE, Rutten T, de Haas F, Welker R, Krausslich HG, Boulanger P, Fuller SD.
Organization of immature human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. 2001 Jan;75(2):759-71.
- Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strelbel K.
Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4.
J Virol. 1992 Dec;66(12):7193-200.
- Wilson CA, Ng TH, Miller AE.
Evaluation of recommendations for replication-competent retrovirus testing associated with use of retroviral vectors.
Hum Gene Ther. 1997 May 1;8(7):869-74.
- Woffendin C, Ranga U, Yang Z, Xu L, Nabel GJ.
Expression of a protective gene-extends survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 2;93(7):2889-94.
- Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD.
Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia.
Science. 1997 Nov 14;278(5341):1291-5.
- Wrin T, Crawford L, Sawyer L, Weber P, Sheppard HW, Hanson CV.
Neutralizing antibody responses to autologous and heterologous isolates of human immunodeficiency virus.
J Acquir Immune Defic Syndr. 1994 Mar;7(3):211-9.
- Yang AG, Zhang X, Torti F, Chen SY.
Anti-HIV type 1 activity of wild-type and functional defective RANTES intrakine in primary human lymphocytes.
Hum Gene Ther. 1998 Sep 20;9(14):2005-18.
- Yang Y, Jooss KU, Su Q, Ertl HC, Wilson JM.
Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo.
Gene Ther. 1996 Feb;3(2):137-44.
- Yeni PG, Hammer SM, Hirsch MS, Saag MS, Schechter M, Carpenter CC, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JS, Richman DD, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Volberding PA.
Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel.
JAMA. 2004 Jul 14;292(2):251-65.
- Yerly S, Perneger TV, Vora S, Hirscher B, Perrin L.
Decay of cell-associated HIV-1 DNA correlates with residual replication in patients treated during acute HIV-1 infection.
AIDS. 2000 Dec 22;14(18):2805-12.

- Yewdell JW.
Immunology. Hide and seek in the peptidome.
Science. 2003 Sep 5;301(5638):1334-5
- Yin Y, Manoury B, Fahraeus R.
Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1.
Science. 2003 Sep 5;301(5638):1371-4.
- Yu D, Wild CT, Martin DE, Morris-Natschke SL, Chen CH, Allaway GP, Lee KH.
The discovery of a class of novel HIV-1 maturation inhibitors and their potential in the therapy of HIV.
Expert Opin Investig Drugs. 2005 Jun;14(6):681-93.
- Zabransky A, Hunter E, Sakalian M.
Identification of a minimal HIV-1 gag domain sufficient for self-association.
Virology. 2002 Mar 1;294(1):141-50.
- Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, He Y, Vesanan M, Lewin S, Talal A, Racz P, Perelson AS, Korber BT, Markowitz M, Ho DD.
Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy.
N Engl J Med. 1999 May 27;340(21):1605-13.
- Zhu CB, Zhu L, Holz-Smith S, Matthews TJ, Chen CH.
The role of the third beta strand in gp120 conformation and neutralization sensitivity of the HIV-1 primary isolate DH012.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):15227-32.
- Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, Lingappa JR.
Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids.
Nature. 2002 Jan 3;415(6867):88-92.
- Zolotukhin AS, Felber BK.
Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1
Rev.
J Virol. 1999 Jan;73(1):120-7.
- Zolotukhin AS, Valentin A, Pavlakis GN, Felber BK.
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. 1994 Dec;68(12):7944-52.

Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Nachname / Vornamen	Hammer, Diana Stephanie
Adresse	Carl-Thiel-Strasse 9, 93053 Regensburg, Germany
E-mail	diana.hammer@klinik.uni-regensburg.de
Geburtsdatum	18. Februar 1976
Geburtsort	Landsberg am Lech

Promotion

Juli 2002–April 2006	Dissertation zum Thema „Herstellung und Evaluierung transdominant negativ wirksamer Varianten des HIV-1 gruppenspezifischen Antigens, als Basiskomponente einer HIV-1-Gentherapie“ am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. R.Wagner
----------------------	---

Berufserfahrung

April 2001–Juni2002	Wissenschaftlerin bei Geneart GmbH, Regensburg
---------------------	--

Studium

2000 / 2001	Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zum Einfluss Zelltyp-spezifischer Faktoren auf die Inhibition des Rev-abhängigen Kern-Exports HI-viraler RNAs und der Expression HI-viraler Strukturproteine“ am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Ralf Wagner
1998 - 2000	Hauptstudium, Universität Regensburg: Diplomprüfung in den Fächern Medizinische Mikrobiologie, Genetik und Organische Chemie
1995 - 1998	Biologie Grundstudium und Vordiplom, Regensburg

Schulbildung

Juli 1995	Abitur mit den Wahlfächern Biologie (LK), Deutsch (LK), Englisch (GK), Religion (GK)
1986 - 1995	Ignaz-Kögler-Gymnasium (naturwissenschaftlicher Zweig), Landsberg am Lech
1982 - 1986	Grundschule Weil

Fortbildung

Oktober 2002	Forbildungsveranstaltung für Projektleiter gentechnischer Arbeiten und Beauftragte für Biologische Sicherheit nach §§ 15 und 17 Gentechniksicherheitsverordnung
--------------	---

**Angeleitete
Diplomarbeiten**

- 2003 Cand. Dipl. Biotech. (FH) Andrea Unfried :
“ Inhibition der HIV-1 Replikation durchtransdominant-negative HIV-1 Gag-Mutanten: neuartige Ansätze für eine HIV-1 Gentherapie ”
- 2004 Cand. Dipl. Biotech. (FH) Ruth Wittmann :
“ Entwicklung stabiler Zelllinien zur vergleichenden Analyse transdominant -negativer HIV-1 Gag-Mutanten ”
- 2004 Cand. Dipl. Biotech. (FH) Michael Berger :
“ Inhibition der HIV-1 Replikation mit transdominant-negativen Varianten des gruppenspezifischen Antigens (Gag): Herstellung und *in vitro* Validierung innovativer retroviraler Vektoren ”

Publikationen

Poster

- Hammer D., Bojak A., Wolf H. and Wagner R. (2001) Expression of Pr55^{gag} and Pr160^{gagpol} in Rodent Cells: Implications for Multiple Blocks to Human Immunodeficiency Virus Type-1 Replication. Poster presentation; Annual Meeting German society of Virology, Dresden 14.-17.03.2001
- Hammer D., Notka F., Unfried A. and Wagner R. (2003) HIV-1 Replication Inhibited by Inducible Transdominant Negative HIV-1 Gag Mutants. Poster presentation; Annual Meeting German society of Virology, Berlin 26.-29.03.2003
- Hammer D., Notka F., Unfried A. and Wagner R. (2003) Inducible Human Immunodeficiency Virus Type-1 Gag Derivatives Inhibit HIV-1 Replication. Poster presentation; 9th German and 15th Austrian AIDS conference, Hamburg 14.-17.05.2003
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R. (2004) Transdominant Negative HIV-1 Derived Polypeptides for Inhibition of HIV-1 Assembly and Budding; Poster presentation; "Strategies for Immune Therapy" forimmun, Würzburg 29.02.-03.03.2004
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R. (2004) Transdominant HIV-Derived Polypeptides: Negative Interference with Viral Replication; Poster presentation; Annual Meeting German society of Virology, Tübingen 17.-20.03.2004
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R. (2004) Transdominant Negative Gag Mutants with Reduced Immunogenicity Strongly Inhibit HIV-1 Replication. Poster presentation; Keystone Symposium, HIV Pathology/ HIV Vaccines, 13-18.04.2004
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R. (2004) Inducible Transdominant Negative Human Immunodeficiency Virus Type-1 Gag Mutants Inhibit HIV-1 Assembly and Budding. Poster presentation; AIDS Vaccine 2004, Lausanne 30.08.-01.09.2004
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R. (2004) Inducible Transdominant Negative Human Immunodeficiency Virus Type-1 Gag Mutants Inhibit HIV-1 Assembly and Budding. Poster presentation; 12th congress of the European Society of Gene Therapy, Tampere 04.-07.11.2004
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R. (2005) Transdominant Negative HIV Gag Mutants Immunosilent by EBV Glycin-Alanin Fusion. Poster presentation; Annual Meeting German society of Virology, Hannover 16.-19.03.2005

Vorträge

- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R.
Transdominant HIV-derived Polypeptides: Novel Strategies for Negative Interference with Viral Replication. Oral Presentation; 11th annual Meeting of the German Society for Gene Therapy, Frankfurt 30.06.-03.07.2004
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R.
Rendering Transdominant Negative HIV Gag Derivatives Immunosilent by Epstein-Barr-Virus Glycin-Alanin Fusion. Oral Presentation; 10th German and 16th Austrian AIDS Conference, Vienna 01.-04.06.2005
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R.
Impact of a Synthetic Transdominant Negative HIV-1 Gag and the Glycin-Alanin Repeat of EBNA-1 on the Inhibition of HIV-1 Replication and the Survival of Transduced Cells for Gene Therapy Approaches.
Oral Presentation; Annual Meeting German society of Virology, Munich 15.-18.03.2006

Publikationen /Manuskripte:

- Bojak A., Hammer D., Wolf H. and Wagner R. (2002)
Muscle specific versus ubiquitous expression of Gag based HIV-1 DNA vaccines: a comparative analysis. Vaccine.2002 May 6; 20(15):1975-9
- Hammer D., Notka F., Wild J. and Wagner R.
Fusion of EBNA-1 derived Gly-Ala repeat to transdominant negative mutants of the HIV-1 Gag precursor increases inhibitory activities and survival of transduced cells in vivo. (in preparation)
- Hammer D., Notka F., Wittmann R. and Wagner R.
Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication by HIV-Gag-based Minigenes with Minimal Potential Immunogenicity. (in preparation)
- Hammer D., Notka F., Wild J., Wagner R.
Inducible versus constitutive expression of transdominant negative derivatives of the HIV-1 group specific antigen: Impact on inhibition of HIV replication. (in preparation)

Patent Applikation:

- Induzierbare Genexpression (Inducible Genexpression)
DE 10 2004 037 611.5-41
PCT/EP 2005/008427
Hammer D., Notka F., Wagner R.

Danksagung

Prof. Dr. Ralf Wagner danke ich für die Überlassung des Themas, die Finanzierung und Betreuung der Arbeit sowie für die Möglichkeit an Kongressen teilnehmen und meine Arbeit vorstellen zu dürfen. Besonderen Dank auch für das Engagement meine Zukunft betreffend.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Kalbitzer möchte ich mich ferner für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Interesse an meiner Arbeit.

Dr. Frank Notka danke ich für die Einführung in das Gebiet der Gentherapie, seine Diskussionsbereitschaft und sein Engagement im HIV-Gentherapie-Netzwerk.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jens Wild für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei den immunologischen Versuchen, sowie für die Durchsicht der Manuskripte.

Andrea Unfried, Ruth Wittmann und Michael Berger danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen ihrer Diplomarbeiten. Ruth Wittmann darüber hinaus für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke der Arbeitsgruppe Wagner, meinen Laborkollegen und allen Mitarbeitern des Instituts die das Arbeitsklima angenehm gestaltet haben.

Darüber hinaus gilt mein Dank der Geneart GmbH, Dorothee von Laer (GSH, Frankfurt), Frank Nocken und Norbert Dinauer (Fresenius Biotech, Bad Homburg) und allen Beteiligten des HIV-Gentherapie-Netzwerkes für die Bereitstellung von Reagenzien und die anregenden Diskussionen.

Ein besonders lieber Dank geht an meine Eltern. Sie haben mich während des Studiums und der Promotion immer unterstützt und stets an mich geglaubt.

Meinem Mann Christian danke ich für seine Liebe und Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	mikro (10^{-6})
A	Absorption oder Ampere
aa.	Aminosäure (<i>aminoacid</i>)
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ARC	<i>AIDS related complex</i>
ARE	<i>A-rich element</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BFA	Brefeldin A
BGH	Wachstumshormon des Rindes (<i>bovine growth hormone</i>)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytoplasma
CA	Kapsid-Protein (<i>capsid</i>)
ca.	circa

CaP	Calciumphosphat (CaHPO_4^-)
cap	5'-Monomehtylguanosin-Kappe
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CBC	<i>cap binding complex</i> (CBP80/CBP20)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CHX	Cycloheximid
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T-lymphocytes</i>)
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
d	Desoxy
Da	Dalton
DAB	Diaminbenzoid
dam	Methylierungsdefekt in <i>E.coli</i> (<i>dam</i> -Methylase)
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Mod Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E	Effektorzellen (<i>effector cells</i>)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enzym chemolumineszenz</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat (Titriplex III)

ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
Env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERG	Eppendorff Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	é cetera
EtOH	Ethanol
Exc	Extinktion
f	<i>forward</i> (Kurzbezeichnung für einen 5'-Primer)
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gp	Glycoprotein
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HeBs	HEPES <i>buffered saline</i>
HIV-1/2	Humanes Immunschwäche-Virus Typ 1/2
hnRNP	<i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein particle</i>
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Merrettich-Peroxidase)
HWZ	Halbwertszeit
i.A.	in Abhängigkeit
i.d.	intradermal

i.d.R.	in der Regel
i.m.	intramuskulär
i.p.	interperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
IR	<i>inhibitory region</i>
IS	<i>instability sequence</i>
ISS	<i>immunstimulatory sequence</i>
k	kilo
Kana	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
L/l	Liter
LB-	
Medium	Luria Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide (Endotoxin)
Lsg.	Lösung
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Meter oder Milli
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
MAGI	<i>multi nuclear activation of β-galactosidase induction</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
MeOH	Methanol
	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (<i>major-histocompatibility complex</i>)
MHC	

min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MRC	<i>Medical Research Council, UK</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger</i>)
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10^{-9})
N	Nukleus
NaAc	Natriumacetat
NBT	<i>4-Nitro blue tetrazolium chloride</i>
NC	<i>Nucleocapsid</i>
Nef	<i>negative regulator</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NNRTI	nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitoren
NPC	<i>nuclear pore complex</i> (Zellkernporenkomplex)
nt	Nukleotide
NTR	<i>non translated region</i> (untranslatierte Region)
Nup	<i>nuclear pore proteins</i> (Zellkernporenproteine)
O.D.	Optische Dichte
OPD	Orthophenylenediamin-HCl
ori	<i>origin of replication</i>
OT	Objektträger
p	pico (10^{-12})
PABP	<i>Poly(A)-binding protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	DNA-abhängige DNA-Polymerase; 3'-5'-Exonukleaseaktivität
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen in einer Lösung
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
pol	Polymerase
poly(A)	Kurzbezeichnung für polyadenyliertes 3'-Ende von RNA-Transkripten
PR	Protease
Pur	Purinbase (Adenin, Guanin)
Pyr	Pyrimidinbase (Thymin, Cytosin)
r	reverse (Kurzbezeichnung für einen 3'-Primer)
Rev	<i>regulator of expression of viral proteins</i>
RF	Rattenfaktor
Rip/Rab	<i>Rev-interacting protein/Rev-activation domain binding protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkripase
s.k.	subkutan
SA	Spleiß-Akzeptor (3'-Spleißstelle)
SD	Spleiß-Donor (5'-Spleißstelle)
SDS	Sodiumdodecylsulfat

sek	Sekunde
SFC	<i>spot forming cell</i>
SR	<i>arginin/serin-rich non-snRNP splicing factors</i>
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
Strep	Streptavidin
SV40	Simian Virus 40
T	Zielzellen (<i>target cells</i>)
TA	<i>Tibialis anterior</i> (Schienbeinmuskel)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAg	<i>large T-Antigen</i> (T= Transformation)
TAP	Transporterprotein des ERs
TAR	<i>tat activating region</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TB-	
Medium	Terrific Broth-Medium
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TCID	<i>tissue culture infectious dosis</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	T-Helferzellen
TM	Transmembranprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (<i>Tween-Tris Buffered Saline</i>)
TTP	Thymidin-5-Triphosphat
U	Enzymeinheit (Units)
u.a.	unter anderem

u.U.	unter Umständen
ÜN	über Nacht
U-snRNP	<i>uracil-rich small nuclear ribonucleoproteins</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
V3	dritte variable Domäne des äußeren Hüllproteins HIV-gp120 ^{env}
vgl.	Vergleich
Vif	viraler Infektiositätsfaktor
VLP	Virus-ähnlicher Partikel (<i>virus-like particle</i>)
Vol.	Volumen
Vpr	virales Protein R
Vpu	virales Protein U
Vpx	virales Protein X
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organisation</i>)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

DNA Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Tymin
U	Uracil