

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
Der Universität Würzburg
Vorstände: Professor Dr. med. Axel Rethwilm
Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig

Charakterisierung eines foamyviralen Vektorsystems

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius – Maximilians – Universität zu Würzburg

Vorgelegt von
Marco Dressler
aus Brüssel

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Professor Dr. med. Axel Rethwilm
Koreferent: Professor Dr. med. Hartwig Klinker
Dekan: Professor Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt

1. EINLEITUNG	1
1.1. FOAMYVIREN	1
<i>1.1.1. Klassifikation</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2. Biologie von FV</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3. Molekularbiologie</i>	<i>5</i>
1.1.3.1. Aufbau und Genom von PFV	5
1.1.3.2. Replikationszyklus von PFV	8
1.2. RETROVIRALE VEKTOREN	10
<i>1.2.1. Foamyvirale Vektoren</i>	<i>14</i>
<i>1.2.2. Replikationskompetente PFV-Vektoren</i>	<i>14</i>
<i>1.2.3. Replikationsdefiziente PFV-Vektoren</i>	<i>16</i>
<i>1.2.4. Cis-aktive Sequenzen von PFV</i>	<i>17</i>
<i>1.2.5. Der Ausgangsvektor pMH25</i>	<i>19</i>
1.3. ZIELSETZUNG	21
2. MATERIAL UND LÖSUNGEN	22
2.1 MATERIAL	22
<i>2.1.1 Geräte und Materialien</i>	<i>22</i>
<i>2.1.2. Chemikalien</i>	<i>23</i>
<i>2.1.3. Enzyme und Kits</i>	<i>25</i>
<i>2.1.4. Antibiotika</i>	<i>25</i>
<i>2.1.5. Antikörper</i>	<i>25</i>
<i>2.1.6. Oligonukleotide</i>	<i>26</i>
<i>2.1.7. Plasmide</i>	<i>26</i>
<i>2.1.8. Bakterien</i>	<i>27</i>
<i>2.1.9. Zelllinien</i>	<i>27</i>
2.2. LÖSUNGEN UND PUFFER	28
<i>2.2.1. Zellkultur und Viruszucht</i>	<i>28</i>
2.2.1.1 Zellkultur	28
2.1.1.2. Calciumphosphat-Transfektion	29
2.2.1.3 Virustitration	29
2.2.1.4 Polyethylenglykol-Präzipitation	30

2.2.2. Bakterienkultur	30
2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.4. Plasmidisolierung	31
2.2.5. Proteinlysate	32
2.2.6. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	32
2.2.7. Western-Blot	33
2.2.8. FACS-Analyse	34
3. METHODEN	35
3.1. ZELLKULTIVIERUNG UND VEKTORPRÄPARATION	35
3.1.1. Zellkultur	35
3.1.2. Calciumphosphat-Transfektion	35
3.1.3. Gewinnung von Vektorüberstand	36
3.1.4. Transduktion	37
3.1.5. PFV-Titration mit LacZ-Test	37
3.1.6 FACS-Analyse	38
3.1.7. PEG 6000-Präzipitation	38
3.1.8. Anreicherung von Vektorüberstand mittels Zentrifugation	39
3.1.9. Kryoprotektion von Vektorüberstand mittels DMSO	39
3.2. MOLEKULARBIOLOGIE	39
3.2.1. Transformation von Bakterien	39
3.2.2. Plasmid-DNA-Extraktion	40
3.2.3. Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	43
3.2.4. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	44
3.2.5. DNA-Klonierungen	44
3.2.5.1. Restriktionsendonukleasen	44
3.2.5.2. Klenow-Reaktion	45
3.2.5.3. Beseitigung von 3' Überhängen mit Kleno-Enzym	45
3.2.5.4. Beseitigung von 3' Überhängen mit T4-DNA-Polymerase	45
3.2.5.5. Dephosphorylierung von DNA-Enden	46
3.2.5.6. Elution von DNA aus Agarose-Gelen (Genclean III Kit)	46
3.2.5.7. Ligation von linearen DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	47
3.2.5.8. Polymerase Chain Reaction (PCR)	47

3.2.5.9. Sequenzieren von Plasmid-DNA	48
3.2.6. <i>Herstellung von Proteinlysaten</i>	49
3.2.7. <i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)</i>	49
3.2.8. <i>Western-Blot</i>	50
4. ERGEBNISSE	51
4.1. KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES PFV-VEKTORSYSTEMS	51
4.1.1. <i>Klonierung eines PFV-Vektors mit deletierter U3 Region und singulären Klonierungsschnittstellen.</i>	51
4.1.2. <i>Mutation des gag Startkodons</i>	55
4.1.3. <i>Lage der Expressionskassette im Bezug auf die CAS II</i>	60
4.1.4. <i>Evaluation von Deletionen der CAS II</i>	66
4.2. ANREICHERUNG VON PFV-VEKTOREN DURCH ZENTRIFUGATION	70
4.3. LAGERUNG VON PFV-VEKTOREN MIT DMSO BEI -80°C	72
5. DISKUSSION	74
5.1. EIGENSCHAFTEN DES MODIFIZIERTEN PFV-VEKTORSYSTEMS	74
5.2. OPTIMALE LAGE UND GRÖSSE DER CAS II	76
5.3. KONZENTRATION VON PFV-VEKTOREN DURCH ZENTRIFUGATION	80
5.4. LAGERUNG VON PFV-VEKTOREN MIT DMSO BEI -80°C	82
5.5. POTENTIAL FOAMYVIRALER VEKTOREN	83
6. ZUSAMMENFASSUNG	85
7. LITERATUR	87

1. Einleitung

1.1. Foamyviren

1.1.1. Klassifikation

Die Spumaviren, welche auch synonym Foamyviren genannt werden, sind der Familie der Retroviren zugeordnet. Die Familie der Retroviren untergliederte sich ursprünglich in die Genera Onkoviren, Lentiviren und Spumaviren. Nach aktueller Klassifizierung von 2002 werden Lentiviren und die ehemals als Onkoviren zusammengefassten Viren in die Subfamilie der Orthoretroviren eingeteilt. Die Onkoviren wurden in die fünf Genera der Alpha- bis Epsilonretroviren unterteilt. Als neue Subfamilie der Retroviren werden die Spumaviren klassifiziert, da sie sich in wesentlichen Punkten von den Orthoretroviren unterscheiden (Rethwilm, 2003).

Klassifizierung der Familie der Retroviren:

<u>Subfamilie:</u>	<u>Genus:</u>	<u>Beispiel:</u>	<u>Genom:</u>
Orthoretro- virinae	Alpharetroviren	Avian Leukosis Virus (ALV)	einfach
	Betaretroviren	Mouse mammary Tumor virus (MMTV)	einfach
	Gammaretroviren	Murine Leukemia Virus (MuLV)	einfach
	Deltaretroviren	Human T-cell Leukemia Virus (HTLV)	komplex
	Epsilonretroviren	Walleye Dermal Sarcoma Virus (WDSV)	komplex
	Lentiviren	Human Immunodeficiency Virus (HIV)	komplex
Spumaretro- virinae	Foamyviren	Prototype Foamy Virus (PFV)	komplex

Tabelle 1: Taxonomie der Retroviren nach ICTV 2002 (International Committee of the Taxonomy of Viruses).

Das gemeinsame Merkmal der Retroviren besteht in der Fähigkeit genomische RNA durch reverse Transkription in DNA umzuschreiben. Die DNA kann, vermittelt durch die Integrase des Virus, in das Wirtsgenom integrieren.

Die Unterteilung erfolgt in einfache Retroviren, welche lediglich die Gene *gag* (gruppenspezifisches Antigen), *pol* (Polymerase) und *env* (Envelope) besitzen und komplexe Retroviren, welche zusätzliche akzessorische Gene besitzen. Weiterhin kann man zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterscheiden. Exogene Retroviren besitzen alle Informationen für einen Infektionszyklus und können sich horizontal in Organismen verbreiten. Endogene Retroviren sind überwiegend in die Keimbahn des Wirtes integriert und werden in der Regel vertikal verbreitet.

Die Zielorganismen von exogenen Retroviren sind hauptsächlich Wirbeltiere. Die Auswirkungen einer Retrovirusinfektion sind vielseitig und reichen von klinisch inapparenten Infektionen über Immunsuppression des Wirtes bis zu Tumorerkrankungen.

Bestimmte Retroviren haben die Fähigkeit, maligne Tumore zu induzieren. Diese maligne Transformation kann direkt durch im Virus enthaltene Onkogene oder durch bei der Integration des Provirus aktivierte zelluläre Protoonkogene geschehen. Bei Protoonkogenen handelt es sich um wachstumsregulierende Gene. Ein Beispiel für eine tumorinduzierende Wirkung bietet das humane T-Zelleukämie Virus (HTLV-1), ein Deltaretrovirus, dessen *tax* Protein zelluläre Promotoren aktiviert. Dadurch sezerniert die infizierte Zelle übermäßig hohe Mengen an Cytokinen mit nachfolgender Proliferation und maligner Transformation von T-Zellen (Green *et al.*, 1989; Mahieux and Gessain, 2003).

Lentiviren sind Verursacher von chronisch entzündlichen Infektionen. Bekanntester Vertreter ist das humane Immundefizienzvirus (HIV) welches das acquired immune deficiency syndrome (AIDS) durch Befall der T-Helferzellen verursacht. Daneben verursachen Lentiviren auch infektiöse Anämien, Arthritiden oder Enzephalitiden.

In vitro verursachen Spumaviren bei einer infizierten Zellkultur einen starken cytopathischen Effekt durch Syncytienbildung (siehe Abbildung 1). Diese infizierten Zellen sehen schaumartig aus was die Namensgebung begründet.



Abbildung 1: Durch Foamyviren infizierte Zellen in Kultur mit ausgeprägtem cytopathischem Effekt.

Aufgrund einiger Besonderheiten im Replikationsverhalten (siehe 1.1.3.2.) unterscheiden sich Foamyviren signifikant von anderen Retroviren (Linial, 1999; Rethwilm, 1996; Rethwilm, 2003; Yu *et al.*, 1996a), weshalb sie als neue Subfamilie der Retroviren klassifiziert worden sind.

1.1.2. BIOLOGIE VON FV

Die Foamyviren wurden in einer Zellkultur im Jahre 1954 von Enders und Peebles entdeckt und später von Achong aus dem Nasopharynx-Karzinom eines Kenianers isoliert (Achong *et al.*, 1971; Enders and Peebles, 1954). Foamyviren sind auf der Nord- und Südhalbkugel anzutreffen und haben unter den Wirbeltieren ein breites Wirtsspektrum. So konnte durch serologische Studien und Virusisolationen eine Prävalenz von bis zu 70% von Foamyvirusinfektionen in diversen Affenarten gezeigt werden (Bieniasz *et al.*, 1995a). Des Weiteren wurden FV mit hoher Prävalenz in Katzen

(Winkler *et al.*, 1997), Rindern (Johnson *et al.*, 1988) und Pferden (Tobaly-Tapiero *et al.*, 2000) nachgewiesen.

Die Übertragung von FV geschieht vermutlich über Bisse mit Übertragung von Speichel oder Blut (Falcone *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass die Mehrzahl der Proviren latent in dem infizierten Wirt verbleibt (Falcone *et al.*, 2003; Hooks and Gibbs, 1975).

Das von Achong isolierte Virus wurde human foamy virus (HFV) genannt, allerdings blieb der Nachweis dieses Isolates einzigartig. Foamyvirusinfektionen wurden ansonsten nur als Transspeziesinfektion bei Laborpersonal, Tierpflegern oder anderen Berufsgruppen, die mit infiziertem Material nicht menschlicher Primaten in Kontakt gekommen waren, nachgewiesen (Sandstrom *et al.*, 2000; Schweizer *et al.*, 1997). Bei Menschen ist die Prävalenz von Foamyvirusinfektionen ausgesprochen gering, und setzt sich aus den bereits angesprochenen akzidentiellen Infektionen zusammen, so dass kein eigentliches humanes Foamyvirus existiert (Ali *et al.*, 1996; Goepfert *et al.*, 1996; Heneine *et al.*, 1998).

Eine horizontale Transmission bei Infizierten konnte bisher nicht beobachtet werden und die infizierten Patienten sind gesund geblieben. Die Suche nach einer durch FV verursachten Krankheit, besonders auf dem Gebiet der Neuropathologie und Endokrinologie blieb bisher ebenfalls erfolglos (Ali *et al.*, 1996; Linial, 2000; Neumann-Haefelin *et al.*, 1983; Rosener *et al.*, 1996; Sandstrom *et al.*, 2000; Schweizer *et al.*, 1994; Weiss, 1988).

Da das „humane Foamy Virus“ HFV eine sehr enge Homologie zu simian foamy virus chimpanzee (SFV_{cpz}) besitzt, wird vermutet das „HFV“ im Rahmen einer Zoonose lediglich eine Variante des Schimpansen Virus ist (Herchenröder *et al.*, 1994; Linial, 2000; Rethwilm, 1996). Da die bisherigen Untersuchungen keine Beweise für ein tatsächliches „humanes“ Foamy Virus liefern (Switzer and Bhullar, 2004), wird das als vormals humanes Foamy Virus bekannte Virus jetzt als prototypic foamy virus (PFV) bezeichnet (Rethwilm, 2003).

1.1.3. Molekularbiologie

1.1.3.1. Aufbau und Genom von PFV

PFV hat mit 13243 bp das längste provirale Genom aller bekannten Retroviren. Das Genom ist komplex, da es neben den essentiellen gag, pol und env open reading frames (ORFs) über zwei weitere akzessorische ORFs am 3'Ende von env verfügt (Flügel *et al.*, 1987; Herchenröder *et al.*, 1994; Rethwilm, 1996). Die PFV-Partikel sind sphärisch mit einem Durchmesser von 110 nm. Im Inneren befindet sich das aus gag Proteinen (p68/p71) aufgebaute Capsid mit einem Durchmesser von ca. 65 nm. Im Inneren des Capsides ist das Genom eingebettet. Nach aussen wird das Capsid durch eine mit Trimeren von env Proteinen durchsetzte Hüllmembran abgegrenzt (Wilk *et al.*, 2000).

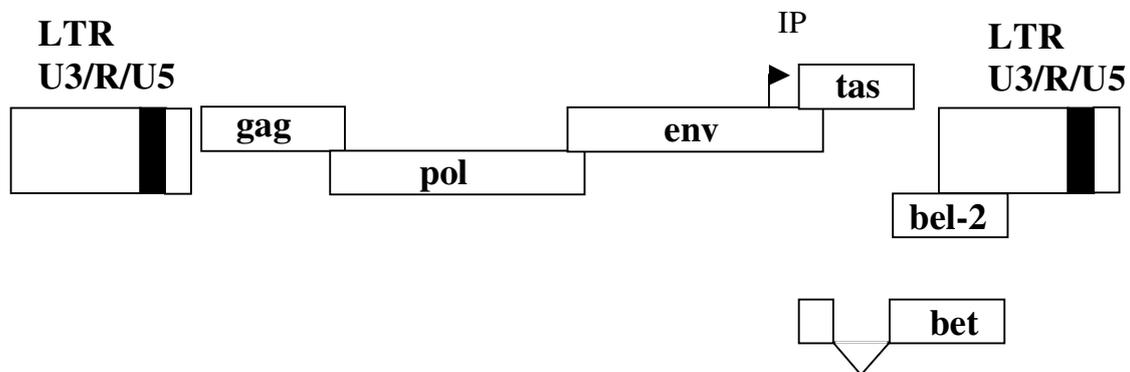


Abbildung 2: Provirales Genom von PFV

Promotoren:

Neben dem U3 LTR-Promotor, über den alle Retroviren verfügen, besitzen Foamyviren einen zweiten Internen Promotor (IP). Das einzige andere Retrovirus bei dem ein zweiter interner Promotor beschrieben wurde, ist das mouse mammary tumor virus (MMTV). Der IP ist im 3' Bereich des env Gens lokalisiert und reguliert die Expression der akzessorischen Proteine Tas und Bet (Löchelt *et al.*, 1993a). Bei einer PFV-Infektion wird zuerst der IP aktiv und so die Expression von Tas ermöglicht (Löchelt *et al.*, 1994).

Der Tas abhängige U3 LTR-Promotor ermöglicht die Synthese der strukturellen Gene und der (prä-)genomischen RNA.

Tas (transcriptional transactivator of spumavirus):

Der erste ORF der akzessorischen Leseraster codiert für das 36kD große Tas-Protein (Rethwilm *et al.*, 1991). Tas aktiviert den U3 LTR-Promotor, welcher ohne Tas nur eine geringe basale Aktivität aufweist (Erlwein and Rethwilm, 1993; Keller *et al.*, 1991), und verstärkt zusätzlich die Aktivität des Internen Promotors vor den akzessorischen Leserastern (He *et al.*, 1996; Herchenröder *et al.*, 1995; Löchelt *et al.*, 1994; Löchelt *et al.*, 1993b; Mergia, 1994; Rethwilm *et al.*, 1991).

Untersuchungen mit Mutationen im Tas ORF haben die essentielle Bedeutung von Tas für die Expression der Strukturproteine und damit die Replikation von FV gezeigt (Baunach *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1998).

Bet:

Der zweite ORF umfaßt Anteile des tas Gens und der 3'LTR. Das Bet-Protein entsteht durch einen alternativen Spleißmechanismus, der die ersten 88 Aminosäuren des tas ORF mit den letzten 390 Aminosäuren des zweiten ORF verbindet (Baunach *et al.*, 1993; Muranyi and Flügel, 1991). Das 60kD Bet-Protein ist für die *in vitro* Replikation nicht essentiell (Baunach *et al.*, 1993; Mergia *et al.*, 1993), jedoch zeigte sich, dass eine bet Deletionsmutante eine Verringerung infektiöser Partikel um den Faktor 10 zur Folge hatte (Yu and Linial, 1993). Bet wird stark in infizierten Zellen exprimiert und ist mit Antikörpern bei infizierten Organismen nachweisbar. Bet ist vorwiegend im Cytoplasma der Zellen lokalisiert und ist nicht in reifen extrazellulären Partikeln zu finden (Lindemann and Rethwilm, 1998). Die Funktion von Bet ist noch nicht abschliessend geklärt, aber Bet scheint die Aktivität des IP zu reduzieren und so der Gegenspieler zu Tas zu sein (Meiering and Linial, 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellen, die Bet exprimieren gegen FV Superinfektion geschützt sind (Bock *et al.*, 1998). In letzter Zeit mehren sich Hinweise, daß Bet eine Funktion analog zum Vif-Protein von HIV hat, also als Antagonist der zellulären Cytosin-Desaminase APOBEC3G durch virale Proteasen wirkt (A. Rethwilm, persönliche Mitteilung).

Gag (gruppenspezifisches Antigen):

Bei Orthoretroviren findet eine Prozessierung der Gag-Proteine durch die virale Protease in Matrix, Capsid und Nucleocapsid nach Verlassen der Wirtszelle statt, was auch als Reifung der Partikel bezeichnet wird. Anders wird bei FV das Gag-Protein als

71kD Vorläuferprotein synthetisiert und von der viralen Protease in ein 68kD und ein 3kD Protein prozessiert (Enssle *et al.*, 1997). Innerhalb der infizierten Zelle kommen p71 und p68 zu gleichen Teilen vor. Die Spaltung des Gag-Proteins ist für die Entstehung infektiöser Partikel essentiell (Enssle *et al.*, 1997).

Am C-Terminus von PFV-Gag sind drei Regionen mit gehäuft Arginin und Glycin vorhanden, die sogenannten GR boxes. Die erste GR box kann DNA und RNA binden, während die zweite ein nukleäres Lokalisationssignal besitzt (Schliephake and Rethwilm, 1994; Yu *et al.*, 1996b). Die Bedeutung der Anreicherung von Gag im Nukleus ist noch unbekannt. Bereiche, die bei Orthoretroviren konserviert sind, wie die major homolog region (MHR) oder die Lysin-Histidin-Boxen in der Nukleokapsidregion fehlen bei FV.

Pol (Polymerase):

Das pol-Gen wird als 127kD Vorläuferprotein translatiert. Dieses Vorläuferprotein wird in ein 85kD großes Protein, welches die Aufgabe von Protease, reverser Transkriptase und Ribonuklease H wahrnimmt und in eine 40kD Integrase gespalten (Netzer *et al.*, 1990; Pfrepper *et al.*, 1998). In Foamyviren wird pol im Gegensatz zu anderen Retroviren nicht als Gag-Pol Fusionsprotein translatiert, sondern als authentisches Protein von einer gespleisssten mRNA (Bodem *et al.*, 1996, Enssle *et al.*, 1996, Löchelt *et al.*, 1996). Es wurde gezeigt, dass Pol und seine Spaltprodukte p40 und p85, aktiv in den Zellkern aufgenommen wird (Imrich *et al.*, 2000; Morozov *et al.*, 1997). Eine weitere Auffälligkeit besteht in der Tatsache, dass die Anwesenheit von genomischer RNA notwendig ist, um Pol in die Partikel zu verpacken (Heinkelein *et al.*, 2002b).

Env (Hüllprotein):

Das 130kD Vorläuferprotein wird in eine 80kD surface (SU), eine 48kD Transmembran (TM) Untereinheit und das 18kD große Leader Peptid aufgespalten. (Lindemann *et al.*, 1997; Lindemann *et al.*, 2001). Alle drei Untereinheiten von env sind integraler Bestandteil des Viruspartikels. Die LP-Untereinheit durchspannt die virale Membran am N-Terminus und die TM Untereinheit am C-Terminus. Im cytoplasmatischen Teil von TM befindet sich ein Endoplasmatisches Retikulum (ER) Retentionssignal (Goepfert *et al.*, 1999; Tobaly-Tapiero *et al.*, 2000). Bei klassischen Retroviren wird

Env in die Plasmamembran lokalisiert. Für FV findet die Knospung von Partikeln mit Hülle und Env-Proteinen auch von intrazellulären Kompartimenten statt (Lindemann *et al.*, 2001). Weiterhin ist bei klassischen Retroviren lediglich Gag für die Partikelfreisetzung notwendig, während FV zusätzlich Env-Protein benötigen (Fischer *et al.*, 1998).

Env-Bet:

Ein 170 kD Protein wurde beschrieben, welches aus einer alternativ gespleissten env mRNA gebildet wird und die surface Untereinheit von env mit dem Bet-Protein beinhaltet (Lindemann and Rethwilm, 1998). Diesem Protein konnte bislang noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden, und für die Replikation von HFV scheint es nicht notwendig zu sein.

1.1.3.2. Replikationszyklus von PFV

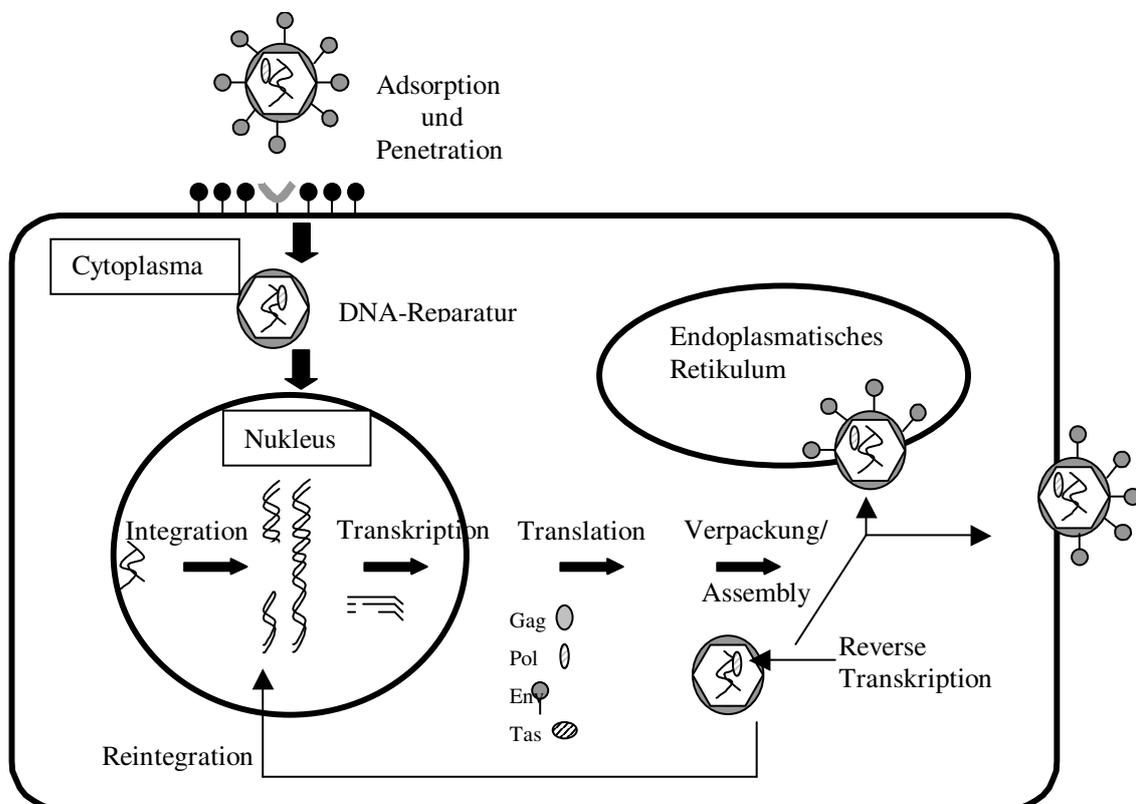


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von PFV. Erläuterungen siehe Text

Der virale Replikationszyklus beginnt definitionsgemäß mit der Infektion der Zielzelle. Der zelluläre Rezeptor, der von PFV zur Penetration benutzt wird, ist nicht bekannt, aber es ist derzeit keine Zelllinie bekannt, die nicht von PFV infiziert werden könnte. Inwieweit FV fähig sind, teilungsfähige Zellen zu infizieren, ist Gegenstand der Diskussion (Bieniasz *et al.*, 1995b; Mergia and Heinkelein, 2003), wobei jüngste Ergebnisse darauf hindeuten, daß terminal differenzierte Zellen durch FV-Vektoren nicht transduziert werden (Trobridge *et al.*, 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass FV-Vektoren bei Fibroblasten vergleichbare Transduktionsraten hatten wie lentivirale Vektoren, allerdings konnten keine sich in der G1/S Phase oder G2 Phase befindlichen Zellen durch FV-Vektoren transduziert werden. Bei Zellen, welche sich in der G0 Phase befanden und mit FV-Vektorüberstand versetzt wurden, liess sich nach Stimulation eine erfolgreiche Transduktion nachweisen. Dies wird auf einen stabilen Transduktions-Zwischenzustand bezogen, der nach Stimulation zur Mitose eine Transduktion möglich macht (Trobridge and Russel, 2004).

Nachdem das Virus an die Zielzelle durch Interaktion des Env-Proteins mit der Zellmembran adsorbiert ist, wird das Capsid mitsamt Genom in die Zielzelle eingebracht. Mittels Mikrotubuli wird das Capsid in Richtung Centrosom der Zelle transportiert (Saib *et al.*, 1997).

Die Foamyviruspartikel enthalten zum Zeitpunkt der Infektion bereits revers transkribierte DNA (Moebes *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1996a; Yu *et al.*, 1999). Dies steht im Gegensatz zu klassischen Retroviren, welche bei Eintritt in die Zielzelle mit der reversen Transkription beginnen. Die DNA wird mittels Integrase in das Genom der Zielzelle eingebracht.

Nach erfolgter Integration betreibt der Interne Promotor, welcher eine höhere Basalaktivität als der U3-Promotor aufweist (Lochelt *et al.*, 1993a), die Transkription von *tas* und *bet*. Das translatierte *Tas*-Protein aktiviert den U3-Promotor unter dessen Kontrolle die (prä-)genomische RNA sowie *gag*, *pol*, *env*, *env-bet*, *tas* und *bet* exprimiert werden.

Das Env-Protein wird in das Endoplasmatische Retikulum sezerniert, während sowohl Gag als auch Pol voneinander unabhängig in den Zellkern transportiert werden. Diese Kernlokalisierung ist für Retroviren ungewöhnlich und die Funktion ist unklar.

Der Zusammenbau der Viruspartikel erfolgt im Cytoplasma. Die Gag-Proteine bilden Capside aus, in welche die (prä-)genomische RNA verpackt wird (Fischer *et al.*, 1998). Auf welchem Weg die Pol-Proteine in die Capside gelangen ist noch unklar. Zu diesem Zeitpunkt beginnt bereits im Capsid die reverse Transkription (Moebes *et al.*, 1997). Die Capside interagieren mit dem im Endoplasmatischen Retikulum (ER) akkumulierten Env-Protein (Goepfert *et al.*, 1999). Wahrscheinlich knospen die Partikel hauptsächlich in das ER und gelangen über intrazelluläre Kompartimente in den extrazellulären Raum. Foamyviren brauchen im Gegensatz zu anderen Retroviren env Expression zur Knospung (Fischer *et al.*, 1998).

Für Foamyviren wurde ähnlich wie bei den Hepadnaviren ein intrazellulärer Replikationsweg gezeigt (Heinkelein *et al.*, 2000a; Heinkelein *et al.*, 2003). Kapside mit (prä-)genomischer RNA, die sich im Cytoplasma aufhalten, können nach reverser Transkription ohne extrazellulären Schritt ihr virales Genom wieder in das Wirtsgenom integrieren. Auf diese Weise können sich multiple integrierte Kopien innerhalb des Genoms einer Wirtszelle ansammeln.

Da sich der Replikationszyklus von Foamyviren in einigen Punkten signifikant von den Orthoretroviren unterscheidet und Elemente von Retrotransposons und Hepadnaviren in sich vereinigt, wurden Foamyviren als eigenständige Subfamilie neben den Orthoretroviren klassifiziert (Rethwilm, 2003).

1.2. Retrovirale Vektoren

Seit dem ersten klinischen Versuch 1990, den angeborenen Adenosindesaminasemangel (Ramsey *et al.*, 1995), mit einem retroviralen Vektor zu heilen, ist das Interesse an Gen Therapie als Heilverfahren für Gen-Defekte, Infektionskrankheiten wie AIDS oder Neoplasien enorm gestiegen.

Eine zentrale Frage der genetischen Therapie ist die Art der Informationsübertragung in die Zielzelle. Es gibt virale Vektoren und Systeme, die nicht auf einem Virus basieren, die sogenannten nichtviralen Vektoren wie zum Beispiel Liposomen und andere DNA-

Komplexe. Die grösste Aufmerksamkeit bei den viralen Vektoren wird derzeit den Retroviren, Adenoviren, Adenovirus-assoziierten Viren und Herpesviren gegeben.

Bei der Anwendung von retroviralen Vektoren wird die Fähigkeit der Integrase genutzt, um Gene dauerhaft in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Retroviren mit einfachem Genom bestehen aus den Genen gag, pol und env sowie nicht kodierenden RNA-Elementen, den sogenannten cis-aktiven Sequenzen, die funktionell für die Replikation benötigt werden. Typische cis-aktive Sequenzen sind z.B. die long terminal repeats (LTRs), welche für die reverse Transkription, Integration und Strukturproteinexpression als Promotor notwendig sind. Weiterhin müssen Verpackungssequenzen auf RNA Ebene vorhanden sein, um zu gewährleisten, daß die genomische RNA des Virus in die Partikel verpackt wird und nicht zelluläre RNA (siehe Abbildung 4). Für die Konstruktion eines retroviralen Vektors ist weiterhin die primer binding site (PBS) sowie der Polypurintrakt (PPT) vor der 3'LTR notwendig für die Initiation der Synthese des DNA plus Stranges.

Bei komplexen Retroviren besteht die Möglichkeit akzessorische Proteine, welche nicht für die Replikation essentiell sind zu deletieren, um Platz für ein therapeutisches Gen zu schaffen. Durch dieses Verfahren entsteht ein replikationskompetenter Vektor. Eine andere Möglichkeit besteht darin die Gene für die Strukturproteine im Vektor zu deletieren und die Strukturproteine durch eine Verpackungszelllinie oder co-transfizierte Expressionsplasmide bereitstellen zu lassen. Die Partikel bestehend aus den Strukturproteinen formieren sich, und nehmen die virale RNA mit enthaltener Verpackungssequenz auf.

Das Vektorpartikel kann einmal eine Zielzelle transduzieren, die genomische RNA revers transkribieren und das DNA-Genom integrieren. Dieses Vorgehen resultiert in einem replikationsdefizienten Vektor, da das Vektorgenom lediglich die Expressionskassette, die Verpackungssequenz und die LTR enthält (siehe Abbildung 4).

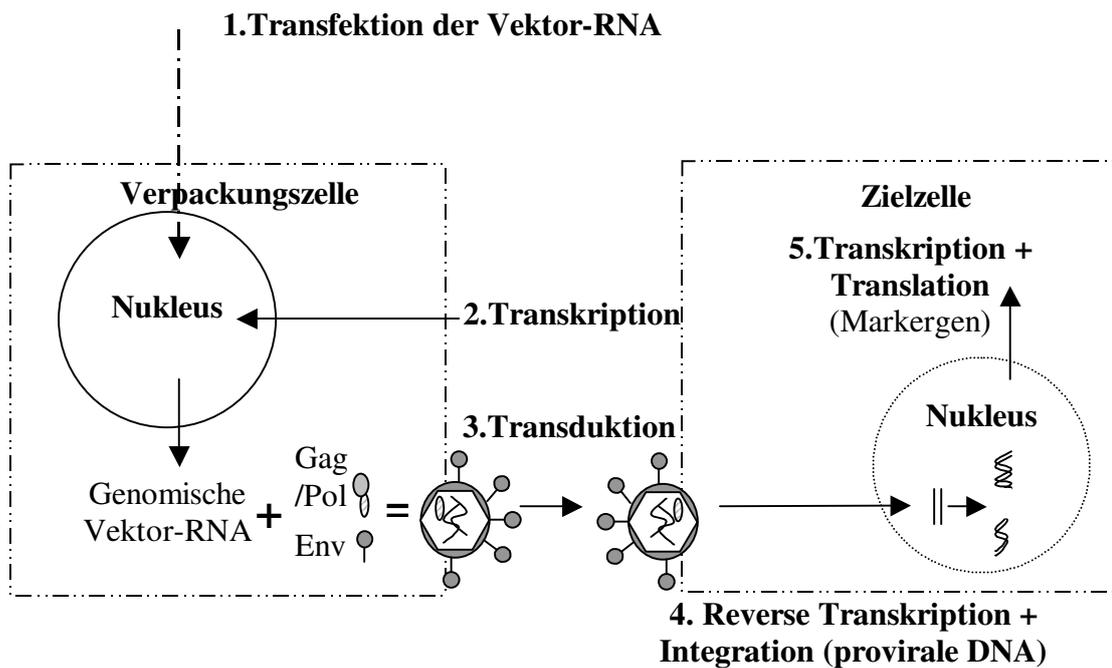
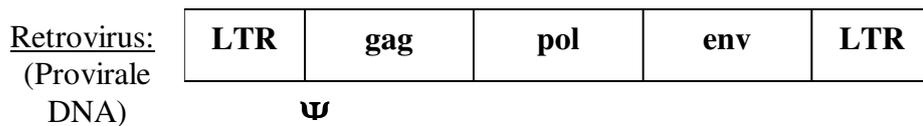


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Genexpression mit einem retroviralen Vektor:

1. Transfektion des Vektors bestehend aus LTR, Verpackungsequenz Ψ und Expressionskassette mit Markergen.
2. Die Vektor-DNA wird im Nukleus transkribiert in RNA. Von der Verpackungszelle wird Gag, Pol und Env hergestellt. Die Verpackungsequenz gewährleistet Verpackung der RNA bei dem Zusammenbau der Vektorpartikel.
3. Die Zielzellen werden mit dem Vektor transduziert.
4. Die genomische RNA wird durch die reverse Transkriptase in dsDNA umgeschrieben und integriert in das Genom des Wirtes.

5. Die integrierte DNA (Expressionskassette mit Markergen) wird durch den zelleigenen Apparat in mRNA transkribiert und dann durch die Ribosomen im Cytoplasma translatiert.

Diese allgemeine Darstellung eines retroviralen Vektors bezieht sich auf Retroviren mit einfachem Genom, und die Verpackungssequenzen variieren bei den unterschiedlichen Viren. Bei komplexen Retroviren, z.B. HIV und PFV, müssen zusätzlich die akzessorischen Proteine und ihre Funktion beim Design eines retroviralen Vektors berücksichtigt werden (vgl. Inder and Nikunj, 1997; Mayors, 1992; Mergia and Heinkelein, 2003). In der schematischen Beschreibung wurde vereinfachend der Begriff der Expressionskassette verwendet. Die Expressionskassette besteht aus dem Markergen und einem internen Promoter, der die Expression des Markergens in der Zielzelle steuert. Der virale LTR Promotor wird bei diesem Ansatz nicht benötigt. Dies stellt aber nur eine von mehreren Möglichkeiten dar die Markergenexpression zu steuern, so kann man das Markergen durch den viralen LTR-Promotor oder durch alternatives Spleissen exprimieren lassen. Weiterhin besteht die Möglichkeit zwei Markergene in den gleichen Vektor einzufügen und das zweite Markergen ebenfalls durch den LTR-Promotor, einen internen Promotor oder eine von Picornaviren stammende interne ribosomale entry site (IRES) steuern zu lassen (vgl. Mayors, 1992).

Die meisten klinischen Versuche mit retroviralen Vektoren basieren derzeit auf von MuLV abgeleiteten Vektoren, einem Betaretrovirus mit einfachem Genom. Bei MuLV-Vektoren können die Strukturgene deletiert werden, die Verpackungssequenz ist in der 5' leader Sequenz der viralen RNA vom Spleissdonor bis zum gag Startkodon lokalisiert (Mann *et al.*, 1983; Mergia and Heinkelein, 2003). In den Strukturgenen deletierte MuLV-Vektoren haben ein Verpackungslimit von ca. 8kb und es können Vektortiter von 10^8 Partikel/ml hergestellt werden. MuLV-Vektoren können eine Vielzahl von Zellen über den amphotropen MuLV-Rezeptor transduzieren. Allerdings besitzen die für gentherapeutische Ansätze wichtigen CD34+ hämatopoetischen Stammzellen nur eine geringe Anzahl an amphotropen MuLV-Rezeptoren, was vergleichsweise schlechte Transduktionsraten bei diesen Zellen zur Folge hat (Orlic, 1996). Um eine größere Breite an Zielzellen transfizieren zu können, werden MuLV-Vektoren mit dem Hüllprotein des vesicular stomatitis Virus G (VSV-G)

pseudotypisiert (Akkina *et al.*, 1996; Burns *et al.*, 1993; Yee *et al.*, 1994). Mit VSV-G pseudotypisierte MuLV-Vektoren gewinnen deutlich an Stabilität und lassen sich zur Konzentration zentrifugieren (Yee *et al.*, 1994). Weiterhin benötigen MuLV-Vektoren für eine erfolgreiche Transduktion Zellen in der Mitose, da sonst die Integration des Vektors nicht stattfinden kann (vgl. Anderson, 1998).

Vielversprechende Resultate sind mit lentiviralen Vektoren erzielt worden. Das am besten charakterisierte Lentivirus ist HIV, es besteht aus den drei Strukturgenen gag, pol und env, sowie sechs akzessorischen Proteinen (Tat, Rev, Vpr, Vpu, Nef und Vif). Das Tat-Protein (transactivator of transcription) ist für die Replikation essentiell und durch eine Deletion von tat kann ein replikationsdefizienter Vektor hergestellt werden. Das Rev-Protein (regulator of expression of virion proteins) ist als posstranskriptionaler Regulator der Genexpression ebenfalls für die Replikation notwendig. Die übrigen akzessorischen Proteine (Vif [viral infectivity factor], Vpr [viral protein Rapid], Vpu [viral protein U], Nef [negative factor]) sind für die Replikation *in vitro* abhängig vom verwendeten Zelltyp nicht unbedingt essentiell und haben eine Bedeutung bei der Pathogenese von HIV. Die Verpackungssequenzen von HIV sind vor dem Spleissdonor und in der leader Region zwischen Spleissdonor und gag-Startkodon lokalisiert. Lentivirale Vektoren haben ein Verpackungslimit von ca. 10kb und es können Vektortiter von 10^9 Partikel/ml hergestellt werden. Als Rezeptor für HIV fungiert CD4. Analog zu MuLV-Vektoren lassen sich HIV-Vektoren mit dem VSV-G pseudotypisieren. Der wesentliche Vorteil von lentiviralen Vektoren ist die Fähigkeit Zellen in der Mitose und ruhende Zellen effektiv zu transduzieren (vgl. Naldini, 1998).

1.2.1. Foamyvirale Vektoren

1.2.2. Replikationskompetente PFV-Vektoren

Man kann Vektorsysteme grundsätzlich in replizierende und nichtreplizierende Systeme unterteilen. Ein replizierendes System enthält alle genetischen Informationen des Virus, welche für die Replikation nötig sind. Bestandteile des viralen Genoms, die nicht essentiell für die Replikation sind, können durch therapeutische Gene ersetzt werden. Ein Nachteil der replizierenden Vektoren ist ihr in Relation zu den

replikationsdefizienten Vektoren größeres Genom und die damit geringere Kapazität für therapeutische Gene. Die replizierenden Vektorsysteme können sich im Wirtsorganismus vermehren und so die Problematik der Herstellung von hohen Vektortitern vermindern, sie stellen aber gleichzeitig für klinische Applikationen ein grösseres Risiko dar.

Von den akzessorischen Proteinen von PFV ist nur Tas essentiell für die Replikation. Mutanten mit Deletion im bel2 ORF haben sich als replikationskompetent erwiesen (Baunach *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Schmidt and Rethwilm, 1995; Yu and Linial, 1993). Demnach waren die ersten replikationskompetenten Vektoren in der bel2 Region deletiert und es konnten Titer von mehr als 10^5 infektiöse Partikel/ml erzielt werden (Schmidt und Rethwilm, 1995). Diese Vektoren haben eine Kapazität von ungefähr 2000 Basen für das therapeutische Gen.

Derzeit wird ein replikationskompetentes FV-Vektorsystem, mit dem Ziel cerebrale Tumoren gezielt zu bekämpfen, im Tiermodell getestet (Nestler *et al.*, 1997). Da Tumorzellen sich rasch teilende Zellen sind, können diese effizient von PFV-Vektoren infiziert werden. Der Vektor enthält als Suizidgen ein Enzym (z.B. purine nucleoside phosphorylase [PNP]), welches eine ungiftige Substanz (prodrug) in eine toxische aktive Substanz umwandeln kann. Gibt man dem Patienten die prodrug systemisch, so wird nur in den infizierten Zellen die toxische aktive Substanz gebildet. Diese selektive Chemotherapie könnte mit erheblich geringeren Nebenwirkungen und grösserem Erfolg als die konventionelle Behandlung behaftet sein.

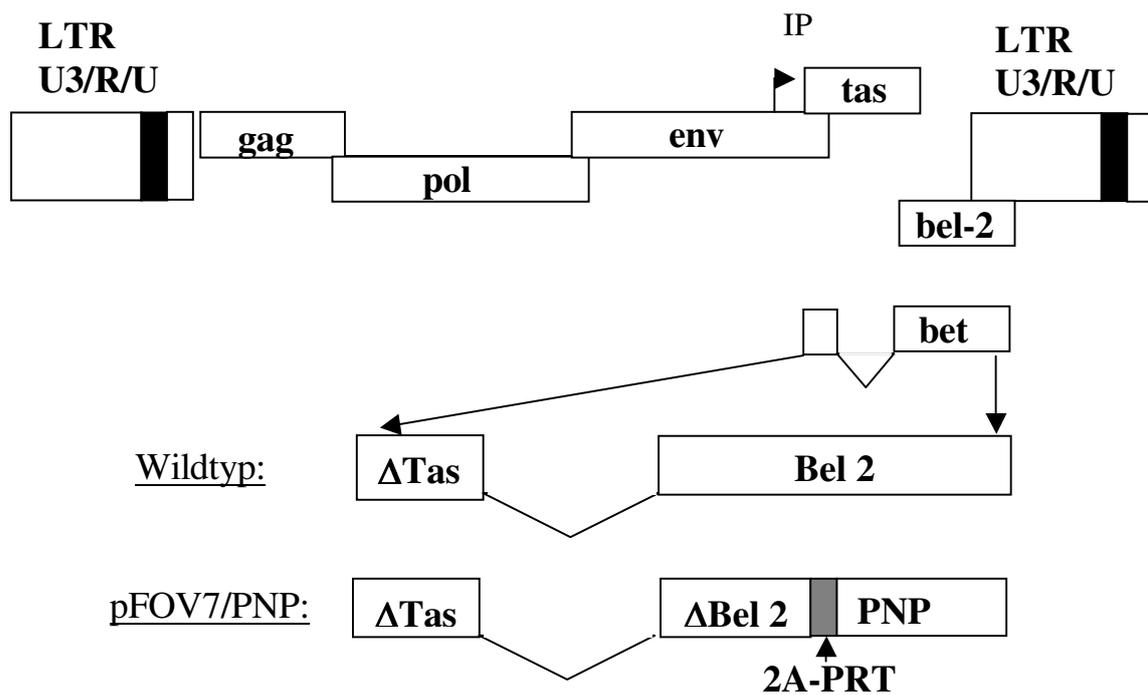


Abbildung 5: Beispiel eines replizierenden PFV-Vektors. Der *bel2* ORF wurde in *pFOV7/PNP* deletiert, und stattdessen wurde das Gen für purine nucleoside phosphorylase (PNP) eingesetzt, ein Enzym welches eine ungiftige prodrug, in diesem Fall β -MePdR in die giftige Wirksubstanz umsetzt. Bei der Expression wird PNP analog zu Bet als Fusionsprotein mit Δ Tas exprimiert. Eine sich selbst spaltende 2A-Proteinase Sequenz spaltet PNP vom Fusionsprotein ab.

1.2.3. Replikationsdefiziente PFV-Vektoren

Unter replikationsdefizienten Vektoren versteht man Vektoren welchen Genomabschnitte fehlen, die essentiell für die Replikation sind. Die Vektorpartikel können Zellen infizieren und ihr therapeutisches Gen einbringen, aber keine Synthese von neuen infektiösen Partikeln bewirken. Da kein weiterer Infektionszyklus folgen kann, wird die unkontrollierte Verbreitung der Vektoren und damit des therapeutischen Gens im Zielorganismus verhindert.

Das akzessorische Tas-Protein ist für die Aktivierung des FV-U3-Promotors verantwortlich und folglich für die Replikation essentiell (Baunach *et al.*, 1993; Mergia and Wu, 1998). Aus diesem Grund wurden Vektoren konstruiert, die im *tas*-ORF deletiert sind. Für die Produktion von Vektorpartikeln kann Tas von einer speziellen

Zelllinie in trans bereitgestellt werden (Bieniasz *et al.*, 1997). Weiterhin kann Tas von replikationskompetenten co-transfizierten Helfer Viren geliefert werden (Erlwein *et al.*, 1998; Hirata *et al.*, 1996; Russell and Miller, 1996). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Tas-abhängigen PFV U3-Promotor in der 5'LTR durch einen konstitutiven Promotor zu ersetzen (Heinkelein *et al.*, 1998; Trobridge and Russell, 1998). Bei der reversen Transkription in doppelsträngige DNA wird die 5' U3-Region wiederhergestellt. Nach Infektion der Zielzelle und Integration des Genoms ist die PFV LTR in Abwesenheit von Tas inaktiv und es werden keine Strukturproteine gebildet. Das Marker-Gen wird über den heterologen internen Promotor unabhängig von der LTR exprimiert. Einen weiteren Vorteil stellt die Abwesenheit von Tas in diesem Vektorsystem dar, was die Gefahr der Entstehung eines replikationskompetenten Virus durch Rekombination senkt (Trobridge and Russell, 1998).

Weiterhin können replikationsdefiziente Vektoren durch Deletion der Strukturproteine vom Vektorgenom hergestellt werden. Die Strukturproteine Gag, Pol und Env werden unabhängig voneinander synthetisiert und können daher separat von Expressionsplasmiden zur Verfügung gestellt werden. Beispielsweise kann ein gag/pol-Expressionsplasmid und ein env-Expressionsplasmid jeweils unter Kontrolle eines CMV-Promotors verwendet werden. Die Expression der Strukturproteine in trans macht den Einbau von wesentlich grösseren therapeutischen Genen ohne Überschreitung des Verpackungslimits möglich.

1.2.4. Cis-aktive Sequenzen von PFV

Für die effiziente und sichere Anwendung von retroviralen Vektoren müssen die für die Replikation notwendigen cis-aktiven Sequenzen (CAS) bekannt und im Vektor enthalten sein. Die CAS sind an entscheidenden Schritten der Virus Replikation beteiligt; so können sie bei der RNA-Dimerisation, der reversen Transkription, Integration, bei der RNA-Verpackung sowie bei der Regulierung der Genexpression (auf Ebene der Transkription und posttranskriptionell) beteiligt sein (Berkowitz *et al.*, 1996; Linial and Miller, 1990).

Für die Konstruktion von retroviralen Vektoren notwendige CAS umfassen die LTR, das packaging Signal Ψ sowie den Polypurin Trakt (PPT). Auch bei FV ist der 5' Teil

der viralen RNA für die Konstruktion von PFV-Vektoren wichtig. Es wurde gezeigt, daß die Region von der RU5 leader Region und Teilen des gag-Gens bis Position 645 (ab Transkriptionsstart der RNA) in der prägenomischen RNA für die Vektorkonstruktion als cis-aktive Sequenz (CAS I) benötigt wird (Erlwein *et al.*, 1997; Heinkelein *et al.*, 1998) .

Vektoren, welche mit dieser CAS I, der 3' LTR sowie dem PPT konstruiert wurden, waren dennoch nicht in der Lage, das Markergen zu transduzieren (Erlwein *et al.*, 1998; Heinkelein *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998), was das Vorhandensein zusätzlicher cis-aktiver Sequenzen nahelegte.

Durch empirische Deletionen konnten für PFV und SFV-1 weitere cis-aktive Sequenzen (CAS II) im 3'Ende des pol-Gens gefunden werden (Erlwein *et al.*, 1998; Heinkelein *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998). Die optimale Länge und Lage der CAS II wird derzeit diskutiert.

Die Notwendigkeit von Sequenzen im pol-Gen ist bisher bei keinem anderen Retrovirus beschrieben worden und die genaue Funktion ist noch unklar. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von CAS II für die Spaltung des Gag-Vorläuferproteins notwendig ist und Auswirkungen auf den RNA Gehalt des Vektorpartikels hat (Heinkelein *et al.*, 1998). Innerhalb der CAS II befindet sich ein zweiter PPT, dessen Funktion noch nicht geklärt ist (vgl. Neumann-Haefelin *et al.*, 1986, Mergia and Heinkelein, 2003).

1.2.5. Der Ausgangsvektor pMH25

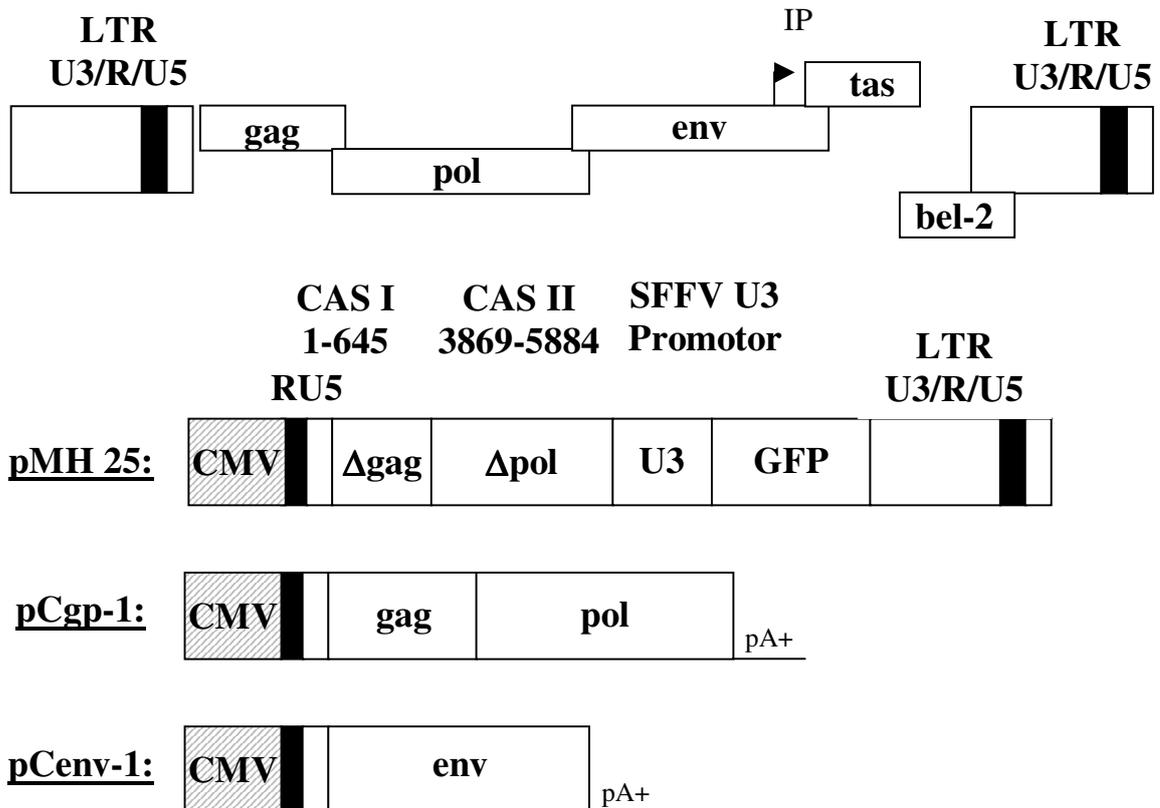


Abbildung 6: PFV Genom mit Ausgangsvektor pMH25 mit Expressionsplasmiden für gag/pol und env. Der mit U3 bezeichnete Promotor der Expressionskassette stammt aus spleen focus forming virus.

Der Ausgangsvektor pMH25 (siehe Abbildung 5, vgl. Heinkelein *et al.*, 1998) stellt einen replikationsdefizienten von tas unabhängigen Vektor dar. Die U3-Region der 5'LTR wurde durch den konstitutiv aktiven Cytomegalie Virus-Promotor (CMV) ersetzt (Kim *et al.*, 1998; Soneoka *et al.*, 1995). Anschließend sind die RU5-Region und Teile des gag ORF bis Position 645 enthalten, entsprechend der CAS I. Ab Position 646 bis 3871 sind sowohl Teile des gag und pol ORFs deletiert. Der Teil des pol ORF von Position 3871 bis 5885 wurde als Maximalvariante der CAS II beschrieben. Der env ORF wurde vollständig deletiert, und es schließt sich direkt die Expressionskassette mit green fluorescent protein (GFP) als Markergen unter Kontrolle des spleen focus forming virus U3-Promotors (SFFVU3) an. Die Expressionskassette wird gefolgt vom Polypurintrakt (PPT) und von der 3' LTR von HSRV2 (Schmidt und Rethwilm., 1997).

Die Strukturproteine Gag, Pol und Env werden von den Expressionsplasmiden pCgp-1 und pCenv-1 bereitgestellt, welche ebenfalls unter Kontrolle eines CMV-Promotors stehen.

1.3. Zielsetzung

Die Intention dieser Arbeit ist das Charakterisieren und Optimieren eines nicht replizierenden PFV-Vektorsystems. Das heisst, das System soll möglichst geringe virale Sequenzen enthalten und gleichzeitig eine möglichst hohe Transduktionsrate erzielen.

Die einzelnen Komponenten des Vektors sollen durch Einführen einer Modulbauweise leicht austauschbar sein. Der Vektor soll selbstinaktivierend sein und keine virale RNA in der Targetzelle exprimieren. Verbleibende virale Leseraster innerhalb der benötigten CAS sollen durch Mutation inaktiviert werden, um eine aberrante Proteinexpression zu vermeiden. Die für den Vektortransfer benötigten CAS sollen analysiert und minimiert werden. Dies beinhaltet das Ermitteln der optimalen Lage der Expressionskassette in Bezug auf die cis-aktiven Sequenzen.

2. Material und Lösungen

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Autoklav	Münchner Medizin Mechanik
Bakterien-Brutschrank	Heraeus
Bakterienschüttler	Certomat
Blot-Filterpapier	Whatman
Blotkammer	Hauswerkstatt
Computer	Apple Macintosh
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammern	Hauswerkstatt
FACScan	Becton & Dickinson
FACS-Röhrchen	Hartenstein
Feinwaage	Sartorius
Filme	Agfa
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Gefrierschrank	Bosch
Groß Zentrifuge	RC5C, Sorvall
Heizblock	Eppendorf & Liebig
Kühlschrank	Bosch
Laborwaage	Vibra
Magnetrührer	Assistent & Variomag
Mikrowelle	Phillips
Neubauer-Zählkammer	GLW
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll
PH-Meter	Ingold
Pipetten	Eppendorf und Gilson
Pipettenspitzen	Hartenstein

Reaktionsgefäße	Eppendorf und Sarstedt
Röntgenfilme	Agfa
Spannungsgerät	Pharmacia und Consort
Spektral-Photometer	LKB & Pharmacia
Sterile Arbeitsbank	Gelaire & Nuaire
Sterilfilter	Millipore
Thermocycler	Perkin Elmer
Thermo-Wasserbad	GFK & Ika
Tischzentrifuge	Eppendorf und Heraeus
UV-Handlampe	Bachofer
UV-Leuchttisch mit Fotografier-Einheit	MWG-Biotech
Vortexer	GLW
Wippe	Hettich
Zell-Brutschrank	Heraeus
Zellmikroskop	Zeiss
Zellkulturflaschen	Nunc
Zellkulturplatten	Costar und Nunc
Zell-Zentrifuge	Hettich
Zentrifugenröhrchen	Greiner

2.1.2. Chemikalien

1- Butanol	Roth
2- Propanol	Applichem
Acetyl-Coenzym A	Merck & Sigma
Acrylamid	Roth
Agar	Difco
Agarose	Gibco
β -Mercaptoethanol	Roth
Bisacrylamid	Roth
Bovine Serum Albumin	Sigma

Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Chloroform	Applichem
DMSO	Roth
DMEM	Gibco
EDTA	Applichem
Ethanol	Applichem
Ethidiumbromid	Roth
Essigsäure	Applichem
Essigsäureethylester	Roth
Fetal Calf Serum	Linaris
Glucose	Roth
Glutamat	Medienküche
Glutaraldehyd	Ferak
Glycerin	Applichem
Glycin	Roth
Hepes	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumferricyanid	Sigma
Kaliumferrocyanid	Sigma
LB-Broth-Base	Gibco
MEM	Medienküche
Methanol	Applichem
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Roth
Natriumbutyrat	Merck
Natriumchlorid	Applichem
Natriumdesoxycholat	Merck
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Sigma
Natriumhydroxid	Ferak
Nukleotide	Boehringer

Polyethylenglykol 6000	Roth
Pepstatin	Roth
RNase- A	Sigma
Salzsäure	Ferak
Tris	Roth
Triton-X 100	Roth
Trockenmilch	Saliter
X-Gal	Sigma

2.1.3. Enzyme und Kits

Calf intestine phosphatase	MBI
Genclean II – Kit	Biorad
Klenow	MBI
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Nucleobond
Powerscript Polymerase	PAN-Systems
Restriktionsenzyme	NEB, MBI und Roche-Boehringer
T4-DNA-Polymerase	MBI
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI

2.1.4. Antibiotika

Ampicillin	Pan-Systems
Geneticin (G418)	Pan-Systems

2.1.5. Antikörper

Gag 011	A. Rethwilm
Swine α Rabbit IGG-HRP	Dako, Dänemark

2.1.6. Oligonukleotide

584 Multiple cloning site (sense) von Gibco BRL:

PTGCGGTAAACATTTAAATGCTAGCTTAATTAAGCGCT

585 Multiple cloning site (antisense) von Gibco BRL:

PCGCAAGCGCTTTAATTAAGCTAGCATTAAATGTAAAC

596 1. Primer für Mutation des gag Startkodons von MWG-Biotech:

TTACTTCCTTAAGCCATTGTCTATTGG

597 1. Primer für Mutation des gag Startkodons von MWG-Biotech:

TTACTTCCTTAAGCCAGTGTCTATTGG

598 1. Primer für Mutation des gag Startkodons von MWG-Biotech:

TTACTTCCTTAAGCCGTTGTCTATTGG

559 2. Primer für rekombinante Mutations-PCR des gag Startkodon von MWG-Biotech:

AACTGCCCCACTTGGCAGTACATCA

2.1.7. Plasmide

Alle PFV-Plasmide basieren auf dem molekularen Klon pHSRV2 (Schmidt und Rethwilm, 1997). Die Nukleotidangaben sind bezogen auf den RNA Transkriptionsstart.

pMH14 (Heinkelein *et al.*, 1998)

PFV-Ausgangsvektor mit SFFV U3 getriebenem GFP Markergen, Δ gag und deletiertem pol und env

pMH71 (M.Heinkelein)

PFV-Vektor mit EGFP Markergen und deletierter U3-Region (mit Deletion von 10262 bis 10820) mit vollständigen gag-und

pMH25 (Heinkelein <i>et al.</i> , 1998)	pol- Genen. PFV-Vektor mit deletierter CASII (Größe 2014 bp, von Position 3871 bis 5885)
pMH29 (Heinkelein <i>et al.</i> , 1998)	PFV-Vektor mit deletierter CASII (Größe 1794 bp von Position 3871 bis 4662 und 4882 bis 5885)
pMH59 (M. Heinkelein)	PFV-Vektor mit undeletiertem gag und pol
pMH60 (M. Heinkelein)	PFV-Vektor mit voller Länge gag und pol sowie gag ATG zu TTG verändert und nachfolgendem Stopcodon
pMH66 (M. Heinkelein)	PFV-Vektor mit deletierter CASII (Größe 2014 bp, von Position 3871 bis 5885)
SFG LacZ (D. Lindemann)	MuLV-Vektor mit nls LacZ als Markergen
pCgp-1 (Fischer <i>et al.</i> , 1998)	Gag/Pol Expressionsplasmid mit CMV Promotor
pCenv-1 (Fischer <i>et al.</i> , 1998)	Env-Expressionsplasmid mit CMV-Promotor

2.1.8. Bakterien

Escherichia coli DH 5 α

Escherichia coli JM 109

2.1.9. Zelllinien

293T: Humane embryonale Nierenzellen, welche stabil SV40 Large T-Antigen exprimieren (Du Bridge *et al.*, 1987)

BHK-21: Hamsternierenfibroblastenzelllinie (Mac Pherson & Stoker, 1962)

HT1080: Humane Fibroblastenzelllinie (Rasheed *et al.*, 1974)

2.2. Lösungen und Puffer

2.2.1. Zellkultur und Viruszucht

2.2.1.1 Zellkultur

ATV

NaCl	80g
KCl	4g
D-Glucose	10g
NaHCO ₃	58g
Trypsin	5g
Versen	2g
H ₂ O	ad 10l

PBS

NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	11,5g
KH ₂ PO ₄	2g
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	1.67g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1g
H ₂ O	ad 10l

MEM komplett 5% FCS

MEM (96.06g / 10l, H ₂ O, Sigma)	500ml
Glutamat 5%	3,5ml
FCS	25ml
Antibiotika Mix	0,6ml

MEM komplett 10% FCS

MEM (96.06g/10l, H ₂ O, Sigma)	500ml
---	-------

Glutamat 5%	3,5ml
FCS	50ml
Antibiotika Mix	0,6ml

Antibiotika-Mix

Penicillin	5g/50ml H ₂ O
Streptomycin	5g/50ml H ₂ O

2.1.1.2. Calciumphosphat-Transfektion

2x HBS

Hepes	50mM
KCl	10mM
D-Glucose	12mM
NaCl	280mM
Na ₂ HPO ₄	1,5mM
PH 7.06	

2.2.1.3 Virustitration

Fixierlösung

Glutaraldehyd	0,5 % in PBS
---------------	--------------

Färbelösung

Kaliumferrocyanid	4mM
Kaliumferricyanid	4mM
Magnesiumchlorid	2mM
X-Gal	0,4mg/ml

X-Gal-Stocklösung

X-Gal	20mg/ml in Dimethyl-Formamid
-------	------------------------------

2.2.1.4 Polyethylenglykol-Präzipitation

PEG 6000 in NTE-Puffer

Tris pH 6.5	10mM
EDTA	1mM
NaCl	100mM
PEG 6000	30g pro 100ml NTE-Puffer
H ₂ O	ad 1l

2.2.2. Bakterienkultur

Antibiotika

Ampicillin-Stocklösung	100mg/ml
------------------------	----------

5x LB-Medium

LB Broth Base	100g
NaCl	25g
Glucose	5g
H ₂ O	ad 1l
Autoklavieren	

LB-Platten

LB Broth Base	10g
Bacto-yeast-extract	5g
Agar	10g
H ₂ O	Ad 1l
Ampicillin	1ml
Autoklavieren, in Platten gießen	
Lagerung bei -40°C	

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

6x Bromphenolblau

Sucrose	40g
Bromphenolblau	0,125g
SDS 10%	1ml
H ₂ O	ad 100ml

50x TAE – Puffer

Tris	242g
Eisessig	57,1ml
EDTA	18,6g
H ₂ O	ad 1l

Ethidiumbromid-Stocklösung

Ethidiumbromid	10mg/ml in H ₂ O
----------------	-----------------------------

2.2.4. Plasmidisolation

Solution I

Glucose	50mM
EDTA	10mM
Tris (pH 8.0)	25mM
Autoklavieren	

Solution II

Natriumhydroxid	0.2N
SDS	1%

Solution III

Natrium-Acetat (pH 5.4)	3M
-------------------------	----

TE/RNase A Lösung

TE	100µl
RNase A	10µl

Tricin	0,5M
SDS	0,5%

Sammelgel

Acrylamid 30%	2,6ml
Bisacrylamid 2%	1,2ml
Gelpuffer	5ml
H ₂ O	11,2ml
TEMED	20µl
Ammoniumpersulfat 10 %	200µl

Trenngel 8 %

Acrylamid 30%	5,4ml
Bisacrylamid 2%	2,4ml
Gelpuffer	6,6ml
Glycerin	2,2ml
H ₂ O	3,4ml
TEMED	20µl
Ammoniumpersulfat 10 %	200µl

2.2.7. Western-Blot

Block-Lösung

Trockenmilch in PBS	4%
---------------------	----

Wasch-Lösung

Tween-20 in PBS	0,5%
-----------------	------

Blotpuffer

Methanol	120mM
Tris	80mM
Glycin	2mM

SDS	100mM
H ₂ O	1,33mg/ml

2.2.8. FACS-Analyse

FACS-Puffer

BSA	0,1%
Natriumazid	0,02%
Rubidiumiodid	2µg/ml
In PBS	

3. Methoden

3.1. Zellkultivierung und Vektorpräparation

3.1.1. Zellkultur

<u>Zelllinie</u>	<u>Kulturmedium</u>
293T	MEM, 10% FCS, 0,01% Glutamat, 120µg/ml PS
BHK – 21	MEM, 5% FCS, 0,01% Glutamat, 120µg/ml PS
HT1080	MEM, 10% FCS, 0,01%, 120µg/ml PS

Die Zelllinien wurden bei 37 °C und unter 5% CO₂ Begasung in Zellkulturflaschen gehalten. Bei Erreichen eines konfluenten Monolayers von Zellen wurden diese mit ATV abgelöst und verdünnt (1:5 bis 1:20) weiterkultiviert.

3.1.2. Calciumphosphat-Transfektion

Die Calciumphosphat-Transfektion dient dazu, Expressionsplasmide in eukaryotische Zellen einzubringen. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass sich Plasmid-DNA an Calciumphosphatkristalle anlagert und mittels Endocytose in die Zellen aufgenommen wird. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen wird das Vektorplasmid mit einem gag/pol Expressionplasmid und einem env Expressionplasmid co-transfiziert. Die Expressionsplasmide stellen die viralen Strukturproteine her. Die Plasmide stehen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, von dem durch Natriumbutyrat eine verstärkte Genexpression induziert wird. Es wurden 293T Zellen transfiziert, welche das SV 40 große T-Antigen stabil exprimieren. Das SV 40 große T-Antigen bindet an den SV 40 origin of replication, welcher sich in sämtlichen verwendeten Expressionsplasmiden befindet und so eine intrazelluläre Plasmid Replikation ermöglicht, die ebenfalls zu verstärkter Genexpression führt. Die Vektoren knospen von den 293T-Zellen in das umgebende Medium und können zur Transduktion auf Zielzellen verwendet werden.

Zeitlicher Ablauf:

- Am Tag vor der Transfektion wurden $1,8 \times 10^6$ 293T Zellen in 6cm Kulturschalen ausgesät.
- Am nächsten Morgen wurde das Kulturmedium abgesaugt und gegen 4ml Medium, das im Brutschrank äquilibriert wurde, ausgetauscht.
- Anschließend wurde der Transfektionsmix hergestellt, mit 500 μ l 2x HBS (ca. 20°C) vermischt und aufgetragen.

Transfektionsmix:

7 μ g DNA von jedem zu transfizierenden Plasmid

50 μ l 2,5M CaCl₂ steril

ad 500 μ l mit H₂O steril

- 8 Stunden nach Transfektionsbeginn wurde die Transfektion durch einen erneuten Mediumwechsel gestoppt.
- 24 Stunden nach Transfektionsbeginn wurde durch Zugabe von 80 μ l Natrium-Butyrat die Aktivität des CMV Promotors stimuliert, um eine verstärkte Expression der Plasmide zu erreichen.
- 8 Stunden später wurde die Induktion durch einen weiteren Mediumwechsel beendet. In den nächsten 24 Stunden erreichte die Expression der transfizierten Plasmide ihren Maximalwert.

Sämtliche Transfektionen wurden mit Positivkontrolle und Negativkontrolle in zweifacher Ausführung durchgeführt.

3.1.3. Gewinnung von Vektorüberstand

Nach der Transfektion befanden sich im Nährmedium der 293T-Zellen gereifte Vektorpartikel. Das Medium wurde durch ein 0,45 μ m Filter gegeben, um Zellen und Zelltrümmer herauszufiltern. Der Vektorüberstand wurde bei 4°C weiterverarbeitet.

Gerfrier-Auftau-Zyklus:

Um eine möglichst hohe Vektorkonzentration zu erreichen, wurden die Kulturschalen nach Ernte des zellfreien Vektorüberstandes wie oben beschrieben mit den transfizierten Zellen und 0,5ml frischem Medium für eine Stunde bei -20°C eingefroren. Anschließend lässt man die Kulturschalen bei Raumtemperatur auftauen und filtriert

den Überstand durch einen 0,45µm Filter. Der Vektorüberstand nach dem Gefrier-Auftau-Zyklus und die zuvor gewonnenen Vektorpartikel aus dem zellfreien Überstand, der auf Eis gelagert wurde, wurden gemischt und konnten zur Transduktion von Zielzellen verwendet werden. Die Methode beruht auf der Vorstellung, dass fertige Vektorpartikel, die noch nicht aus den transfizierten Zellen geknospt sind, durch Aufbrechen der Zellmembran bei dem Einfriervorgang freigesetzt werden.

3.1.4. Transduktion

Es wurden 1×10^4 Zielzellen in einer 12-Napf-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen 4 Stunden im Brutschrank lagerten, wurde der sterilfiltrierte Vektorüberstand auf die Zielzellen gegeben. Nach 48 bis 72 Stunden im Brutschrank waren die Zielzellen mit den Vektoren infiziert, und die Indikatorgen-Expression unter dem SFFV-U3-Promotor hatte ein Maximum erreicht. Die Zielzellen wurden entsprechend dem durchzuführenden Assay weiterverarbeitet.

3.1.5. PFV-Titration mit LacZ-Test

Um Rückschlüsse auf den Vektortiter von Zellüberständen zu erhalten, wurden Vektoren benutzt, die als Indikatorgen das LacZ-Gen mit Kernlokalisierungssignal enthalten. Waren die Zielzellen mit dem Vektor infiziert, konnte durch eine Farbreaktion der enzymatische Umsatz von X-Gal durch LacZ sichtbar gemacht werden. Die positiven Zellen hatten einen blau angefärbten Zellkern unter dem Lichtmikroskop.

- 2×10^4 Zellen wurden in 12-Napf-Platten mit 1ml MEM ausgesät. Nach 4 Stunden waren die Zellen am Napf-Boden adhärent.
- Vektorüberstand wurde in 1ml MEM von 10^{-1} bis 10^{-5} verdünnt auf die Zellen gegeben.
- Nach 48 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Nöpfe mit PBS gewaschen.
- Pro Napf wurde 1ml Fixierlösung (2.2.1.2.) dazugegeben mit anschließender Inkubation für 10 Minuten bei 37°C.

- Die Fixierlösung wurde abgenommen und die Näpfe wurden mit PBS gewaschen.
- Pro Napf wurde 1 ml Färbelösung (2.2.1.2.) zugegeben, danach Inkubation für 4 Stunden bei 37°C.
- Die Zellen mit blaugefärbtem Zellkern wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Vektortiter wurde aus dem Mittelwert der letzten und vorletzten Verdünnungsstufe in der sich LacZ positive Zellen befanden ermittelt, wobei der Verdünnungsfaktor berücksichtigt wurde.

3.1.6 FACS-Analyse

Mit dem fluorescence activated cell sorting (FACS) wurde die Expression von enhanced green fluorescent protein (egfp) in transduzierten Zellen nachgewiesen. Diese Methode erlaubte es, die Anzahl von transduzierten Zellen zu bestimmen, als auch die Effektivität der Expression des Reportergens jeder erfassten Zelle zu quantifizieren. Die erfassten Rohdaten wurden mit der CellQuest Software analysiert.

- Transduzierte Zellen wurden mit 0,5ml ATV pro Napf abgelöst.
- Die Zellen wurden in FACS Röhrchen mit 3ml FACS Puffer (2.2.7.) gegeben.
- Zentrifugation (Hettich Rottanta RPC, 6 Minuten bei 1200 rpm)
- Der Überstand wurde abgeschüttet.
- Die Zellen wurden in 0,5ml FACS Puffer resuspendiert.

3.1.7. PEG 6000-Präzipitation

- 8ml Vektorüberstand wurde sterilfiltriert.
- 0,237ml 5M NaCl wurden zugeben.
- 1,728ml PEG 6000 wurde in NTE Puffer gegeben (2.2.1.4.).
- Der Vektorüberstand wurde 30 Minuten bei 4°C geschwenkt.
- Zentrifugation (Sorvall, SS34 Rotor, 30 Minuten mit 15000g bei 4°C)
- Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 400µl Medium resuspendiert.
- Der Gehalt an Vektorpartikeln wurde mit LacZ-Test bestimmt.

3.1.8. Anreicherung von Vektorüberstand mittels Zentrifugation

- 8 ml Vektorüberstand wurde sterilfiltriert.
- Zentrifugation (Sorvall, SS34 Rotor, 30 Minuten mit 15000g bei 4°C).
- Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde mit 400µl Medium resuspendiert.
- Der Vektorgehalt wurde mittels LacZ-Assay bestimmt.

3.1.9. Kryoprotektion von Vektorüberstand mittels DMSO

- Der Vektorüberstand wurde mit 10% DMSO durch Schwenken vermischt und 0,5ml wurden in Eppendorf-Caps abgefüllt.
- Die Eppendorf-Caps wurden bei -80°C gelagert.

3.2. Molekularbiologie

3.2.1. Transformation von Bakterien

Diese Methode dient der Vermehrung von Plasmid-DNA in Bakterien. In chemisch kompetente Bakterien der Stämme E. Coli DH5α und E. Coli JM109 wurden Plasmide eingebracht und unter Ampicillinselektion inkubiert. Die Plasmide enthielten ein prokaryotisches Ampicillinresistenzgen um zu gewährleisten, dass sich nur plasmidhaltige Bakterien vermehren. Der Stamm DH5α wurde für Ligationsreaktionen verwendet, während der Stamm JM109 für die quantitative DNA-Plasmid-Vermehrung verwendet wurde.

Klassische-Transformation

Diese Methode wurde für die Amplifikation von Ligationsansätzen zur Analyse verwendet.

- Bakterien (DH5α) wurden aus der -80°C-Truhe genommen und tauten im Eisbad auf.
- 100µl Bakteriensuspension wurden mit 0,1µg Plasmid-DNA vermischt.

- Inkubation für 30 Minuten im Eisbad.
- Hitzeschock durch Inkubation von 90 Sekunden im Wasserbad bei 42°C.
- Inkubation für 3 Minuten im Eisbad.
- ad 1ml LB-Medium ohne Ampicillin
- Inkubation für 1 Stunde bei 37°C unter gelegentlichen Schwenken.
- Zentrifugation (Tischzentrifuge, 3 Minuten bei 5000 rpm)
- Der Überstand wurde bis auf 100µl abgenommen.
- Das Pellet wurde resuspendiert und auf 37°C warme LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen.
- Die Platten wurden für 12 Stunden bei 37°C inkubiert bis Kolonien makroskopisch sichtbar wurden.

Quick-Transformation

Die Quick Transformation wurde verwendet zur Transformation von JM109 zur quantitativen Plasmid-Vermehrung und ist wesentlich ineffizienter als die „klassische - Transformation“.

- Bakterien (JM109) wurden aus der -80°C-Truhe genommen und tauten im Eisbad auf.
- 50µl Bakteriensuspension wurde mit 0,5µg Plasmid-DNA vermischt
- Inkubation für 3 Minuten im Eisbad.
- Die Bakterien wurden auf 37°C warme LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen.
- Die Platten wurden für 12 Stunden bei 37°C inkubiert bis Kolonien makroskopisch sichtbar wurden.

3.2.2. Plasmid-DNA-Extraktion

Die verschiedenen Methoden zur Plasmid-DNA-Vermehrung die angewandt wurden, beruhen alle auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Die Bakterien wurden mit NaOH lysiert. Aufgrund des alkalischen Milieus denaturierten bakterielle Proteine, chromosomale DNA und Plasmid DNA. Die alkalische Lyse wurde anschließend mit 3M Natriumacetat abgepuffert. Die bakteriellen

Proteine, sowie die chromosomale DNA präzipitierten aufgrund des hohen Salzgehaltes. Durch Zentrifugation sammelte sich im Überstand die gelöste Plasmid-DNA. Mittels RNase wurde anschließend die bakterielle RNA verdaut.

Sämtliche Präparationen wurden durch mindestens zwei charakteristische Restriktionsendonukleasenreaktionen überprüft.

Mini-Präparation:

Zur Gewinnung kleiner Mengen DNA, die lediglich der Analyse von Ligationen dienen, wurde die Mini-Präparation verwendet. Diese Methode war kostengünstig und man konnte parallel viele Ansätze präparieren. Die hierbei gewonnene Plasmid-DNA war aber aufgrund des Verunreinigungsgrades nicht für Transfektionen geeignet.

- Sterile Zahnstocher wurden mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte in ein Reagenzglas mit 3ml LB Medium und 3µl Ampicillin geben.
- Die Reagenzgläser wurden für 14 Stunden in den Bakterenschüttler bei 37°C und 180rpm geben.
- 1ml Überstand wurde abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 1 Minute bei 13000rpm)
- Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 100µl Solution I resuspendiert.
- Die Reagenzgläser wurden geschüttelt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen.
- 100µl Solution II wurde zugegeben.
- Die Reagenzgläser wurden geschüttelt und 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen.
- 150µl Solution III wurde zugegeben
- Die Reagenzgläser wurden geschüttelt und für 10 Minuten im Eisbad inkubiert.
- Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15 Minuten bei 13000rpm).
- Der Überstand wurde in ein neues Gefäß mit 1ml 100% Ethanol gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.
- Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15 Minuten bei 13000rpm)
- Der Überstand wurde abgekippt und mit 0,5ml 70% Ethanol versetzt, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Zentrifugation (Tischzentrifuge, 7 Minuten bei 13000rpm)

- Der Überstand wurde abgekippt, und das DNA Pellet trocknete für 10 Minuten bei 37°C.
- Die Plasmid-DNA wurde in 50µl TE/RNase A Lösung aufgenommen.

Maxi-Präparation:

Diese Methode wurde verwendet um größere Mengen an DNA zu gewinnen die für Klonierungen und Transfektionen geeignet sind.

- Sterile Zahnstocher wurden mit einer Bakterienkolonie in 150ml LB-Medium mit 150µl Ampicillin für 14 Stunden in einen Bakterienschüttler (37°C, 180 rpm) gegeben.
- Zentrifugation (Sorvall, GS3 Rotor, 8 Minuten bei 5000 rpm)
- Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 5ml Solution I resuspendiert.
- Die Suspension wurde in ein neues Gefäß überführt.
- 30µl RNase A wurde zugegeben und 10 Minuten in das Eisbad gestellt.
- 5ml Solution II wurden zugegeben, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- 10ml Solution III wurden zugegeben, gemischt und 10 Minuten im Eisbad inkubiert.
- Zentrifugation (Sorvall, SS34 Rotor, 30 Minuten bei 17000 rpm, 4°C)
- Der Überstand wurde abgenommen und über Gazefilter in neues Gefäß mit 12ml Isopropanol gegeben
- Zentrifugation (Hettich Rottanta RPC, 30 Minuten bei 4000 rpm, 4°C)
- Das Pellet wurde mit 10ml 70% Ethanol gewaschen.
- Zentrifugation (Hettich Rottanta RPC, 30 Minuten bei 4000 rpm)
- Das Pellet wurde mit 1ml H₂O und 5µl RNase A resuspendiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.
- Der Ansatz wurde mit 0,9ml Phenol extrahiert.
- Der Ansatz wurde zweimal mit 0,9ml Chloroform extrahiert.
- Es wurden 90µl Solution III und 560µl Isopropanol zugegeben.
- Zentrifugation (Tischzentrifuge, für 10 Minuten bei 14000 rpm)
- Das Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol gewaschen.

- Das Pellet trocknete für 15 Minuten und wurde in 0,3ml H₂O bidest. aufgenommen.

Präparation über Quiagen-Säulen:

Die Plasmid-DNA wurde hierbei an eine Silicamatrix gebunden und nach 2 Waschschrinen aus der Matrix eluiert. Diese Methode lieferte DNA mit einem hohen Reinheitsgrad und wurde deshalb für die Präparation von Vektorplasmiden zur Transfektion verwendet.

- Sterile Zahnstocher wurden mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte in ein Reagenzglas mit 150ml LB Medium und 150µl Ampicillin gegeben.
- Zentrifugation (Sorvall, GS3 Rotor, 8 Minuten bei 5000 rpm).
- Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 10ml Puffer P1 resuspendiert.
- Die Suspension wurde in ein neues Gefäß überführt.
- 10ml Puffer P2 wurden zugegeben, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- 10ml Puffer P3 wurden zugegeben, gemischt und für 10 Minuten im Eisbad inkubiert.
- Zentrifugation (Sorvall, SS34 Rotor, 30 Minuten bei 17000 rpm, 4°C)
- Der Überstand wurde auf die mit 10ml QBT Puffer equilibrierte Säule gegeben.
- Die Säule wurde zweimal mit 30ml Waschpuffer QC gewaschen.
- Die DNA wurde in ein neues Gefäß mit 15ml Elutionspuffer QF eluiert.
- Mit 10ml Isopropanol wurde die DNA präzipitiert.
- Zentrifugation (Hettich Rottanta RPC, für 30 Minuten bei 4000 rpm, 4°C)
- Das Pellet wurde mit 5ml 70% Ethanol gewaschen und trocknete für 10 Minuten.
- Die DNA wurde in 300µl H₂O bidest. aufgenommen und quantifiziert.

3.2.3. Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von wässrigen DNA Lösungen läßt sich mit einem Spektrophotometer bestimmen. Hierbei wurde die Extinktion einer Probe bei der Wellenlänge 260nm bestimmt.

Bei der Messung entspricht eine OD Einheit (OD = optical density) 40µg/ml dsDNA, beziehungsweise 20µg/ml RNA. In der Regel wurden die Proben 1:200 in H₂O verdünnt und nach dem H₂O-Nullwert-Abgleich vermessen. Die DNA-Konzentration berechnet sich nach folgender Gleichung:

OD-Wert x Verdünnungsfaktor x Extinktionsfaktor (40 für DNA, 20 für RNA) = x µg/ml.

Da auch andere Verbindungen Licht dieser Wellenlänge absorbieren, wurde die Probe auch bei einer Wellenlänge von 280nm vermessen. Für reine DNA sollte der Quotient aus den beiden Meßwerten im Bereich zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

3.2.4. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach ihrer Größe auf Agarose-Gel aufgetrennt. Die Menge an Agarose variierte zwischen 0,5 und 2,5%, in Abhängigkeit der Größe der zu trennenden Fragmente. Ethidiumbromid kann DNA durch Anlagerung bei Licht von 365nm sichtbar machen.

Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 100ml TAE Puffer in der Mikrowelle zum Sieden gebracht und anschließend auf 50°C abgekühlt. 10µl Ethidiumbromid wurden zugegeben und das Gel in eine Kammer gegossen. Die DNA in BPB-Puffer wurde bei 15 bis 90V mit TAE-Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenreferenz wurde Lambda-DNA mit Hind III oder Pst I verdaut benutzt. Nach 1 bis 12 Stunden wurde das Gel durch Photographie dokumentiert oder unter der UV-Handlampe ausgeschnitten.

3.2.5. DNA-Klonierungen

3.2.5.1. Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten bestimmte Basenfolgen nach einem spezifischen Schnittmuster. Die Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern und entsprechend den Angaben der Hersteller verwendet. Bei Einsatz von multiplen Restriktionsenzymen wurde ein passender Puffer nach den Tabellen der Hersteller ausgewählt. Waren die Enzyme in einem Puffer inkompatibel, so wurde der Restriktionsverdau sequentiell durchgeführt.

Präparative Spaltungen wurden mit 3 bis 5µg DNA in 50µl durchgeführt. Um eine möglichst effektive Reaktion zu gewährleisten, wurde das Restriktionsenzym in 3 bis 5 fachem Überschuss zugegeben und der Ansatz für bis zu 12 Stunden inkubiert. Analytische Spaltungen werden mit 1µg DNA in 20µl durchgeführt und mindestens für 2 Stunden inkubiert. Die Spaltungen werden mittels Gelelektrophorese überprüft.

3.2.5.2. Klenow-Reaktion

Nach einem Restriktionsverdau können einzelsträngige 5' DNA-Enden entstehen, die mittels Klenow-Enzym und Nukleotiden zum stumpfen Doppelstrangende aufgefüllt werden können.

2µl Klenow-Enzym (5 U/µl) und 1/50 Volumen phosphorylierter Desoxyribonukleotide (dNTP) (10 mM) wurden für einen 5µg DNA-Ansatz verwendet. Auf den Klenow-Enzypuffer konnte verzichtet werden, da die Klenow Reaktion in jedem Restriktionsenzypuffer mit hoher Aktivität ablaufen kann. Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Denaturierung des Enzyms bei 75°C für 10 Minuten beendet.

3.2.5.3. Beseitigung von 3' Überhängen mit Kleno-Enzym

3' Überhänge können mit Klenow-Reaktion nicht aufgefüllt werden. Das Klenow-Enzym kann in Abwesenheit von Nukleotiden als Exonuklease agieren und die 3' Überhänge entfernen. Es wurde 2µl Klenow-Enzym (5U/µl) für 5µg DNA verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 75°C für 10 Minuten denaturiert.

3.2.5.4. Beseitigung von 3' Überhängen mit T4-DNA-Polymerase

Für die Entfernung von 3' Überhängen mit T4-DNA-Polymerase zu entfernen, wurde für 5µg DNA 1µl T4-DNA-Polymerase (6 U/µl) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei 12°C für 20 Minuten inkubiert, und dann bei 75°C für 20 Minuten inaktiviert.

3.2.5.5. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Fragmente von DNA, die mittels Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können bei einer Ligation reagieren falls religierbare Schnittstellen entstehen. Notwendig für eine Ligation ist die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung, deren integraler Bestandteil die Phosphatgruppe am 5' DNA-Ende ist. Calf intestine phosphatase (CIP) entfernt die 5' Phosphatgruppen am DNA-Doppelstrang und verhindert so eine Ligation. Die CIP-Reaktion wurde nach einem Restriktionsverdau in dem Restriktionsenzym-puffer durchgeführt, da alle verwendeten Puffer eine hohe Aktivität der CIP gewährleisten. Für eine DNA-Menge von 5 µg wurden 2 µl CIP (5U/µl) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die CIP bei 75°C für 10 Minuten denaturiert.

3.2.5.6. Elution von DNA aus Agarose-Gelen (Genclean III Kit)

Das Genclean Kit von der Firma Bio101 dient der Isolierung von DNA von mehr als 200 bp Größe aus Agarose-Gelen.

Glasmilch kann DNA selektiv bei bestimmten Bedingungen reversibel binden. Da sich die Glasmilchpartikel durch ihre hohe Dichte leicht zentrifugieren lassen, geht die DNA bei den Waschschritten nicht verloren und kann schließlich in H₂O aufgenommen werden, wobei die DNA von der Glasmilch eluiert wird.

- Die ausgeschnittene Bande wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben.
- 1ml Natriumiodid wurde zugegeben und für 10 min bei 55°C inkubiert.
- 10µl Glasmilch wurden zugegeben und vermischt.
- Inkubation des Reaktionsansatzes für 10 min auf Eis.
- Zentrifugation (Tischzentrifuge, 1 Minute bei 13000rpm)
- Der Überstand wurde abgekippt.
- Es wurde dreimal mit new-wash-Puffer gewaschen, anschließend wurde das Pellet getrocknet.
- Das Glasmilch Pellet wurde in 10µl H₂O resuspendiert.
- Inkubation des Reaktionsansatzes für 5min bei 55°C.
- Zentrifugation (Tischzentrifuge, 1 Minute bei 13000rpm)
- Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.5.7. Ligation von linearen DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die Ligrationsreaktion wurde benutzt, um lineare DNA Fragmente zu verbinden. Die Fragmente müssen komplementäre Überhänge aufweisen oder stumpf sein. Weiterhin muss eines der Fragmente im Regelfall das Kleinere der zu ligierenden DNA-Fragmente eine Phosphatgruppe aufweisen.

- Bei einem Reaktionsvolumen von 20µl wurde das Kleinere der zu ligierenden DNA-Fragmente in 2-3 fachem Überschuss dem Grösseren der zu ligierenden DNA-Fragmente zugegeben.
- Zugabe von 2µl Ligationspuffer.
- Zugabe von 2µl T4 DNA-Ligase (10U/µl).
- H₂O steril ad 20µl
- Inkubation für 12 h bei 14°C

3.2.5.8. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR dient zur in vitro Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Es werden mehrere Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation wiederholt. In der Denaturierungsphase wird die Matrize durch Hitze in Einzelstränge reversibel getrennt. Oligonukleotide (Primer) welche komplementär zu der Matrize sind, lagern sich an diese an (Annealing). Eine hitzebeständige Polymerase kann an diesen Primern Nukleotide, entsprechend der DNA-Vorlage, anfügen (Elongation). Jeder Zyklus zieht einen exponentiellen Anstieg der amplifizierten DNA-Abschnitte nach sich. Mit der Verwendung von mutagenen Primern, welche am 5'Ende nicht komplementär zu der Matrize sind, lassen sich Mutationen in die Produkte einbauen.

Reaktionsansatz:

0,1µg Plasmid
 30pmol von jedem Primer
 2µl 10 mM dNTP Mix
 1µl PWO (5U/µl)
 10µl 10x PWO PCR Puffer

Programm:

30s 94 °C Denaturierung
 60s 50°C Annealing
 120s 72 Elongation
 35 Zyklen

ad 100µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt und mit 2 Tropfen Mineralöl vor Verdampfen gesichert. Die präparativen PCR Produkte wurden anschließend mit Restriktionsenzymen behandelt und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Mit dem Genclean III Kit wurden die PCR Produkte gereinigt. Sämtliche auf PCR Produkten basierende Klonierungen wurden mittels Sequenzierung über die gesamte Fragmentlänge überprüft.

3.2.5.9. Sequenzieren von Plasmid-DNA

DNA-Sequenzen wurden mit dem Kapillarsequenzierer ABI PRISM 310 ermittelt, welcher die unterschiedliche Fluoreszenz der markierten Nukleotide detektiert. Der gewünschte Bereich, welcher sequenziert werden soll, wird durch die geeignete Wahl eines Primers für die Sequenzierreaktion gewählt. Die Nukleotide, welche bei der Sequenzierreaktion eingebaut werden, sind spezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Im Kapillarsequenzierer werden die Produkte der Sequenzierreaktion über eine Matrix aufgetrennt und die Abfolge der Nukleotide anhand ihrer Fluoreszenz bestimmt. Die weitere Bearbeitung der Daten oder ein Sequenzvergleich erfolgt in Computerprogrammen (z.B. DNA-Strider).

Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion:

500µg Plasmid DNA

10pmol Primer

2µl Big Dye Reaktionsmix

H₂O ad 10µl

Die Reaktion wurde in einem PE 9600 Thermocycler über 25 Zyklen (10 Minuten 96°C, 5 Minuten 50°C und 4 Sekunden 60°C) durchgeführt.

Fällen der Produkte der Sequenzierreaktion:

Die 10µl Sequenzier-Ansatz wurden mit 90µl H₂O und 10µl 3M Natriumacetat pH 5,2 versetzt. Anschließend wurde der Mix zweimal mit Ethanol 70% gewaschen. Das

trockene Pellet wurde dann mit 20µl TSR Puffer resuspendiert und für 2 Sekunden bei 94°C denaturiert. Bis zur Sequenzanalyse Lagerung bei 4 °C.

3.2.6. Herstellung von Proteinlysaten

Zur Analyse der Proteinexpression eukaryotischer Zellen muss man zunächst die Proteine isolieren. Da bei der Zellyse Proteinase freigesetzt werden, wurde auf Eis gearbeitet, um den Einsatz von Proteinaseinhibitoren zu vermeiden. Die Mengenangaben beziehen sich auf je eine 6cm Zellplatte.

- Das Medium der transfizierten Zellen wurde abgesaugt und mit 3ml PBS gewaschen.
- Es wurde 1ml kalter RIPA Puffer zugegeben.
- Inkubation auf Eis für 10 Minuten unter Schwenken.
- 400µl 2x PPP wurden in neues Reaktionsgefäß vorgelegt.
- 400µl des Zellysates wurden in das Gefäß mit 2x PPP überführt.
- Denaturierung im Wasserbad bei 94°C für 7 Minuten

Die Lysate konnten bei -70°C dauerhaft, oder bei -20°C kurzzeitig gelagert werden.

3.2.7. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Tricin-SDS Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Der optimale Trennungsbereich hängt von der Porengröße des Gels ab und wird durch die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt. Um Proteine zwischen 50 und 120kD aufzutrennen wird ein Gel mit 8% Acrylamid verwendet (2.2.6.).

Die Polymerisation des Trenngels wird durch den Radikalbildner Ammoniumpersulfat unter Katalyse von TEMED eingeleitet. Das noch flüssige Gel wurde in eine Kammer gegossen. Nach 1 Stunde war die Polymerisation abgeschlossen. Die Polymerisation des Sammelgels wurde ebenfalls durch Ammoniumpersulfat und TEMED eingeleitet und anschliessend über das Trenngel in die Kammer gegossen. Nach einer weiteren Stunde wurden der Kathodenpuffer und der Anodenpuffer eingefüllt. Die Proteinproben wurden für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Parallel zu den Proben

wurde als Größenreferenz 10µl Rainbowmarker aufgetragen. Der Trennvorgang war bei 35mA nach 12 Stunden abgeschlossen.

3.2.8. Western-Blot

Dieses Verfahren dient der selektiven Darstellung von Proteinen mittels Antikörpern. Als Ausgangsmaterial dient ein SDS Polyacrylamidgel nach abgeschlossener Elektrophorese. Die Proteine des Gels werden auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Ein spezifischer Primärantikörper bindet direkt an das zu untersuchende Protein. Ein Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist und mit einer Peroxidas gekoppelt ist, kann eine Lichtreaktion auslösen. Die Banden werden anschliessend auf Röntgenfilm sichtbar gemacht und dokumentiert.

Die Proteine wurden in einer Blotkammer für 2 Stunden bei 150mA auf Nitrozellulosemembran überführt. Auf der Nitrozellulosemembran kann man die Banden des Rainbowmarkers sehen. Dieser Marker wurde abgezeichnet für den Größenvergleich auf dem Röntgenfilm. Die Membran wurde mit Waschlösung (2.2.7) behandelt und anschließend für 1 Stunde in Blocklösung (2.2.7.) gegeben. Dadurch sollen unspezifische Bindungen auf der Membran durch Milchproteine abgesättigt werden. Nachdem die Membran dreimal mit Waschlösung behandelt worden ist, wurde der Primärantikörper in verdünnter Blocklösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur aufgebracht. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in Waschlösung geschwenkt. Der zweite Antikörper ist gegen den Fc-Anteil des Primärantikörpers gerichtet, und durch eine Peroxidase markiert. Der Sekundärantikörper wurde in verdünnter Blocklösung für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen. Nun wurde die Membran auf eine Glasplatte befestigt und mit 1,5ml ECL I Reagenz und 1,5ml ECL II Reagenz behandelt. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers oxidiert den in den ECL Reagenzien enthaltenen Farbstoff Luminol unter Lichtemission. Mit Hilfe einer Röntgenkassette konnte in einer Dunkelkammer ein Abbild der Membran angefertigt werden. Zum Abschluss wurden die Markierungen des Rainbowmarkers auf den entwickelten Röntgenfilm übertragen.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung und Charakterisierung des PFV-Vektorsystems

4.1.1. Klonierung eines PFV-Vektors mit deletierter U3 Region und singulären Klonierungsschnittstellen.

Die verwendeten Vektoren basieren auf pHSRV2 (Schmidt *und Rethwilm*, 1997), und die Nukleotidangaben beziehen sich auf den RNA Transkriptionsstart von pHSRV2. Obwohl der Ausgangsvektor pMH25 (siehe 1.2.5.) kein Tas Protein exprimiert und somit replikationsdefizient ist (Baunach *et al.*, 1993; Mergia and Wu, 1998), wird die 5'U3-Region, und damit der Promotor, im Rahmen der reversen Transkription wiederhergestellt. Nach erfolgter Integration der Vektor-DNA in das Genom der Zielzelle, kann das Vektorgenom in der Zielzelle zwar nicht effizient transkribiert werden, da der U3-Promotor Tas als Aktivator braucht, während das Fremdgen durch den SFFU3-Promotor unabhängig transkribiert werden kann. Eine potentielle Aktivierung des U3-Promotors durch Transkriptionsfaktoren der Zielzelle ist jedoch theoretisch möglich. Um die Möglichkeit einer unkontrollierten Vektortranskription sicher auszuschalten sowie um das Verpackungslimit des Vektors zu steigern, wurde in der U3-Region eine interne Deletion von 558 bp vorgenommen, welche die TATA box und die TAS responsiven Elemente beinhaltet (Heinkelein *et al.*, 2002a; Park *et al.*, 2002; Trobridge *et al.*, 2002). Da sich die U3-Region von pMH25 von pHSRV2 herleitet, stellt sie bereits eine Deletionsvariante dar. Die U3-Region von pHSRV2 unterscheidet sich gegenüber der vom wildtypischen PFV um 646 bp (Heinkelein *et al.*, 2002a; Schmidt und Rethwilm, 1997). Aus diesem Grund beläuft sich die gesamte Deletion gegenüber PFV auf 1204 bp.

Als erster Schritt zur Entwicklung und Analyse eines verbesserten PFV-Vektorsystems wurde der Vektor pMH100 hergestellt.

Klonierung von pMH100:

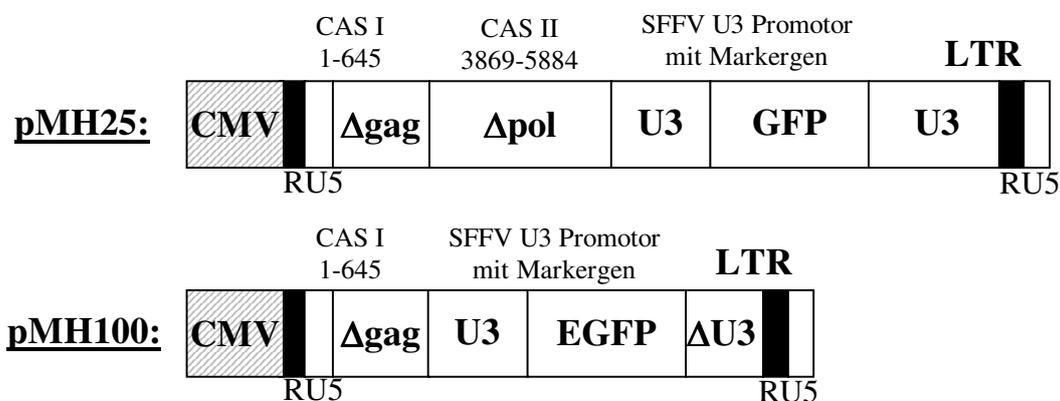


Abbildung 7: pMH100 im Vergleich zum Ausgangsvektor pMH25.

PMH71 (siehe 2.1.7.) wurde mit *Sna*I und *Asc*I verdaut, und der Vektor mit 6594 bp wurde mit dem 1290 bp grossen Fragment von pMH14 (siehe 2.1.7.) ebenfalls mit *Sna*I und *Asc*I verdaut, ligiert.

Der resultierende Vektor pMH100 weist im Vergleich zu pMH25 die deletierte U3-Region auf, und hat als Markergen statt *gfp* enhancend green fluorescent protein (*egfp*). Die CAS II wurde herausgeschnitten um im nächsten Schritt Klonierungsschnittstellen einzubauen.

Einführung von Klonierungsschnittstellen

Um einzelne Elemente des Vektors mühelos auszutauschen, wurde eine multiple cloning site (MCS) mit mehreren singulären Restriktionsenzym-schnittstellen in den Vektor vor die Expressionskassette eingebracht. Diese Modulbauweise ist von Vorteil, da aufwendige Klonierungen, um z.B. lediglich die Expressionskassette auszutauschen, durch mehrere singuläre Restriktionsenzym-schnittstellen nach den einzelnen Modulen, vermieden werden können.

Klonierung von pMD1:

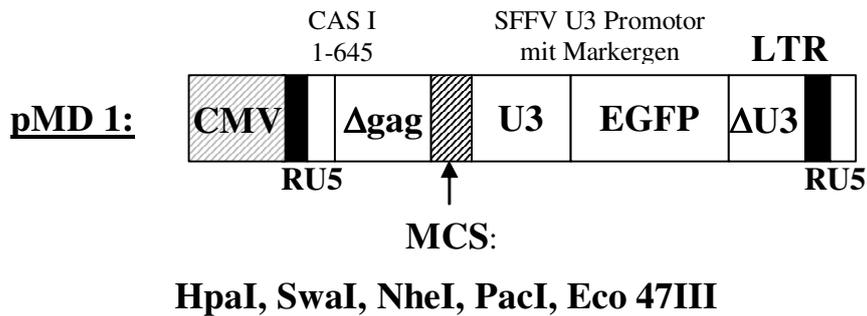


Abbildung 8: Resultierender Vektor pMD1

pMH100 wurde mit *Esp3i* an der Position 654 linearisiert, und mit den Oligonukleotiden #584 und #585 (siehe 2.1.6) ligiert. Diese 42 bp große MCS besitzt singuläre Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HpaI*, *SmaI*, *NheI*, *PacI* und *Eco47III*.

Der Vektor pMD1 besitzt gegenüber pMH25 keine CAS II, *egfp* statt *gfp*, die deletierte U3-Region und 5 singuläre Klonierungsschnittstellen nach der CAS I. In den folgenden Klonierungen wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass vor und nach jedem Modul singuläre Schnittstellen entstanden.

Klonierung von pMD4 mit Einführen der CAS II:

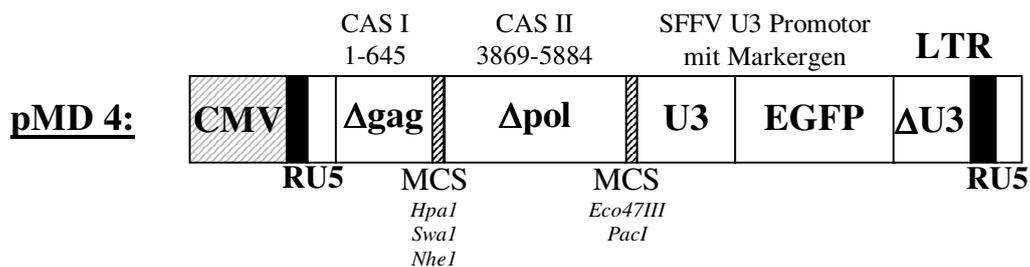


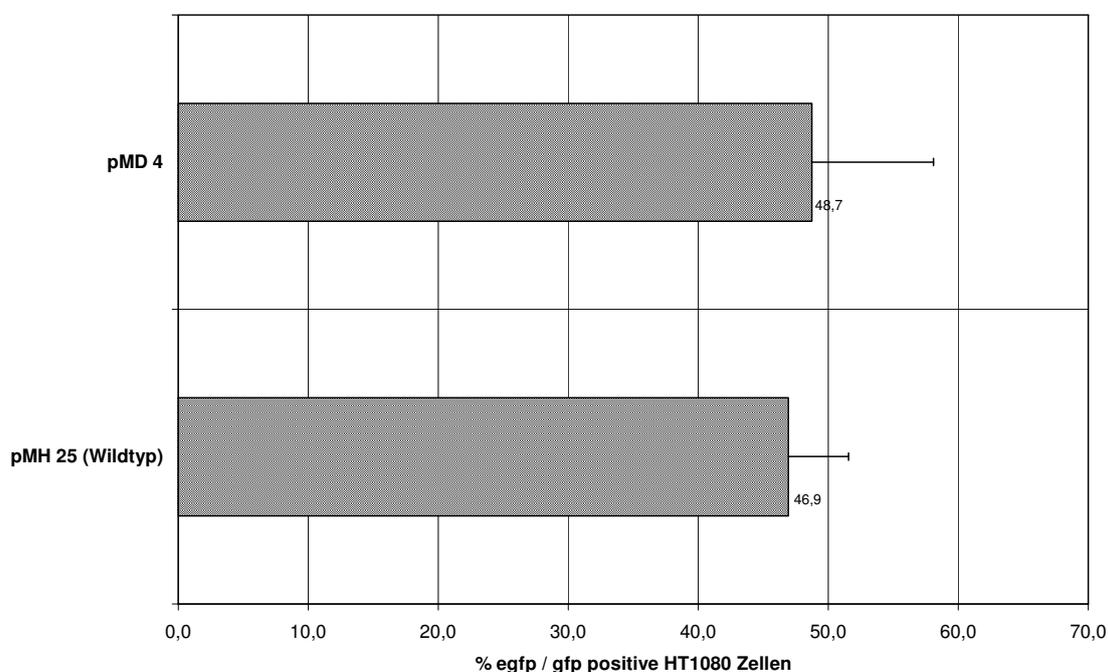
Abbildung 9: pMD4 mit CASII vor der Expressionskassette

pMD1 wurde als Vektor mit *PacI* an der Position 670 linearisiert, und die Überhänge wurden mit *T4-DNA-Polymerase* abgedaut. Als 2031 bp großes Fragment wurde pMH66 mit *PacI* und *Esp3i* verdaut und mit dem Vektor ligiert.

In diesem Klonierungsschritt wurde die als CAS II identifizierte Sequenz von Position 3871 bis 5885 in den Vektor vor die Expressionskassette eingefügt. Der resultierende Vektor pMD4 hat im Vergleich zu pMH25 Klonierungsschnittstellen vor der CAS II (Hpa1, Sma1, Nhe1) und nach der CAS II (Eco47III, PacI). Der Vektor hat eine deletierte U3-Region und egfp anstatt gfp als Markergen. Die Klonierungsschnittstellen dienen dazu, die Lage der Expressionskassette in bezug auf die CAS II zu variieren und die Markergene leichter auszutauschen.

Vergleich der Transduktionsraten von pMH25 und pMD4:

Um potentielle Auswirkungen der Deletionen der U3 Region und der Einführung der MCS zu überprüfen, wurden die Vektoren pMH25 (als Referenz) und pMD4 auf ihre Transduktionseffizienz untersucht. 293T-Zellen wurden mit pCgp-1 und pCenv-1 in gleichen Mengen mittels Calciumphosphatpräzipitation (s. 3.1.2.) transfiziert. Der Vektorüberstand (s. 3.1.3.) wurde sowohl auf HT1080-Zellen als auch auf BHK-Zellen übertragen (s. 3.1.4). Die Analyse der transduzierten Zellen erfolgte mit computergestützter Durchflusszytometrie (s. 3.1.6.). Die Experimente wurden je mindestens viermal wiederholt und mit mindestens zwei unabhängigen DNA Präparationen durchgeführt.



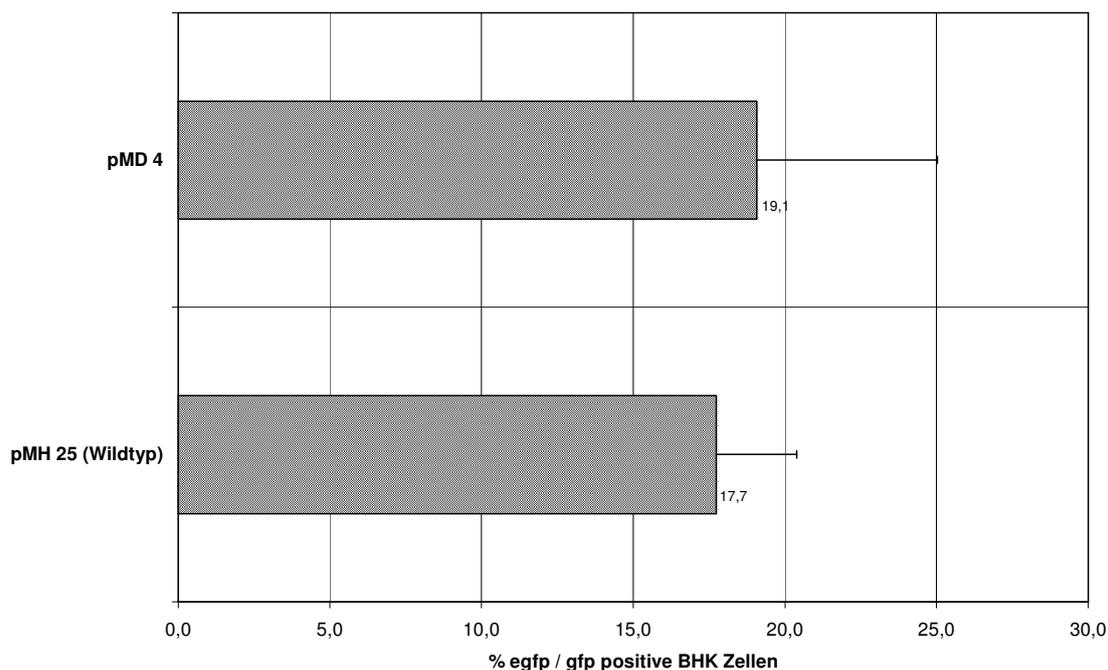


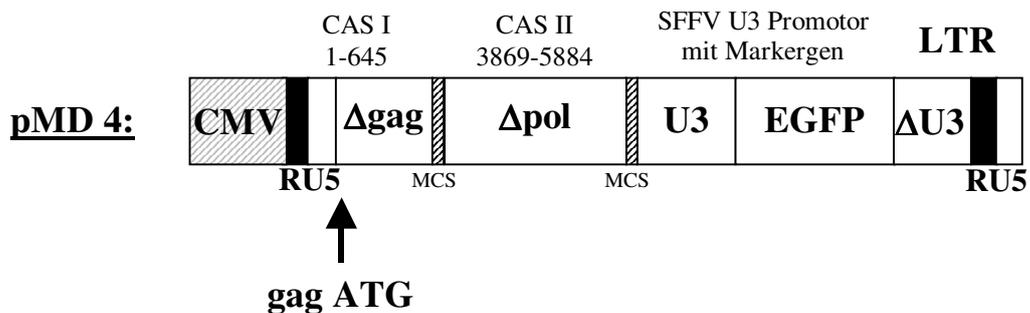
Diagramm 1: Vergleich der Transduktionseffizienz von pMD4 im Vergleich zu pMH25 mit BHK-Zellen und HT1080-Zellen als Zielzellen. Angezeigt sind die egfp positiven Zellen in Prozent.

Die Transduktionsraten von pMD4 (siehe Diagramm 1) zeigen eine zum Referenzvektor pMH25, unter Beachtung der Standardabweichung des Mittelwertes, nicht signifikant veränderte Transduktionseffizienz. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Markergene, d.h. gfp im Vergleich zu egfp, sind in der FACS-Analyse in Anbetracht der Sensitivität bei der Messung des relativen Anteils der Markergen exprimierenden Zellen zu vernachlässigen. Der Vorteil von egfp gegenüber gfp besteht darin, dass bereits in den Vektor produzierenden Zellen der Erfolg der Transfektion mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden kann.

4.1.2. Mutation des gag Startkodons

Da sich die CAS I bis Position 645 in den 5'gag ORF erstreckt und die gag Initiationssequenz intakt ist, kann ein verkürztes Gag Protein translatiert werden und dominant mit den Verpackungskonstrukten und deren gag Expression interferieren (Heinkelein *et al.*, 2002a). Daher wurden Vektoren mit unterschiedlichen Mutationen

des Δ gag Startkodons mit einem zusätzlichen Stopcodon angefertigt und im Hinblick auf ihre Auswirkungen auf die Transduktionseffizienz überprüft. Da sich die Mutationen im Bereich der für den Vektortransfer relevanten CAS I befinden, wäre eine Herabsetzung der Transduktionseffizienz z.B. im Rahmen von Veränderungen der Sekundärstruktur denkbar.



Mutationen des Startkodons:

Vektoren:	Sequenz:
Wildtyp (pMD4)	ATG GCT TCA
pMD7	ATG GCT TAA
pMD8	TTG GCT TAA
pMD9	CTG GCT TAA
pMD10	ACG GCT TAA

Abbildung 10: Die Vektoren pMD7 bis pMD10 sind mit pMD4 identisch bis auf die dargestellten Mutationen des gag ATG.

Klonierung von pMH101, pMH102 und pMH103:

Die über rekombinante PCR hergestellten Fragmente mit den entsprechenden Mutationen wurden zunächst in ein Zwischenkonstrukt mit komplettem gag Gen kloniert.

Durch Schneiden von PMH59 mit Nde1 und Ecor5 wurde ein 10527 bp großes Vektorfragment gewonnen. Das erste 250 bp grosse einzusetzende Fragment wurde durch Schneiden von pMH60 mit Afl2 und EcoRV hergestellt. Das zweite Fragment wurde durch rekombinante PCR mit den Primern #596 und #559 über pCgp1 als

Template hergestellt. Das PCR Produkt wurde mit Nde1 und Afl2 zu einem 799 bp großem Fragment geschnitten, und mit dem Vektorfragment und dem ersten 250 bp großen Fragment zu pMH101 ligiert. pMH102 und pMH103 wurden in Analogie zu pMH101 hergestellt, mit dem Unterschied, dass bei der rekombinanten PCR die Primer #597/#559 für pMH102 und #598/#559 für pMH103 benutzt wurden. Die korrekten Mutationen wurden mittels Sequenzierung verifiziert.

Klonierung von pMD7, pMD8, pMD9 und pMD10:

Um die erfolgreich hergestellten gag-Startkodon Mutationen in den Vektor pMD4 zu überführen, wurde pMD4 mit Mlu1 und Hpa1 zu einem 8689 bp grossen Fragment (Vektor) geschnitten. Als 1250 bp grosses Fragment mit der gewünschten Mutation wurde pMH101 sequentiell mit Bsa1 und Mlu1 geschnitten, wobei die 5' Überhänge nach dem Bsa1 Schnitt durch Klenow Reaktion aufgefüllt wurden. Vektor und Fragment wurden als pMD7 ligiert. In gleicher Weise wie pMD7 wurden pMD9 und pMD10 aus den entsprechenden Vorläuferkonstrukten pMH102 und pMH103 hergestellt. Für die Herstellung von pMD8 konnte der Schritt über eine rekombinante PCR eingespart werden, da in pMH60 die gewünschte Mutation bereits vorhanden war. Für das 8689 bp grosse Vektorfragment wurde pMD4 mit Mlu1 und Hpa1 geschnitten, während pMH60 sequentiell mit Bsa1, Klenowreaktion und Mlu1 geschnitten wurde. Das 1250 bp große Fragment wurde mit dem Vektor zu pMD8 ligiert.

Untersuchung der Auswirkungen der Mutation des gag-Startkodons auf die Transduktionseffizienz:

293T-Zellen wurden mit pMD7 bis pMD10 und pMD 4 als Referenz in gleicher Menge sowie mit pCgp-1 und pCenv-1 transfiziert. Die anschliessenden Transduktionsexperimente wurden sowohl mit BHK Zellen als auch mit HT1080 Zellen durchgeführt, und mittels FACS analysiert. Die Experimente wurden je mindestens viermal wiederholt und mit mindestens zwei unabhängigen DNA Präparationen durchgeführt.

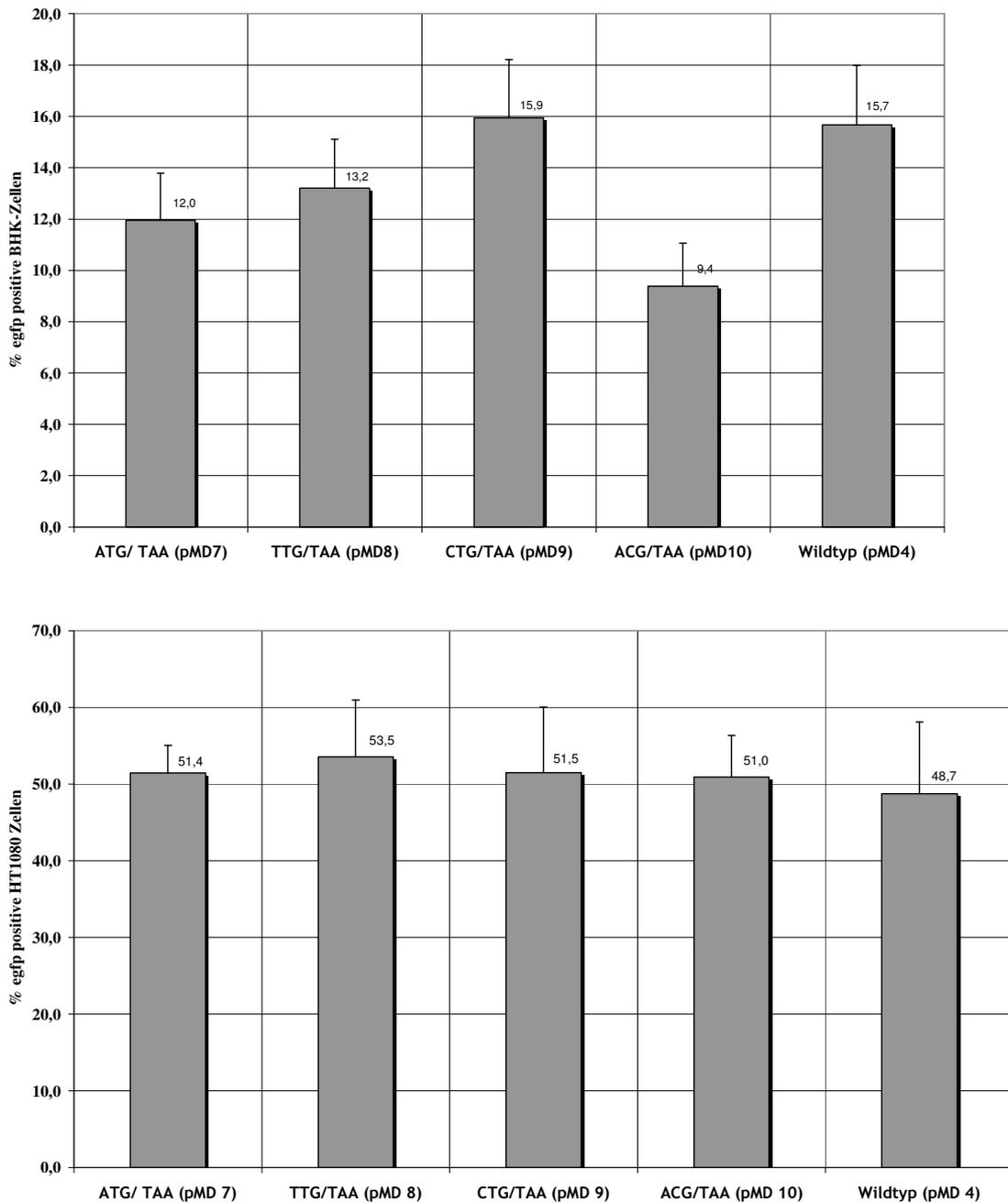


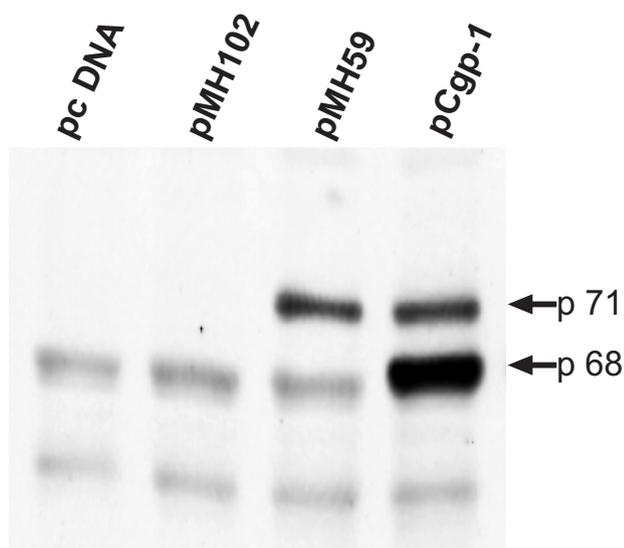
Diagramm 2: Dargestellt sind die egfp positiven Zellen in Prozent (oberes Diagramm BHK-Zellen, unteres Diagramm HT1080-Zellen) für die Vektoren pMD7 bis pMD10, mit pMD4 als Vergleichskonstrukt. Als Fehlerindikator ist die Standardabweichung des Mittelwertes gewählt.

Bei Transduktion der Vektoren auf HT1080-Zellen zeigt sich keine signifikante Veränderung der Transduktionseffizienzen von pMD7 bis pMD10 im Vergleich zu

pMD4. Die Werte für die Experimente mit BHK-Zellen lassen in Anbetracht der Standardabweichung bei relativ geringen absoluten Transduktionsraten ebenfalls keinen Schluß auf die Favorisierung einer Mutante zu. Die weiterführenden Experimente wurden mit dem Vektor pMD9 durchgeführt.

Um zu beweisen, daß keine gag Expression vom Vektor stattfindet, wurde Proteinlysate von mit pMH102 infizierten 293T-Zellen angefertigt (siehe 2.2.5). In diesem Fall wurde nicht pMD9 benutzt, da hier nur ein unvollständiges, deletiertes Gag vorhanden wäre, was die Vergleichbarkeit mit der Positivkontrolle erschwert hätte. Das Proteinlysate wurde mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.2.6) und dann wurden die Proteinbanden nach Markierung mit einem gegen Gag gerichteten Antikörper mittels Western-Blot sichtbar gemacht (siehe 3.2.8). Das Gag-Protein wird als 71kD Vorläuferprotein synthetisiert und von der viralen Protease in ein 68kD und ein 3kD Protein prozessiert. Als Negativkontrolle wurde pcDNA verwendet. Als Positivkontrolle wurde zum einen pMH59 mit undeletiertem gag Leseraster und zum anderen pCgp-1 mit vollständigen gag und pol Leserastern verwendet. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich ist bei pMH102 weder ein 71kD gag Vorläuferprotein, noch ein 68kD gag Protein zu detektieren. Die schwachen unspezifischen Proteinbanden sind vermutlich zelluläre Proteine der 293T-Zellen.

Abbildung 10: Darstellung von p71 und p68 im Zell-Proteinlysate von mit pMH102 und pMH59 transfizierten Zellen. Die pcDNA Spur dient als Negativkontrolle, die pCgp-1 Spur dient als Positivkontrolle.



4.1.3. Lage der Expressionskassette im Bezug auf die CAS II

Foamyviren haben eine cis-aktive Sequenz innerhalb des pol ORF (siehe 1.2.4.). Die Expressionskassette kann wie bei bisherigen PFV-Vektorsystemen hinter die CAS II eingefügt werden oder zwischen CAS I und CAS II eingesetzt werden. Um die Auswirkungen der Verlagerung der Expressionskassette zwischen CAS I und CAS II auf die Transduktionseffizienz zu untersuchen, wurden Vektoren mit der Expressionskassette zwischen den cis-aktiven Sequenzen entwickelt. Für die direkte Bestimmung der Vektortiter (vgl. 3.1.5.) wurden zusätzlich zu den egfp-Vektoren solche mit nls LacZ als Markergen konstruiert.

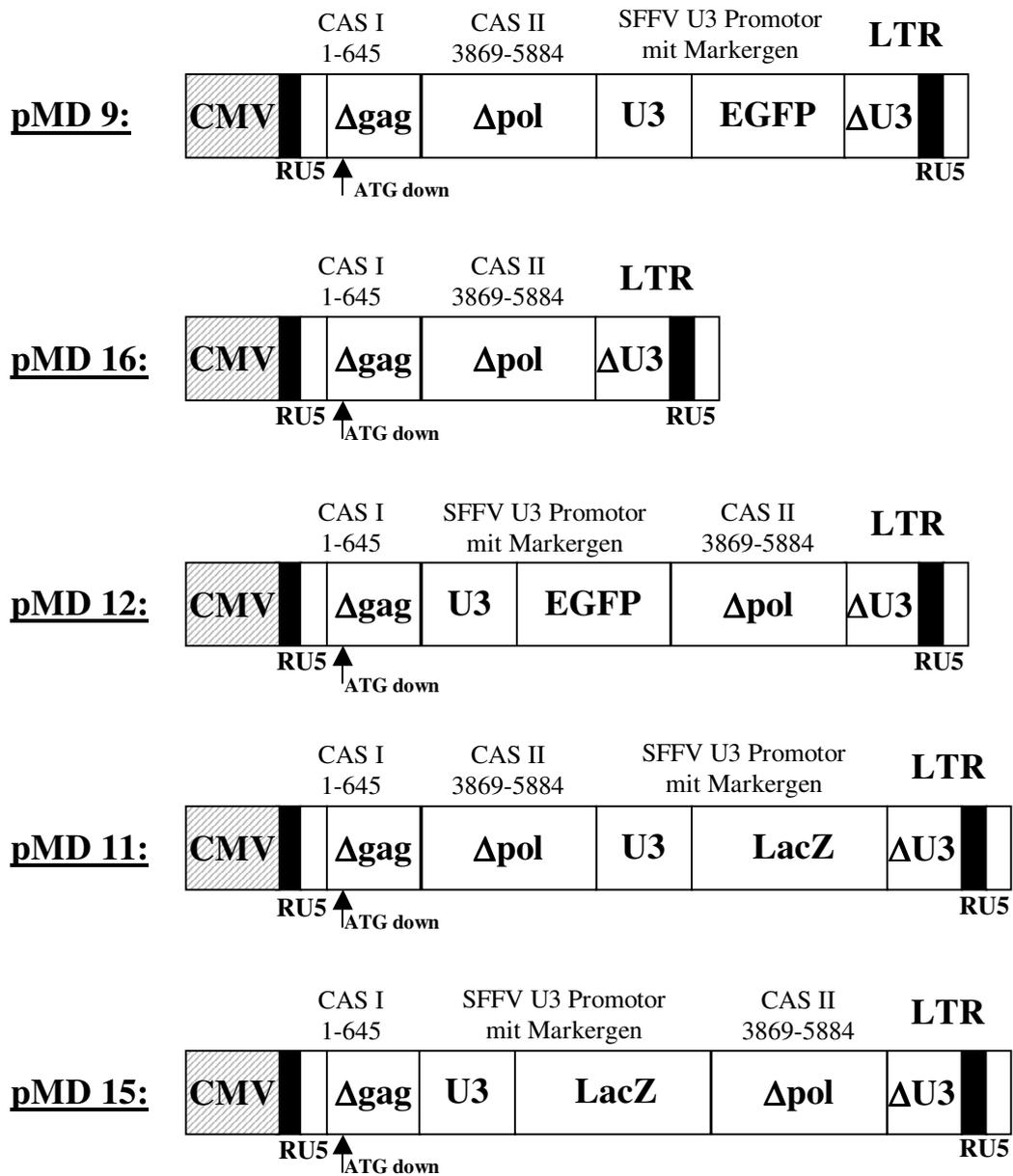


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Vektoren pMD9, pMD16, pMD12, pMD11 und pMD15. pMD16 stellt den Basisvektor ohne Expressionskassette dar. Bei pMD12 besteht der Unterschied zu pMD9 in der Lage der Expressionskassette mit egfp zwischen CAS I und CAS II. pMD11 und pMD15 sind Vektoren mit LacZ als Markergen, wobei pMD15 im Vergleich zu pMD11 die Expressionskassette zwischen CAS I und CAS II hat.

Klonierung von pMD16:

Um den Basisvektor ohne Expressionskassette herzustellen, wurde pMD9 mit Not1 und Esp3i geschnitten. Das 8749 bp grosse Vektorfragment wurde mit Klenowenzym behandelt und religiert. Als Fragment bleibt die Expressionskassette mit SFFVU3-Promotor und egfp (1198 bp) zurück, welche bei der Klonierung von pMD12 verwendet wird.

Klonierung von pMD12:

Im nächsten Klonierungsschritt wird pMD16 mit Swa1 zwischen CAS I und CAS II linearisiert. Anschließend wird die 1198 bp grosse Expressionskassette aus der Klonierung von pMD16 (s.o.) in den linearisierten Vektor eingesetzt. Der resultierende Vektor pMD12 besitzt die gleichen Elemente wie pMD9 mit dem Unterschied, dass die Expressionskassette nicht nach der CAS II eingesetzt ist, sondern vor der CAS II.

Klonierung von pMD5 und pMD11:

Um die Markergene, d.h. egfp gegen nls LacZ auszutauschen, wird der Vektor pMD4 mit Not1 und BamHI zu einem 9207 grossen Vektorfragment geschnitten. Das nls LacZ Markergen wird durch Schnitt des Vektors SFG LacZ mit Kpn2i und Nco1 gewonnen. Insert und Vektor wurden mit Klenow Enzym behandelt und anschliessend ligiert. Der resultierende Vektor pMD5 ist bis auf das Markergen identisch mit pMD4, d.h. die gag ATG Mutation ist noch nicht vorhanden.

Um die gag ATG Mutationen in pMD5 einzubringen, wird pMD16 mit Bstb1 und Bsp1407I verdaut (Vektorfragment 5449 bp) und mit einem 6955 bp grossen Fragment von pMD5, ebenfalls geschnitten mit Bstb1 und Bsp1407I, ligiert. Der resultierende Vektor pMD11 hat im Vergleich zu pMD5 die Mutation des gag ATG zu CTG/TAA und ebenfalls nls LacZ als Markergen.

Klonierung von pMD15:

Zur Herstellung eines Vergleichsvektors zu pMD11, der die Expressionskassette zwischen CAS I und CAS II hat und ebenfalls ein nls LacZ Markergen besitzt, wurde pMD16 mit Swa1 zwischen CAS I und CAS II linearisiert. Die Expressionskassette mit SFFVU3-Promotor und nls LacZ Markergen wurde durch Schnitt von pMD5 mit Bsu 36i, Nru1 und Eco47III gewonnen. Die Fragmente mit 2871 bp und 720 bp wurden mit

dem linearisierten Vektor ligiert. Der resultierende Vektor pMD15 ist äquivalent zu pMD12 mit der Expressionskassette zwischen CAS I und CAS II, hat aber statt egfp nls LacZ als Markergen

Vergleich der Transduktionseffizienzen bei unterschiedlicher Lage der Expressionskassette:

293T-Zellen wurden mit den Vektoren pMD9, pMD11, pMD12 und pMD15 zusammen mit je gleichen Mengen an pCgp-1 und pCenv-1 Helferplasmid mit Calciumphosphat Transfektion (vgl. 3.1.2) transfiziert. Um die Vektortiter direkt bestimmen zu können, wurde dieses Experiment neben egfp (pMD9 und pMD11) als Markergen auch mit nls LacZ (pMD12 und pMD15) als Markergen durchgeführt. Durch Titration des Vektorüberstandes und Auszählen der für LacZ positiven Zellen läßt sich der Vektortiter bestimmen (vgl. 3.1.5.). Die Transduktionen wurden mit HT1080-Zellen durchgeführt, und je mindestens viermal aus mindestens zwei verschiedenen DNA-Präparationen durchgeführt.

Wie in Diagramm 3 (nächste Seite) ersichtlich reduziert sich die Transduktionseffizienz von pMD12 bei HT1080-Zellen auf ca. 40% der Transduktionseffizienz vom pMD9. Bei den BHK-Zellen ist der Transduktionseffizienzverlust noch ausgeprägter (Reduktion auf ca. 15%).

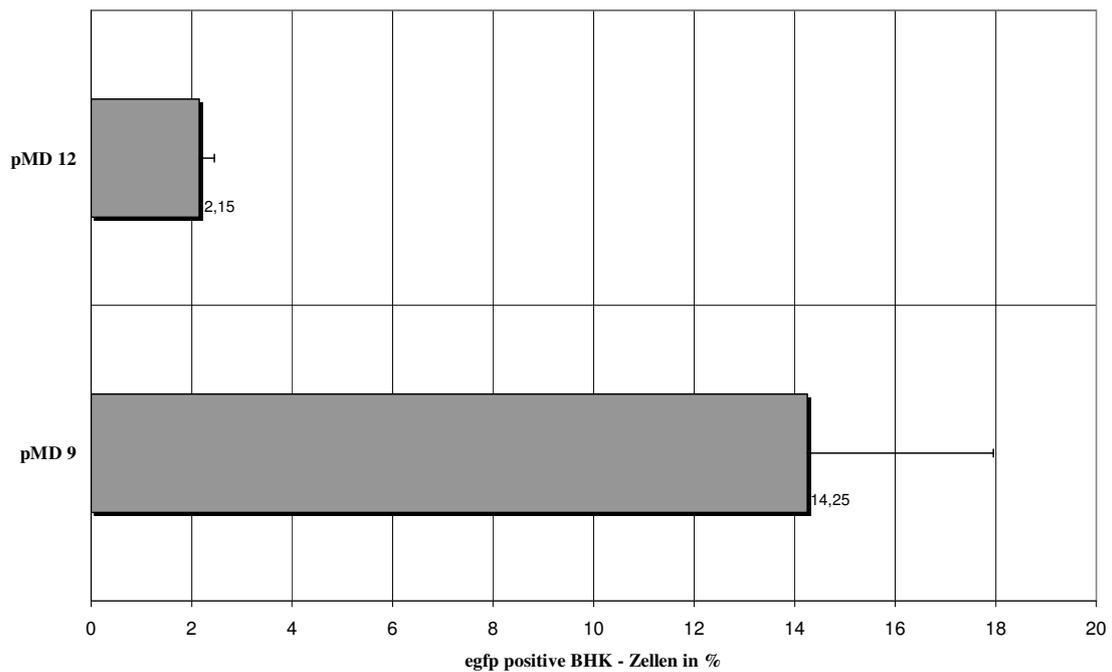
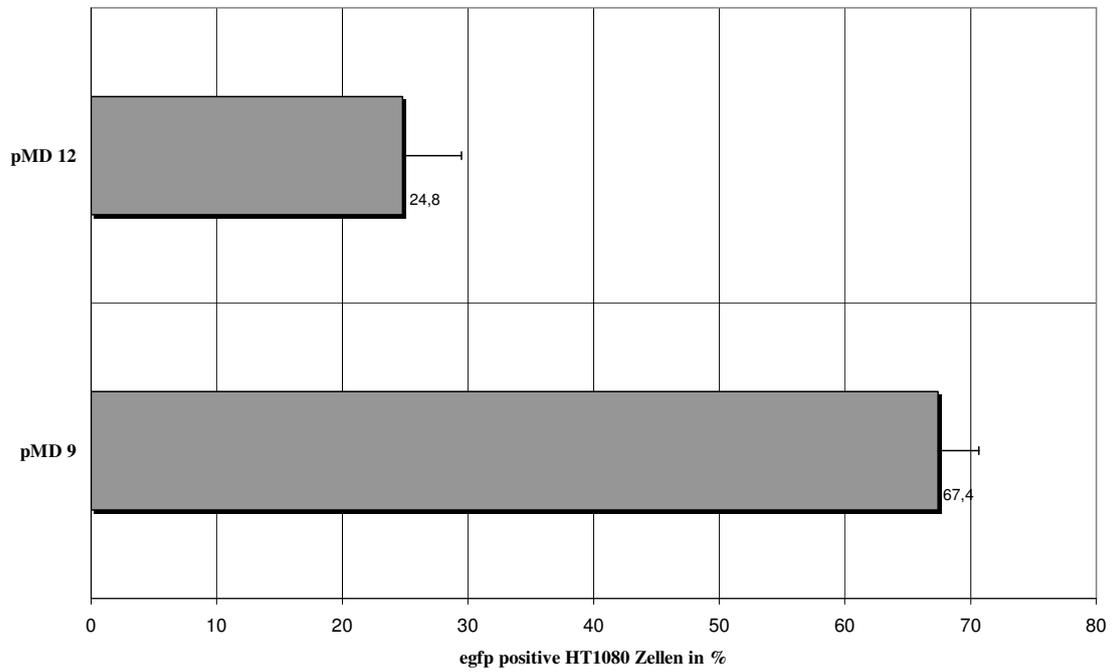


Diagramm 3: Auf der Abszisse ist der prozentuale Anteil an egfp positiven Zellen angegeben für pMD12 (Expressionskassette zwischen CAS I und CAS II) sowie pMD9 (Expressionskassette nach CAS II) für HT1080-Zellen (oben) und BHK-Zellen (unten).

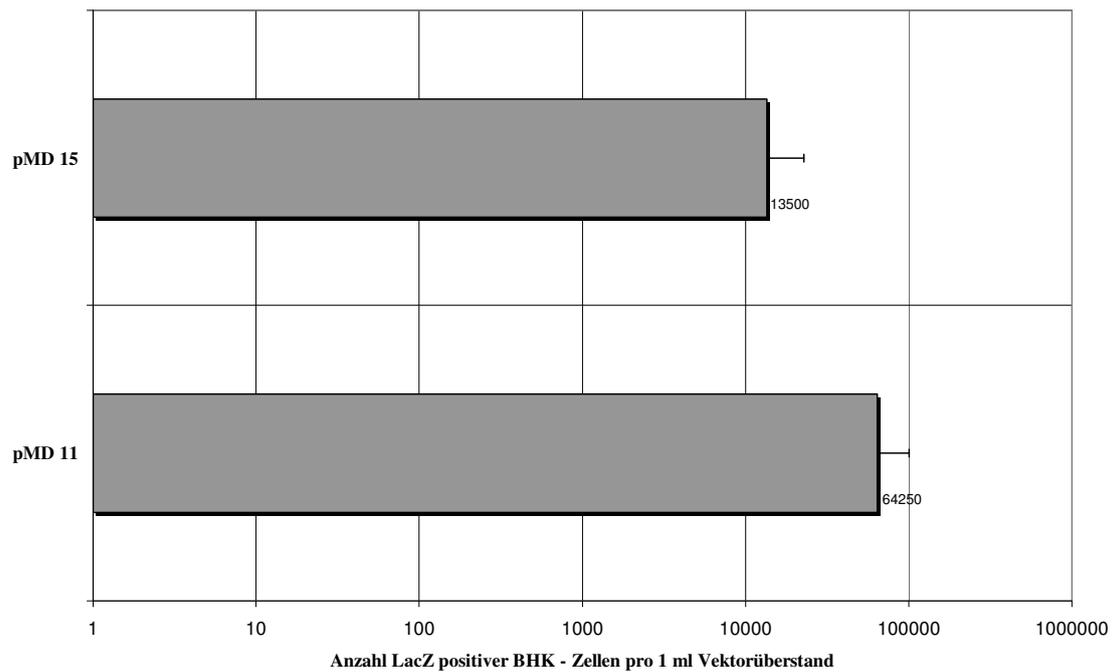
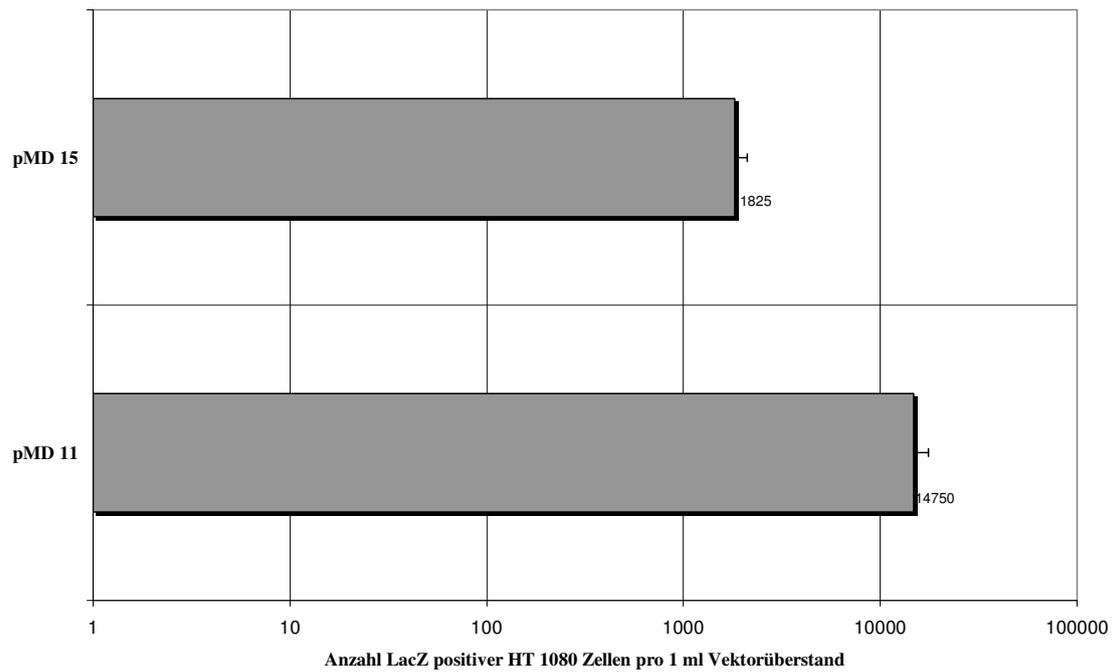


Diagramm 4: Logarithmische Darstellung der Vektortiter für pMD15 (Expressionskassette zwischen CAS I und CAS II) und pMD11 (Expressionskassette nach CAS II).

Betrachtet man die ermittelten Vektortiter für pMD11 und pMD15 nach Titration im lacZ Test (siehe Diagramm 4), so ergibt sich bei den HT1080-Zellen ein ca. 8 fach höherer Vektortiter für pMD11 im Vergleich zu pMD15. Der durchschnittliche

Vektortiter, der mit pMD11 bei HT1080-Zellen erzielt werden konnte, lag bei 1.47×10^4 pro ml. Für BHK-Zellen zeigen sich ähnliche Resultate, pMD11 zeigt ein im Vergleich zu pMD15 4.8 fach höheren Vektortiter. Der durchschnittliche Vektortiter, der mit BHK Zellen erreicht werden konnte lag bei 6.45×10^4 pro ml.

Zusammenfassend kann man die Aussage treffen, daß die Lage der Expressionskassette zwischen CAS I und CAS II im Vergleich zur Lage der Expressionskassette nach CAS I und CAS II bei Analyse der epfp Vektoren in einem Transduktionseffizienzverlust von mehr als 50 Prozent resultiert und die Vektortiter im LacZ Test um den Faktor 5 bis 10 abnehmen.

4.1.4. Evaluation von Deletionen der CAS II

Die optimale Grösse der CAS II wird in den Veröffentlichungen unterschiedlich angegeben. Die bisher in dem Vektor verwendete CAS II stellt mit 2014 bp die Maximalvariante dar (Heinkelein *et al.*, 1998). In anderen Arbeiten wurde die CAS II als Minimalvariante mit 679 bp angegeben (Erlwein *et al.*, 1998). Um das Verpackungslimit des Vektors zu erhöhen, wurde die Auswirkung einer Reihe von Deletionen, sowohl vom 5' Ende als auch vom 3' Ende ausgehend, untersucht. Als Grundlage der Deletionen dient die 2014 bp große CAS II von Position 3871 bis 5885.

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits der Einfluß der Lage der Expressionskassette in bezug auf die CAS II auf die Transduktionseffizienz untersucht. Um einen potentiellen Einfluß der Lage der Expressionskassette bei Verwendung von Deletionen der 2014 bp großen CAS II zu erfassen, wurden die deletierten CAS II sowohl vor als auch nach der Expressionskassette eingebaut und evaluiert.

Anfertigung der CAS II Deletionen:

Der Vektor pMD16, welcher die Maximalvariante der CAS II (Position 3869 bis 5884) besitzt, wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend mit Klenow-Enzym behandelt, um CAS II Fragmente verschiedener Größe sowohl vom 3' Ende als auch vom 5' Ende herzustellen (siehe Tabelle). Die Fragmente dienen zur Herstellung der Vektoren pMD17 bis pMD22 und der Vektoren pMD23 bis pMD28:

Zielkonstrukt	Restriktionsenzyme	Enthaltener Sequenzbereich	Größe CAS II
pMD17 / pMD23	Afl II	4055 bis 5624	1569 bp
pMD18 / pMD24	Afl II / Pst I	4284 bis 5624	1340 bp
pMD19 / pMD25	Afl II / Eco RI	4055 bis 5213	1158 bp
pMD20 / pMD26	Afl II / Eco RV	4055 bis 4662	607 bp
pMD21 / pMD27	Afl II / Eco RV	4662 bis 5624	962 bp
pMD22 / pMD28	Afl II / Eco RI	5213 bis 5624	411 bp

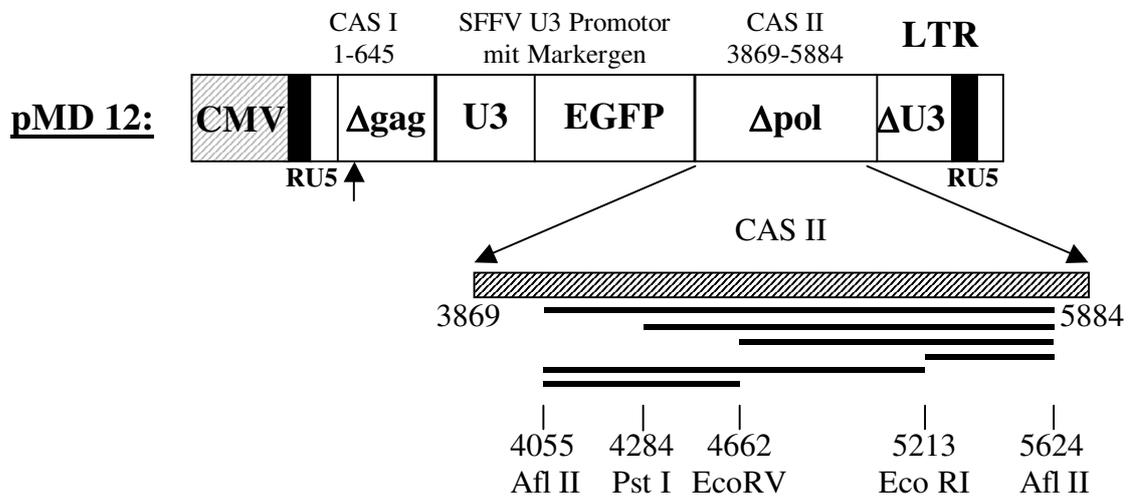


Tabelle 2: CAS II Deletionen von pMD18 bis pMD28 mit Angabe der verwendeten Restriktionsendonukleasen und Sequenz der enthaltenen Anteile der CAS II in Relation zur proviralen Sequenz von PFV sowie absolute Größe der CAS II. PMD17 bis pMD22 haben die Expressionskassette zwischen den cis-aktiven Sequenzen, die Vektoren pMD23 bis pMD28 haben die Expressionskassette nach den cis-aktiven Sequenzen. In der Übersicht anhand von pMD12 kann die Herstellung der verschieden großen CAS II Deletionen anhand der verschieden kombinierten Restriktionsendonukleasen abgelesen werden.

Klonierung von pMD17 bis pMD22:

Der Vektor pMD12 wurde mit Nhe1 und Eco47III geschnitten und anschließend mit Klenow Reaktion behandelt, was ein 7911 bp grosses Vektorfragment ohne CAS II

ergibt. Anschliessend wurden die verschiedenen CAS II Deletionen durch Schneiden von pMD12 mit Kombinationen der Restriktionsendonukleasen AflIII, PstI, EcoRI und EcoRV (siehe Tabelle 2) hergestellt. Die einzelnen Deletionen wurden in das 7911 bp grosse Vektorfragment eingesetzt. Die resultierenden Vektoren pMD17 bis pMD22 haben die Expressionskassette zwischen der CAS I und der deletierten CAS II.

Klonierung von pMD 23 bis pMD 28:

In Analogie zur Klonierung von pMD17 bis pMD22 wurde hier statt pMD12 pMD9 mit NheI und Eco47III sowie anschliessender Klenow Reaktion geschnitten (Vektorfragment 7903 bp). Mit diesem Schritt wurde die CAS II (Position 3869 bis 5884) aus pMD9 entfernt. Anschliessend werden die Inserts mit den deletierten CAS II in das Vektorfragment ligiert. Da die Expressionskassette bei pMD 9 nach der CAS II eingesetzt ist, haben die resultierenden Vektoren pMD23 bis pMD28 ebenfalls die Expressionskassette hinter der deletierten CAS II.

Transduktionseffizienzen der Vektoren mit unterschiedlicher CAS II:

293T-Zellen wurden mit gleichen Mengen von pMD17 bis pMD28 sowie mit pMD9 und pMD12 als Vergleichsvektor und pCgp-1 und pCenv-1 mittels Calciumphosphattransfektion transfiziert. Anschliessend wurden HT1080-Zellen mit den Vektorüberständen transduziert. Die transduzierten Zellen wurden mit FACS Analyse quantifiziert. Das Experiment wurde mit vier Transfektionen aus zwei voneinander unabhängigen DNA Präparationen durchgeführt.

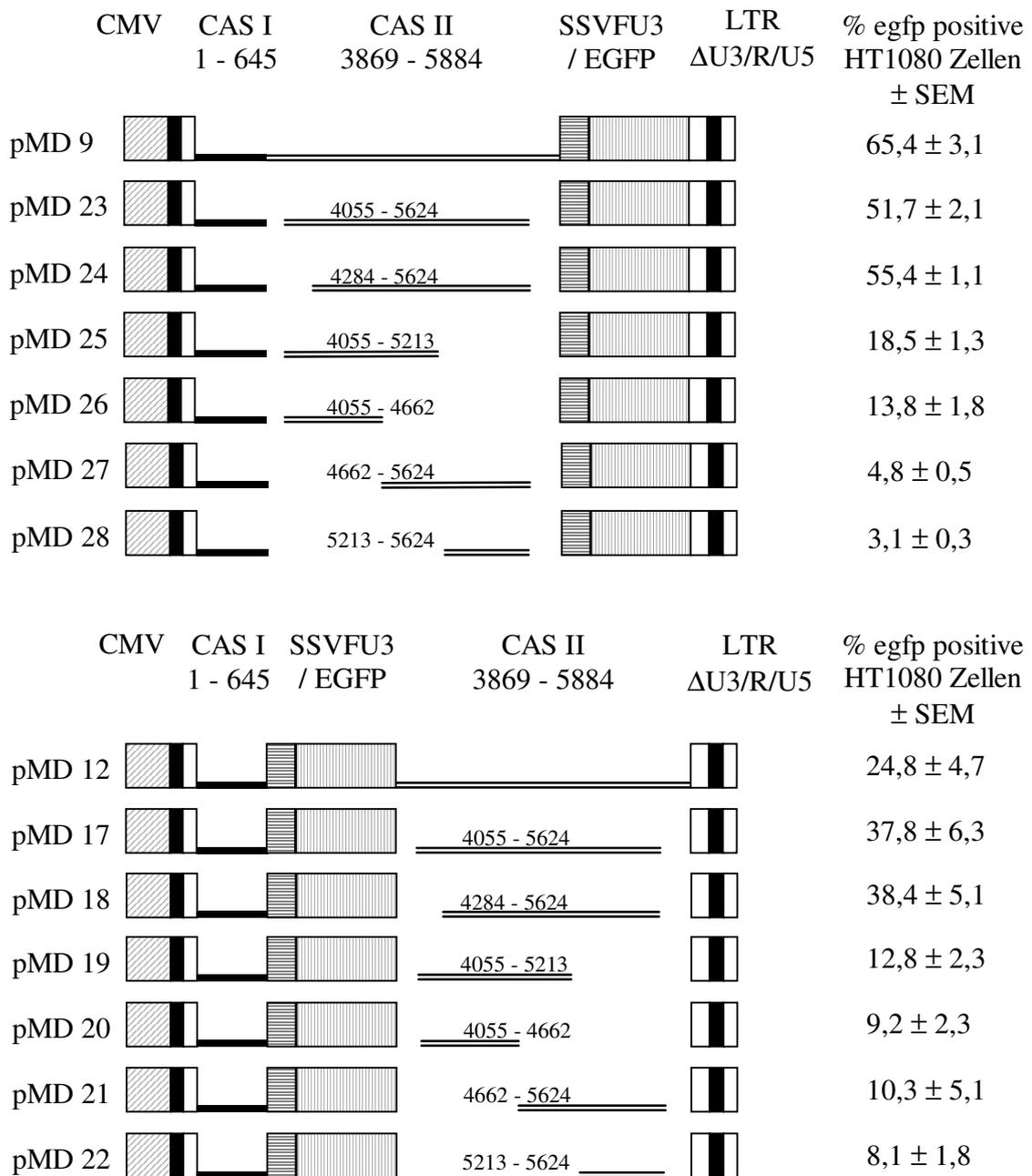


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Vektoren pMD17 bis pMD28 sowie pMD9 und pMD12 als Referenzvektor. In der rechten Spalte ist der prozentuale Anteil der egfp positiven HT1080-Zellen mit Standardabweichung des Mittelwertes angegeben

Mit den Voruntersuchungen der Transduktionseffizienz bei Variation der Lage der Expressionskassette in bezug auf die Maximalvariante der CAS II decken sich die Ergebnisse auch für die Deletionen der CAS II. Die Vektoren pMD9, pMD23 und

pMD24 mit der Expressionskassette nach der CAS II sind jeweils den Vergleichskonstrukten pMD12, pMD17 und pMD18 mit der Expressionskassette vor der CAS II überlegen. Bei den kleineren CAS II Deletionsvarianten von pMD20 bis pMD22 und pMD26 bis pMD28 (411 bp, 607 bp und 962bp) ist der Unterschied der Transduktionseffizienzen in Abhängigkeit von der Lage der Expressionskassette geringer ausgeprägt. Allerdings lassen sich in Anbetracht der hohen Standardabweichung bei niedrigen Transduktionsraten keine zuverlässigen Aussagen treffen.

Bei Verwendung der Maximalvariante der CAS II von 2015 bp lassen sich die besten Transfektionsraten erzielen. Weiterführende Deletionen der CAS II sind bei pMD23 und pMD24 mit moderatem Verlust an Transduktionseffizienz verbunden. Wird die CAS II von Position 4284 bis 5624 wie sie in pMD24 enthalten ist, sowohl vom 5' Ende als auch vom 3' Ende, weiter deletiert, zeigt sich allerdings ein massiver Verlust an Transduktionseffizienz. Daraus läßt sich folgern, daß die für einen effizienten Vektortransfer verantwortlichen CAS II im Bereich von Position 4284 bis 5624 liegen.

4.2. Anreicherung von PFV-Vektoren durch Zentrifugation

Um ein günstiges und einfaches Verfahren zur Konzentration von PFV-Vektoren zu etablieren wurden zwei verschiedene Zentrifugationsverfahren bei 15000g verglichen. Zum einen wird eine modifizierte Polyethylenglykol (PEG)-Präzipitation (Bateman and Chant, 1979; Climpton *et al.*, 1990; Kaaden *et al.*, 1971; Kohno *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 1970) mit anschließender Zentrifugation und zum anderen eine Zentrifugation ohne vorangehende PEG Präzipitation durchgeführt. Das Volumen in dem sich die Vektorpartikel befinden soll auf 5% des Ausgangsvolumen vor Behandlung reduziert werden.

PEG-Präzipitation von Vektorüberständen:

8 ml des Vektorüberstandes wurden bei 4°C sterilfiltriert und anschließend mit 0,237ml 5M NaCl sowie 1,728 ml PEG 6000/NTE Puffer (siehe 2.2.1.4.) für 30 Minuten unter Schwenken bei 4°C vermengt. Anschließend wird mit 15000g (Sorvall Zentrifuge mit

SS34 Rotor und 14000 rpm) bei 4°C über 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 0,4ml Medium resuspendiert.

Zentrifugation von Vektorüberständen:

8 ml des Vektorüberstandes wurden bei 4°C sterilfiltriert und anschließend bei 4°C für 30 Minuten bei 15000g zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge mit SS34 Rotor und 14000 rpm). Anschliessend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 0,4ml Medium resuspendiert.

Vergleich der PFV Vektoranreicherung durch PEG-Präzipitation und Zentrifugation:

Um Vektorüberstand zu gewinnen, wurden 293T-Zellen mit dem nls LacZ Vektor pMD11 zusammen mit pCen-1 und pCgp-1 Helferplasmiden mit Calciumphosphat-Transfektion transfiziert. Die Vektorüberstände aus mehreren Ansätzen wurden nach einem Gefrier-Auftau-Zyklus gesammelt und sterilfiltriert. Die Überstände wurden nach den oben beschriebenen Verfahren behandelt und zentrifugiert. Das Volumen in dem sich der Vektorüberstand befindet wurde auf 5% des Ausgangsvolumens reduziert. Anschließend wurden BHK-Zellen mit gleichen Volumina der nach den beschriebenen Methoden behandelten Überstände und der unbehandelten Überstände transduziert. Der Vektor-Titer wurde nach 2 Tagen mit dem LacZ Test (siehe 3.1.5.) bestimmt. Die Ergebnisse resultieren aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten:

Vektorüberstand:	Mittelwert Anzahl LacZ positiver Zellen pro ml Vektorüberstand	Verhältnis zu unbehandeltem Vektorüberstand
Unbehandelt	$4,4 \times 10^3$	
PEG-Präzipitation	$3,0 \times 10^4$	6,8
Zentrifugation	$4,9 \times 10^4$	11,1

Tabelle 3: Vektortiter und Verhältnis bei einer vorgegebenen Volumenreduktion auf 5% des Ausgangsvolumens des Vektorüberstandes bei mit PEG präzipitierten Vektorüberstand vs. zentrifugiertem Überstand.

Die PEG-Präzipitation mit Zentrifugation ist der alleinigen Zentrifugation nicht überlegen. Im Gegenteil besitzt der Vektor-Überstand, welcher mit PEG Präzipitation behandelt worden ist eine niedrigere Anzahl infektiöser Partikel als der zentrifugierte Überstand. Um einen direkten zytotoxischen Effekt von PEG auf die Zielzellen auszuschliessen, wurde unbehandelter Vektorüberstand auf BHK Zellen transduziert und mit Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an PEG im Vergleich zu PEG freiem Medium versetzt. Die Konzentration von PEG wurde so gewählt, daß die Konzentration bei Verwendung der PEG-Präzipitation bei weitem überschritten wird. Bei der Analyse der Zielzellen mit dem LacZ Test ergaben sich annähernd gleiche Vektortiter. Möglicherweise werden die Hüllen der Vektoren durch die Salzlösungen beschädigt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß PFV-Vektorüberstand mit einer Zentrifugation bei 15000g über 30 Minuten auf 5% des Ausgangsvolumen reduziert werden kann bei einem Verlust an infektiösen Partikeln von ca. 50%.

4.3. Lagerung von PFV-Vektoren mit DMSO bei –80°C

In der Praxis konnte bei eingefrorenem Vektorüberstand ein deutlicher Verlust von infektiösen Partikeln nach dem Auftauen beobachtet werden. Es sind Methoden zur Konservierung von verschiedenen umhüllten Viren mit Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) beschrieben worden (Wallis and Melnick, 1968).

Ob sich analog eine protektive Wirkung bei Einfrieren von PFV-Vektoren mit DMSO erzielen läßt, soll untersucht werden. Da ein Vektorüberstand in der Praxis portioniert eingefroren werden kann, ist nicht das wiederholte Auftauen und Einfrieren Gegenstand des Experimentes, sondern es soll untersucht werden, ob sich bei zunehmender Lagerungsdauer bei –80°C mit DMSO ein protektiver Effekt auf die Vektorpartikel und ihre Transduktionseffizienz zeigen lässt.

Vergleich der Infektiösität von Vektoren bei –80°C Lagerung mit und ohne DMSO:

Zur Gewinnung von Vektorüberstand wurden 293T-Zellen mit pMD5 einem Vektor mit nls LacZ Markergen sowie den Helferplasmiden pCenv-1 und pCgp-1 durch Calciumphosphat-Transfektion transfiziert. Anschließend wurde der Vektorüberstand

gesammelt und dann zweigeteilt. Die eine Hälfte wurde mit 10% DMSO unter Schwenken vermischt. Anschließend wurden die Vektorüberstände zu gleichen Teilen portioniert. Als Ausgangswert wurden vor Einfrieren des Vektorüberstandes BHK-Zellen transduziert. Dann wurden die portionierten Vektorüberstände in eine Gefriertruhe bei -80°C gegeben. Je nach 7 und 14 Tagen wurden BHK-Zellen mit dem aufgetauten Vektorüberstand transduziert und mittels LacZ Test wurde der Vektortiter bestimmt. Die Untersuchung wurde zweimal unabhängig voneinander wiederholt.

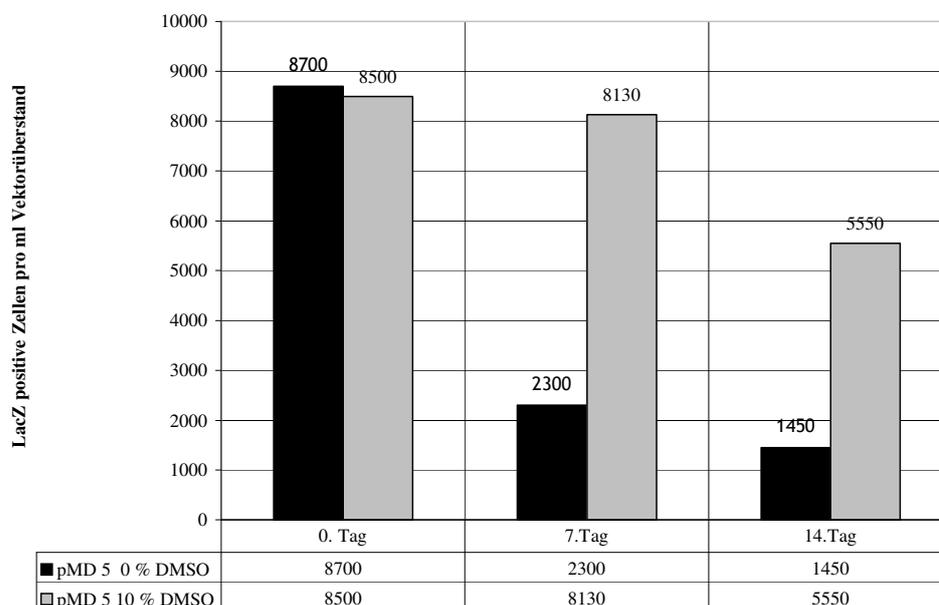


Diagramm 6: Logarithmische Darstellung der Mittelwerte des Vektortiters von pMD5 bei Lagerung mit und ohne DMSO bei -80°C mit Ausgangswert sowie nach 7 und 14 Tagen.

Aus Diagramm 6 ist zu entnehmen, daß Vektorüberstand, welcher nicht mit DMSO eingefroren ist, ca. 80% an Infektiosität durch das Einfrieren und die Lagerung im Vergleich zum Ausgangswert vor dem Einfrieren verliert. Auf der anderen Seite scheint bei dem mit DMSO eingefrorenem Vektorüberstand nur ein allenfalls geringfügiger Verlust an Infektiosität vom Wert des 7. Tages im Vergleich zum Ausgangswert zu bestehen. Da die Effektivität von Transduktionen von vielen Faktoren abhängt, können absolute Werte von Transduktionen, welche an verschiedenen Tagen vorgenommen

wurden, nur bedingt verglichen werden. Transduktionen welche parallel vorgenommen werden, lassen bessere Aussagen zu. So ist zu sehen, daß die Ausgangswerte für die Vektortiter mit und ohne DMSO vor dem Einfrieren nahezu identisch sind. Mit zunehmender Lagerungsdauer bei -80°C zeigt sich am 7. Tag ein 3,5 fach höherer Vektortiter bei Lagerung mit 10% DMSO im Vergleich zur Lagerung ohne DMSO. Am 14. Tag zeigt sich ein 3,8 fach höherer Vektortiter für die mit DMSO gelagerten Vektoren. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Zugabe von 10% DMSO vor dem Einfrieren bei -80°C von PFV-Vektorüberstand zu einer Verringerung von Verlusten durch Gefrierschäden führt.

5. Diskussion

5.1. Eigenschaften des modifizierten PFV-Vektorsystems

Ausgehend vom Vektor pMH25 wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen. Im ersten Schritt wurde die 3'U3 Region durch eine Deletionsvariante mit deletierter Sequenz von Position 10262 bis 10820 ausgetauscht. Die deletierte 3' U3-Region (219 bp Restgröße) enthält die für die Integration notwendigen 5' Sequenzen der U3-Region sowie den Übergang von der U3-Region in die R-Region. Die TAS responsiven Elemente und die TATA box wurden deletiert (Erlwein and Rethwilm, 1993; He *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 1998, Heinkelein *et al.*, 2002a). Dies ermöglicht die Erhöhung des theoretischen Verpackungslimit um 558 bp, zum anderen wird das Risiko einer Aktivierung des U3-Promotors in Abwesenheit von TAS durch zelluläre Transkriptionsfaktoren ausgeschaltet (Heinkelein *et al.*, 2002a). Die U3-Region von pMH25 stammt von pHSRV2, daher kommen die Deletionen der 3'LTR von pMD16 gegenüber pFV auf 1204 bp (Schmidt und Rethwilm., 1997).

Im nächsten Schritt wurden multiple singuläre Restriktionsendonuklease-Schnittstellen in den Vektor eingebaut, um die einzelnen Komponenten im Sinne einer Modulbauweise einfach austauschen zu können. Beim Vergleich der Transduktionseffizienz von pMH25 mit pMD4 konnte kein negativer Effekt der Modifikationen auf die Transduktionseffizienz festgestellt werden. Diese Modulbauweise erleichtert den Umgang mit dem Vektor in der Praxis erheblich, da jede Klonierung nicht nur arbeitsaufwendig ist, sondern auch eine Fehlerquelle darstellt.

Im nächsten Schritt wurde das Startkodon des deletierten gag ORF mutiert. Die CAS I erstreckt sich bis Position 645 und enthält Teile des gag ORF. Das gag ATG ist an Position 445 lokalisiert. Damit ist die Expression eines verkürzten Gag-Fragmentes möglich. In einem optimierten Vektorsystem sollte die Expression eines verkürzten Gag-Proteins aus mehreren Gründen sicher unterbunden sein. Zum einen wird die negative Auswirkung verkürzter Gag-Fragmente auf die Partikelbildung in den vektorproduzierenden Zellen diskutiert (Heinkelein *et al.*, 2002a; Heinkelein *et al.*, 2000b). Zum anderen wäre die Expression eines verkürzten Gag Proteins in der transduzierten Zielzelle, nach Integration des Vektors hinter einen zellulären Promotor denkbar. Wenn das Vektorsystem klinisch erprobt wird, könnte die Expressierung eines verkürzten Gag-Proteins in der transduzierten Zielzelle zu einer Aktivierung der T-Zell vermittelten Immunantwort des Wirtsorganismus führen. Die Folge wäre eine Antikörperbildung mit Elimination der transduzierten Zielzellen.

Mittels rekombinanter PCR wurden verschiedene Vektoren mit ausgeschaltetem gag ATG konstruiert. Da sich die Modifikationen in einem sensiblen Bereich des Vektors befinden (CAS I) wurde die Transduktionseffizienz der verschiedenen Konstrukte im Vergleich zu pMD4 überprüft. Es konnte gezeigt werden, daß die Modifikationen keinen negativen Effekt auf die Transduktionseffizienz haben. pMD9 wurde als neuer Basisvektor ausgewählt. In diesem Vektor ist sowohl das gag ATG ausgeschaltet und ein Stopcodon eingefügt. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, daß die Gag-Expression durch die Mutationen in pMD9 verhindert wurde.

Der Vektor pMD16 (PFV-Vektor mit CAS I und CAS II ohne Expressionskassette) hat mit den durchgeführten Deletionen eine Grösse von 3,1 kbp, bestehend aus CAS I (Position 1 bis 645), CAS II (Position 3869 bis 5884) und deletierter 3'U3-Region mit PPT und R Region (442 bp). Insgesamt ergibt sich somit ein theoretisches Verpackungslimit von 8,5 kb, bevor die Grösse der pregenomischen wildtypischen RNA von PFV von 11,67 kb erreicht wird (Schmidt und Rethwilm, 1997, Heinkelein *et al.*, 2002a). Im Vergleich zu MuLV oder HIV-Vektoren steht somit ein größeres Verpackungslimit zur Verfügung (Miller, 1992; Miller, 1997). Wenn man die CAS II von pMD24 (Grösse 1340 bp von Position 4284 bis 5624) verwendet, erweitert sich das theoretische Verpackungslimit auf 9,2 bp. Mit nls LacZ als Markergen konnten mit pMD11 Vektortiter von 1.5×10^4 /ml hergestellt werden.

In einer neueren Arbeit wurde ein PFV-Vektor ($p\Delta\Phi$) mit ähnlichem Aufbau wie pMD9 veröffentlicht (Trobridge *et al.*, 2002). Der Vektor $p\Delta\Phi$ hat analog zu pMD9 einen TAS unabhängigen CMV-Promotor, die CAS I von Position 1 bis 645 sowie ein grössere CAS II von 2,5 kbp sowie den PPT mit deletierter 3'LTR. In diesem Vektor wurde ebenfalls das gag Startkodon ausgeschaltet. Die Expressionskassette liegt hinter der CAS II. Dieser Vektor konnte mit separaten Expressionsplasmiden für gag, pol und env Vektortiter von 10^5 Partikeln pro ml produzieren. Expressionskassetten mit Grössen bis zu 9,2 kb wurden erfolgreich von diesem Vektor transduziert.

Der Vektor $p\Delta\Phi$ und pMD9 wurden von beiden Arbeitsgruppen in parallelen Transfektionen evaluiert, und es zeigten sich gleichwertige Ergebnisse für die Transduktionsraten beider Vektoren (persönliche Mitteilung von M. Heinkelein).

5.2. Optimale Lage und Grösse der CAS II

Die Grösse der für einen effizienten Vektortransfer angegebenen CAS II wird unterschiedlich angegeben. So beschrieben O. Erlwein und M. McClure 1998 (Erlwein *et al.*, 1998) eine 679 bp große CAS II von Position 4861 bis Position 5540 der viralen RNA. In den durchgeführten Untersuchungen zeigten weitere Deletionen vom 5' oder 3' Ende einen deutlichen Verlust an Transduktionseffizienz. Die Untersuchungen wurden mit dem replikationskompetenten FOV-7 als Helfervirus durchgeführt, welches die Gag-, Pol- und Env-Proteine zur Verfügung stellte um eine Vektorverpackung zu gewährleisten. Andere Ergebnisse für die CAS II wurden von M. Heinkelein und A. Rethwilm 1998 (Heinkelein *et al.*, 1998) veröffentlicht. Hier wurde für die zum optimalen Vektortransfer notwendige CAS II eine Grösse von 2014 bp (Position 3869 bis Position 5884) bestimmt. Weitergehende Deletionen, die nicht die Sequenzen von Position 4054 bis Position 5626 enthielten, waren mit einem deutlichen Verlust an Transduktionseffizienz verbunden. Bei Deletion der Sequenzen 3869 bis 4054 und 5626 bis 5884 zeigte sich ein moderater Abfall der Transduktionsraten von 64% auf 55 %.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit den Ergebnissen von M. Heinkelein und A. Rethwilm 1998. Die CAS II, mit der optimale Transduktionsergebnisse erzielt werden konnten, enthält die Sequenzen von Position 3869 bis 5884, wie sie in pMD9 enthalten sind. Vektoren mit weitergehenden Deletionen der CAS II (vgl. pMD24 mit

CAS II von Position 4284 bis 5624) sind mit einem moderaten Abfall der Transduktionrate von 65.4% (pMD9) auf 55.4% (pMD24) verbunden gewesen. Werden allerdings weitere Anteile der CAS II vom 5'Ende deletiert wie bei pMD27 (CAS II Sequenz von 4662 bis 5624 enthalten) und pMD28 (CAS II Sequenz von Position 5213 bis Position 5624) sinken die Transduktionsraten markant auf unter 5% ab. Ebenso resultieren weitergehende CAS II Deletionen vom 3'Ende in einem deutlichen Verlust an Transduktionsrate. So sind bei den Vektoren pMD25 (CAS II Sequenz von Position 4055 bis Position 5213) und pMD26 (CAS II Sequenz von Position 4055 bis Position 4662) die Transduktionsraten von 18.5% respektive 13.8%, deutlich niedriger als bei pMD24 (55.4%). Der bereits angesprochene Vektor p $\Delta\Phi$ (Trobridge *et al.*, 2002) enthält eine CAS II von 2.5 kb, welche die in pMD9 enthaltene CAS II umfaßt.

Interessanterweise wurden zusätzliche kleine interne Deletionen in der CAS II bei PFV (Position 3869 bis Position 5884) von Position 4664 bis 5216 toleriert (Heinkelein *et al.*, 1998). Dies legt die Vermutung nahe, daß die CAS II aus mindestens zwei Teilen besteht.

In den Sequenzen von 3869 bis 5884 liegt am 5'Ende von pol der interne Polypurintrakt. Bei PFV konnte gezeigt werden, daß vier potentielle PPTs vorliegen. Für HIV, welches ebenfalls einen internen PPT besitzt, konnte gezeigt werden, daß dieser an der Initiation des Plus-Stranges bei der reversen Transkription beteiligt ist und notwendig für eine effiziente Replikation in Zellkultur ist. PFV-Vektoren die, den internen PPT enthielten, aber sonst in der CAS II deletiert waren, zeigten deutliche Einbußen in der Transduktionseffizienz (Heinkelein *et al.*, 1998), was vermuten läßt, daß die Funktion der CAS II und die Funktion des internen PPT nicht identisch sind. Bei der genaueren Analyse der Funktion der CAS II konnte gezeigt werden, dass diese nicht für die Genexpression notwendig ist, aber der RNA Gehalt der Partikel bei Vektoren, die nicht die CAS II enthalten, von 90% auf 20% reduziert wird (Heinkelein *et al.*, 1998). Mittels Proteinanalyse von Vektorpartikeln ohne CAS II konnte gezeigt werden, daß die CAS II enthalten sein muß, um die Spaltung des Gag-Vorläuferproteins zu gewährleisten (Heinkelein *et al.*, 1998). Für die Infektiosität von PFV ist die Spaltung des Gag-Vorläuferproteins von entscheidender Bedeutung (Enssle *et al.*, 1997; Konvalinka *et al.*, 1995). Bei PFV wird Pol unabhängig von Gag von einer gespleissten Boten-RNA exprimiert. Für die Verpackung des Pol Proteins in das FV-Partikel ist

prägenomische RNA notwendig, wobei die virale RNA möglicherweise eine Verbindung zwischen Gag und Pol bei der Partikelformation herstellt (Heinkelein *et al.*, 2002a). Möglicherweise handelt es sich bei der CAS II um eine Verpackungssequenz für die RNA, oder die Anwesenheit der CAS II ist notwendig um die RNA im Partikel zu stabilisieren. Eine weitere Möglichkeit der Funktion der CAS II auf RNA Ebene könnte in der Interaktion mit dem Pol Protein bestehen. (Heinkelein *et al.*, 1998, Mergia and Heinkelein, 2003). Insgesamt bestehen somit Hinweise für eine Funktion der CAS II bei der Verpackung des Pol-Proteins in das Partikel und die Aufnahme von prägenomischer RNA in das Partikel.

Bei simian foamy virus type 1 (SFV-1) ist ebenfalls eine CAS II in der 3' Region von pol beschrieben (Position 5185 bis 5674)(Wu *et al.*, 1998). Diese Sequenz ist hochkonserviert und stimmt zu über 83% mit der entsprechenden Sequenz von PFV überein (Mergia and Luciw, 1991). Die bei SFV-1 beschriebene CAS II von 489 bp ist zum Teil in der von O. Erlwein beschriebenen CAS II für PFV (Position 4861 bis 5540) enthalten. Die in dieser Arbeit und von M. Heinkelein 1998 beschriebene CAS II für PFV (Position 3869 bis 5884) umfasst diese Sequenzen vollständig. In einer neueren Arbeit wurde für SFV 1 die CAS II als aus 2 Fragmenten bestehend angegeben (Park *et al.*, 2002). Der erste Teil der CAS II ist am Anfang von pol gelegen (Position 3137 bis 3733), der zweite Teil ist in der 3' Region von pol lokalisiert (Position 5200 bis 5693). Zusammen genommen hat diese SFV-1 CAS II eine Länge von 1089 bp. Diese Ergebnisse unterstützen, dass die CAS II nicht eine zusammenhängende Sequenz ist, sondern aus mindestens zwei Teilen besteht.

Bei der Untersuchung der Auswirkung der Lage der Expressionskassette in bezug auf die CAS II zeigte sich eindeutig eine bessere Transduktionsrate für die Konstrukte mit der Expressionskassette nach der CAS II. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt eine Veränderung der Sekundärstruktur der cis-aktiven Sequenzen durch Lageänderung der Expressionskassette dar, was zu einer Beeinträchtigung der Funktion dieser Sequenzen führen könnte. Eine weitere Erklärung für die schlechteren Transduktionsraten für die Konstrukte mit dem Markergen zwischen CAS I und CAS II könnte eine Interferenz zwischen dem CMV-Promotor und dem SFFV-U3 Promotor der Expressionskassette darstellen. Bei den Vektorkonstrukten mit der Expressionskassette nach der CAS II

wäre es möglich, daß sich die Promotor-Interferenz im Sinne eines Platzhalter-Effektes weniger ausgeprägt bemerkbar macht.

Eine detaillierte funktionale Analyse der Konstrukte mit verschiedener Lage der Expressionskassette, ist in Anbetracht der Zielsetzung, einen PFV-Vektor mit möglichst hohen Transduktionsraten herzustellen, nicht erfolgt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Publikationen zur Grösse und Lokalisation der CAS II lassen sich möglicherweise durch unterschiedliches Vektordesign oder unterschiedliche Transduktionsprotokolle erklären. So ist in dieser Untersuchung ein replikationsdefizientes Vektorsystem ohne Helfervirus verwendet worden, aber in der Untersuchung von O. Erlwein ist replikationskompetentes FOV-7 Helfervirus cotransfiziert worden. Die aktuellen Publikationen mit Daten aus helfervirusfreien Systemen legen den Schluß nahe, daß Vektortransfer mit den von Erlwein et al. publizierten deletierten CAS II Fragmenten zwar prinzipiell möglich ist, aber für einen optimalen PFV-Vektortransfer grössere CAS II Fragmente von 2,0 bis 2,5 kbp notwendig sind.

Abschliessend kann die Grösse und Lokalisation der CAS II wahrscheinlich erst aufgeklärt werden, wenn die genaue Funktion der CAS II, sowie ihre Rolle bei der Verpackung des Pol-Proteins bekannt ist, und ihre Rolle bei der Verpackung der pregenomischen RNA in die Kapside geklärt wurde. Es erscheint sinnvoll, die Konstrukte mit den unterschiedlichen beschriebenen CAS II im gleichen Vektorsystem an verschiedenen Institutionen parallel zu erproben, um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Eine empirische Methode die CAS II genauer zu bestimmen, wäre durch schrittweise interne Deletionen gegeben, aufbauend auf den Ergebnissen von M. Heinkelein 1998, in der eine interne Deletion der CAS II von Position 4664 bis 5216 toleriert wurde. Die Versuche zu diesen weiteren, auch internen, Deletionen werden gegenwärtig durchgeführt. In laufenden Experimenten zeichnet sich ab, daß die CAS II zweigeteilt ist, wobei der eine Teil für die Verpackung des Pol Proteins in das Partikel notwendig ist, während der andere Teil funktionelle Auswirkungen im Hinblick auf den Gehalt an pregenomischer RNA im Partikel hat (persönliche Mitteilung A. Rethwilm).

5.3. Konzentration von PFV-Vektoren durch Zentrifugation

Für die therapeutische Anwendung eines Vektorsystems zur Gentherapie ist es notwendig, die Vektoren in genügend hoher Konzentration herstellen zu können. Retroviren sind aufgrund ihrer Hülle, welche bei infektiösen Retroviren intakt sein muß, anfällig für physikalische Einwirkungen wie Zentrifugation oder Einfrieren. Retrovirale Partikel können mit dem Hüllprotein des vesicular stomatitis Virus G (VSV-G) pseudotypisiert werden, um eine größere Breite an Zielzellen transfizieren zu können (Akkina *et al.*, 1996; Burns *et al.*, 1993; Yee *et al.*, 1994). Durch das Pseudotypisieren mit VSV-G env gewinnt das Retrovirus deutlich an Stabilität und es lässt sich zentrifugieren (Yee *et al.*, 1994). Allerdings waren Versuche FV mit VSV-G env zu pseudotypisieren mit einem erheblichen Verlust an Transduktionseffizienz verbunden (Pietschmann *et al.*, 1999; Wu and Mergia, 1999). Daher ist es wichtig, ein geeignetes Konzentrations-Verfahren für PFV-Vektoren zu finden.

Es sind erfolgreiche Protokolle für die Konzentration von Viren durch Präzipitation der Viruspartikel mit Polyethylenglykol und anschließender Zentrifugation beschrieben worden. So lassen sich HIV, Cytomegalievirus (CMV), Maul und Klauenseuche (MKS) Viren, sowie Tabak Mosaik Viren erfolgreich mit PEG-Präzipitation konzentrieren (Bateman and Chant, 1979; Climpton *et al.*, 1990; Kaaden *et al.*, 1971; Kohno *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 1970). Das PEG präzipitiert die Viren, die sich dann mit relativ niedriger Beschleunigung unterhalb der Ultrazentrifugation pelletieren lassen. Aus diesem Grund ist das Verfahren der PEG-Präzipitation insbesondere für umhüllte Viren schonend, da die Hüllen durch hohe eine Beschleunigung Strukturschäden davontragen. Andere für PFV-Vektoren erfolgreiche Konzentrations-Verfahren sind die Ultrafiltration mit einer Porengröße von 100 kDa (Hill *et al.*, 1999). Hier konnte ein Überstand mit 5×10^2 Vektorpartikeln pro ml, 200-fach auf einen Vektortiter von 1×10^5 Vektorpartikel pro ml ohne Verlust an infektiösen Partikeln konzentriert werden. Weiterhin wurde in neueren Untersuchungen demonstriert PFV-Vektoren erfolgreich durch Ultrazentrifugation um den Faktor 100 ohne Verluste an Infektiösität konzentrieren zu können (Trobridge *et al.*, 2002).

Eine mögliche Erklärung für die relative Stabilität von PFV-Vektoren gegenüber z.B. HIV-Vektoren könnte in der Beschaffenheit des Glykoproteins, das aus drei

Untereinheiten mit zwei membranspannenden Domänen besteht, liegen (Lindemann *et al.*, 2001).

In der durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, daß durch Zentrifugation von PFV-Vektorüberstand bei 15000g für 30 Minuten die Konzentration um eine Zehnerpotenz erhöht werden kann, bei einem Verlust von ca. 50% der infektiösen Ausgangspartikel vor der Zentrifugation. Die Verwendung von PEG verbesserte dieses Ergebnis nicht.

Dieses Resultat war überraschend, da die Zentrifugation ohne PEG initial als Negativkontrolle vorgesehen war, und eine Pelletierung von freiem Vektor bei einer Beschleunigung von 15000g über 30 Minuten als unwahrscheinlich einzustufen ist. Für FV ist bekannt, dass bei Infektion einer Zelle *in vitro* die Mehrzahl der infektiösen Partikel innerhalb der Zelle bleibt und die infektiösen Partikel von intrazellären Kompartimenten knospen (Bodem *et al.*, 1997). Vor der Zentrifugation wurden die Überstände einem Gefrier-Auftau-Zyklus unterzogen, um intrazellulär „gefangene“ Partikel freizusetzen. Möglicherweise blieben trotz des Sterilfiltrierens eine Grosszahl der Partikel an Zellmembrandetritus gebunden, und liessen sich auf diese Weise durch niedrige Beschleunigungen pelletieren. Der ca. 50%ige Verlust an Infektiösität würde sich dann nicht durch Beschädigung der Partikel durch die Zentrifugation erklären, sondern durch zu niedrige Beschleunigung für eine Pelletierung der freien Partikel im Überstand.

Eine Feinabstimmung des empirischen Zentrifugationsprotokolls würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, aber sicherlich ist durch Optimierung der Parameter des hier beschriebenen Zentrifugationsvorganges und der Rahmenbedingungen ein deutlich besseres Ergebnis zu erreichen. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgetestet, wie erfolgreich die Zentrifugation zur Produktion höherer Konzentrationsstufen, z.B. um den Faktor 100 oder 500, anwendbar ist, und ob sich tatsächlich der 50%ige Verlust an Infektiösität im nicht pelletierten Überstand nach Zentrifugation wiederfinden lässt. Ein Vorteil der hier beschriebenen Zentrifugation im Vergleich zur Ultrafiltration oder Ultrazentrifugation ist das einfache, zeitsparende und kosteneffiziente Protokoll.

5.4. Lagerung von PFV-Vektoren mit DMSO bei -80°C

Ein weiteres Problem in der Anwendung und Erforschung von Vektoren ist die geeignete Lagerung von Vektorüberstand zur späteren Applikation (Higashikawa and Chang, 2001). Insbesondere bei Viren mit Hüllen ergeben sich beim Einfrieren deutliche Verluste an infektiösen Partikeln, was sich bei wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen erheblich verstärkt (Wallis and Melnick, 1968). So sind für verschiedene umhüllte Viren Lagerungsmethoden mit Zugabe von DMSO (Wallis and Melnick, 1968), Glycerol, Sorbitolzucker, Milch und Proteine beschrieben. Bei VSV-G konnte mit Zugabe von DMSO nach vier Gefrier-Auftau-Zyklen bei -40°C eine vollständig erhaltene Infektiösität gezeigt werden (Wallis and Melnick, 1968). Der kryoprotektive Mechanismus von DMSO bei der Lagerung von Zellen wird auf eine Herabsetzung der Denaturierung von Lipoproteinen und Lipiden zurückgeführt (Lovelock, 1957). Da umhüllte Viren einen Teil der Plasmamembran der Wirtszelle enthalten und die intakte Hülle für die Infektiösität notwendig ist, scheint ein ähnlicher Mechanismus bei Lagerung von Viren mit DMSO vorzuliegen (Wallis and Melnick, 1968).

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zu Lagerung von PFV-Vektoren mit und ohne DMSO bei -80°C zeigen einen deutlichen kryoprotektiven Effekt für die Lagerung von PFV-Vektoren mit DMSO. Es ist gelungen, den Verlust von infektiösen Partikeln durch Einfrieren mit DMSO und Lagerung über 2 Wochen um den Faktor 3 bis 4 zu reduzieren. Wie sich Resultate durch einen wesentlichen längeren Lagerungszeitraum, z.B. 12 Monate, verändern wurde nicht untersucht. Ob die Vektoren Schaden durch die Dauer der Lagerung oder den Einfrierungsvorgang per se nehmen muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Da sich Vektorüberstand portioniert einfrieren lässt, stellt sich das Problem des wiederholten Einfrierens und Auftauens in der Praxis weniger. Genaue Untersuchungen zur Stabilität von Vektoren abhängig von Temperatur, pH Wert, Transportmedium sowie Lagerung liegen nur in begrenzter Form vor (Higashikawa and Chang, 2001). Es ist zu vermuten, dass der Wirkmechanismus der kryoprotektiven Wirkung von DMSO bei der Lagerung von PFV-Vektoren analog zu den beschriebenen Verfahren zur Lagerung von anderen Viren und Zellen mit DMSO ist.

5.5. Potential foamyviraler Vektoren

Ein idealer Vektor müsste verschiedene Merkmale und Eigenschaften aufweisen. Der Vektor muss in der Lage sein die gewünschten Ziellzellen, in welchen das therapeutische Gen benötigt wird, infizieren zu können. Idealerweise würde dieser Vektor ausschliesslich die Zielzellen infizieren. Der Vektor soll das therapeutische Gen effizient übertragen und integrieren. Dieser Vektor hätte ein hohes Verpackungslimit, um auch große therapeutische Gene, oder mehrere Gene, in Zellen einbringen zu können. Das Markergen soll von den Zielzellen effizient exprimiert werden. Weiterhin dürften keine Antikörper gegen den Vektor in der Bevölkerung verbreitet sein, um eine unerwünschte Neutralisation des Vektors zu vermeiden. Grosse Bedeutung würde der Produktion von Vektoren in hoher Menge und Konzentration für klinische Anwendungen zukommen (Hill *et al.*, 1999; Mergia and Heinkelstein, 2003; Russell and Miller, 1996). Foamyviren weisen einige dieser Eigenschaften auf, was sie als Vektoren für therapeutische Anwendungen interessant macht.

Foamyviren können ein breites Spektrum von Zielzellen infizieren (vgl. 1.1.2.). Des Weiteren können Foamyviren in proliferierende sowie in ruhende G₀-Phase Zellen nach erfolgter Stimulation integrieren (Bieniasz *et al.*, 1995b; Trobridge and Russell, 2004). Es wurde gezeigt, daß PFV-Vektoren pluripotente humane hämatopoetische Stammzellen mit hoher Effizienz transduzieren können. Die transduzierten Stammzellen wurden erfolgreich in NOD/SCID (non obese diabetic/ severe combined immuno deficiency) Mäuse transplantiert und exprimierten das Markergen stabil. In Experimenten mit minimalen Stimulationsprotokollen waren die Transduktionsraten für CD34+ hämatopoetischen Stammzellen durch PFV-Vektoren vergleichbar mit den Transduktionsraten lentiviraler Vektoren. Im Vergleich der Transduktionsraten für CD34+ hämatopoetischen Stammzellen durch PFV-Vektoren und MuLV-Vektoren zeigten sich die PFV-Vektoren überlegen (Josephson *et al.*, 2004; Josephson *et al.*, 2002; Leurs *et al.*, 2003). Von allen bekannten und charakterisierten Retroviren haben Foamyviren das grösste Genom und daher vermutlich ein höheres Verpackungslimit als andere retrovirale Vektoren (Schmidt und Rethwilm, 1995). FV lassen sich durch Zentrifugation oder Ultrafiltration ohne Verluste konzentrieren. Antikörper gegen FV sind in der Bevölkerung aufgrund der geringen Prävalenz von FV nicht verbreitet. Die

Suche nach Pathogenität *in vivo* blieb bisher erfolglos, was ein nicht zu unterschätzender Vorteil von foamyviralen Vektoren gegenüber lentiviralen Vektoren darstellt. Selbst wenn es gelingt lentivirale Vektoren nach wissenschaftlichem Maßstab sicher zu konstruieren, würde bei einem Großteil der Bevölkerung erhebliche Bedenken bezüglich der Sicherheit einer Gen-Therapie mit auf HIV basierenden Vektoren bestehen. Es wird einem Patienten im Rahmen einer klinischen Anwendung schwer vermittelbar sein, dass zur Heilung seiner Krankheit ein modifiziertes HI-Virus appliziert werden muß.

Ein anderer und interessanter Ansatz für die Anwendung von replikationsdefizienten Foamyvirus-Vektoren besteht in der Hybridisierung der PFV-Vektoren mit Adenovirus-Vektoren. Adenovirus-Vektoren können in hoher Konzentration hergestellt werden und verfügen über ein hohes Verpackungslimit und können effizient ruhende Zellen infizieren. Die Nachteile von Adenovirusvektoren bestehen darin, dass der Vektor nicht in das Genom der Zielzelle integriert und, dass die Vektoren eine Immunreaktion beim Wirt aufgrund der hohen Antikörperprävalenz auslösen können. Durch Einsetzen eines replikationsdefizienten Foamyvirus-Vektor in einen Adenovirus-Vektor wird versucht die Vorteile beider Vektoren zu kombinieren (Picard-Maureau *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2004).

Es existieren aber noch zahlreiche offene Fragen, die beantwortet werden müssen, bevor eine standardisierte klinische Anwendung von PFV-Vektoren an Menschen in Erwägung gezogen werden kann. So wird es notwendig sein, die genauen Loci der Integration für FV festzustellen um eine mögliche akzidentielle Aktivierung von Protoonkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zu untersuchen. Des Weiteren ist es bisher nicht gelungen Verpackungs-Zellen für FV-Vektoren herzustellen (Mergia and Heinkelein, 2003). Für die Verbesserung von bestehenden Vektoren müssen die cis-aktiven Sequenzen und der Mechanismus der Verpackung des Pol Proteins und der RNA noch genauer charakterisiert werden.

Insgesamt erscheinen FV insbesondere durch ihre molekularbiologischen Besonderheiten, der fehlenden Pathogenität und dem breiten Spektrum an Zielzellen als vielversprechende Substrate zur Konzeption von retroviralen Vektoren.

6. Zusammenfassung

Ein bestehendes replikationsinkompetentes PFV-Vektorsystem sollte charakterisiert und optimiert werden. Dieses Ziel sollte durch Ergänzung von zusätzlichen Sicherheitsmassnahmen und der Verringerung der enthaltenen viralen Sequenzen erreicht werden.

Basierend auf einem replikationsdefizienten PFV-Vektor wurde in dieser Arbeit ein modifizierter PFV-Vektor konstruiert. Dieser Vektor enthält die minimalen für eine effiziente Transduktion benötigten Sequenzen (Gesamtgröße 3,1 kbp) und ein theoretisches Verpackungslimit von 8,5 kb sowie zusätzliche Sicherheitsmerkmale. Die 3' U3-Region wurde auf eine Grösse von 442 bp reduziert, enthalten sind 5' Sequenzen der U3-Region und der Übergang von der U3 in die R-Region. Diese Massnahme erhöht das Verpackungslimit und schaltet eine mögliche Aktivierung des U3-Promotors in Abwesenheit des foamyviralen Transaktivators (Tas) durch zelluläre Transkriptionsfaktoren aus. Zur Vermeidung einer aberranten Proteinexpression wurde das gag Startkodon durch Mutation ausgeschaltet, und ein Stopkodon in den gag-Leseraster eingefügt. Mittels Western-Blot wurde das Ausbleiben der Gag-Expression bestätigt. Sowohl die für einen optimalen Gentransfer benötigte Grösse der cis-aktiven Sequenzen des Vektors, als auch die bevorzugte Lage der cis-aktiven Sequenzen des Vektors in Bezug auf die Expressionkassette des Vektors wurden ermittelt. Der Vektor wurde in Modulbauweise konzipiert, um ein einfaches Austauschen der einzelnen Komponenten zu gewährleisten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Modifikationen am Vektor keine negativen Auswirkungen auf die Transduktionsraten gegenüber dem Ausgangsvektor hatten. Mit dem Vektor pMD11 konnten Vektortiter von $6,4 \times 10^4$ infektiöse Partikel pro ml Überstand generiert werden.

Ein Zentrifugationsprotokoll für PFV-Vektoren zur Steigerung des Vektor-Titers auf das zwanzigfache des Ursprungs-Vektortiters bei 15000g wurde beschrieben und charakterisiert. Eine erfolgreiche Methode zur Kryoprotektion von PFV-Vektoren durch Zugabe von DMSO und Lagerung bei -80°C wurde entwickelt und quantifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein PFV-Vektor mit minimalen viralen Sequenzen und dadurch gesteigertem Verpackungslimit sowie zusätzlichen Sicherheitsmerkmalen

hergestellt. Die charakterisierten Verfahren zur Konzentrierung und Lagerung von PFV-Vektoren sind effizient und unterstützen zukünftige Applikationen des Vektors.

7. Literatur

- Achong, B., Mansell, P., Epstein, M., and Clifford, P. (1971): An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **46**, 299 - 302.
- Akkina, R., Walton, R., Chen, M., Li, Q., Planelles, V., and Chen, I. (1996): High efficiency gene transfer into CD 34+ cells with a human immunodeficiency virus typ1 based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *J. Virol* **70**, 2581 - 2585.
- Ali, M., Taylor, G. P., Pitman, R. J., Parker, D., Rethwilm, A., Cheingsong-Popov, R., Weber, J. N., Bieniasz, P. D., Bradley, J., and McClure, M. O. (1996): No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 1473-83.
- Anderson, F. (1998): Human gene therapy. *Nature* **392**, 25 - 30.
- Bateman, J., and Chant, S. (1979): A modification of the polyethylene glycol technique for the purification of small quantities of tobacco mosaic virus. *Microbios.* **99**, 33 - 43.
- Baunach, G., Maurer, B., Hahn, H., Kranz, M., and Rethwilm, A. (1993): Functional analysis of human foamy virus accessory reading frames. *J Virol* **67**, 5411-8.
- Berkowitz, R., Fischer, J., and Goff, S. P. (1996): RNA packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**, 177 - 218.
- Bieniasz, P. D., Erlwein, O., Aguzzi, A., Rethwilm, A., and McClure, M. O. (1997): Gene transfer using replication-defective human foamy virus vectors. *Virology* **235**, 65-72.
- Bieniasz, P. D., Rethwilm, A., Pitman, R., Daniel, M. D., Chrystie, I., and McClure, M. O. (1995a): A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from a gorilla. *Virology* **207**, 217-28.
- Bieniasz, P. D., Weiss, R. A., and McClure, M. O. (1995b): Cell cycle dependence of foamy retrovirus infection. *J Virol* **69**, 7295-9.
- Bock, M., Heinkelein, M., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (1998): Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology* **250**, 194-204.

- Bodem, J., Löchelt, M., Yang, P., and Flügel, R. M. (1997): Regulation of gene expression by human foamy virus and potentials of foamy viral vectors. *Stem Cells* **15**, 141-7.
- Burns, J., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J. (1993): Vesicular Stomatitis Virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer in to mammalian und nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8033 - 8037.
- Climpton, C., Corbitt, G., and Morris, D. (1990): Comparison of polyethylene glycol precipitation and ultracentrifugation for recovery of cytomegalivirus from urine prior to detection of DNA by dot-blot hybridisation. *J Virol Methods* **28**, 141 - 145.
- Enders, J., and Peebles, T. (1954): Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med*, 277 - 286.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U., and Rethwilm, A. (1997): Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* **71**, 7312-7.
- Erlwein, O., Bieniasz, P. D., and McClure, M. O. (1998): Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J Virol* **72**, 5510-6.
- Erlwein, O., Cain, D., Fischer, N., Rethwilm, A., and McClure, M. O. (1997): Identification of sites that act together to direct dimerization of human foamy virus RNA in vitro. *Virology* **229**, 251-8.
- Erlwein, O., and Rethwilm, A. (1993): BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology* **196**, 256-68.
- Falcone, V., Schweizer, M., and Neumann-Haefelin, D. (2003): Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr Top Microbiol* **277**, 161 - 180.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Muller, J. G., and Rethwilm, A. (1998): Foamy virus particle formation. *J Virol* **72**, 1610-5.
- Flügel, R. M., Rethwilm, A., Maurer, B., and Darai, G. (1987): Nucleotide sequence analysis of the env gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus

- reveals two novel genes [published erratum appears in EMBO J 1990 Nov;9(11):3806]. *Embo J* **6**, 2077-84.
- Goepfert, P. A., Ritter, G. D., Jr., Peng, X., Gbakima, A. A., Zhang, Y., and Mulligan, M. J. (1996): Analysis of west African hunters for foamy virus infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 1725-30.
- Goepfert, P. A., Shaw, K., Wang, G., Bansal, A., Edwards, B. H., and Mulligan, M. J. (1999): An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol* **73**, 7210-7.
- Green, J., Begley, C., Wagner, D., and Waldmann, T. (1989): trans activation of granulocyte-macrophage co-stimulating factor and the interleukin-2 receptor transgenic mice carrying the T-cell lymphotropic virus type 1 tax gene. *Mol Cell Biol* **11**, 4731 - 7.
- He, F., Blair, W. S., Fukushima, J., and Cullen, B. R. (1996): The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein. *J Virol* **70**, 3902-8.
- He, F., Sun, J. D., Garrett, E. D., and Cullen, B. R. (1993): Functional organization of the Bel-1 trans activator of human foamy virus. *J Virol* **67**, 1896-904.
- Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2002a): Improved Primate Foamy Virus Vectors and Packaging Constructs. *Journal of Virology* **76**, 3774 - 3783.
- Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H., and Rethwilm, A. (2002b): Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of Pol polyprotein into foamy virus capsids. *J. Virol* **76**, 10069 - 73.
- Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenroder, O., and Rethwilm, A. (2000a): Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *Embo J* **19**, 3436-45.
- Heinkelein, M., Rammling, M., Juretzek, T., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2003): Retrotransposition and Cell to Cell Transfer of Foamy Viruses. *J. Virol* **77**, 11855 - 11858.

- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J., and Rethwilm, A. (1998): Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol* **72**, 6307-14.
- Heinkelein, M., Thurow, J., Dressler, M., Imrich, H., Neumann-Haefelin, D., McClure, M. O., and Rethwilm, A. (2000b): Complex effects of deletions in the 5' untranslated region of primate foamy virus on viral gene expression and RNA packaging. *J Virol* **74**, 3141-8.
- Heneine, W., Switzer, W. M., Sandstrom, P., Brown, J., Vedapuri, S., Schable, C. A., Khan, A. S., Lerche, N. W., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D., Chapman, L. E., and Folks, T. M. (1998): Identification of a human population infected with simian foamy viruses [see comments]. *Nat Med* **4**, 403-7.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E. K., Murthy, K. K., Schneider, J., Mergia, A., and Luciw, P. A. (1994): Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* **201**, 187-99.
- Herchenröder, O., Turek, R., Neumann-Haefelin, D., Rethwilm, A., and Schneider, J. (1995): Infectious proviral clones of chimpanzee foamy virus (SFVcpz) generated by long PCR reveal close functional relatedness to human foamy virus. *Virology* **214**, 685-9.
- Higashikawa, F., and Chang, L. (2001): Kinetic Analyses of Stability of Simple and Complex Retroviral Vectors. *Virology* **280**, 123 - 131.
- Hill, C. L., Bieniasz, P. D., and McClure, M. O. (1999): Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol* **80**, 2003-9.
- Hirata, R. K., Miller, A. D., Andrews, R. G., and Russell, D. W. (1996): Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors. *Blood* **88**, 3654-61.
- Hooks, J. J., and Gibbs, C. J., Jr. (1975): The foamy viruses. *Bacteriol Rev* **39**, 169-85.
- Imrich, H., Heinkelein, M., Herchenröder, O., and Rethwilm, A. (2000): Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus. *Journal of General Virology* **81**, 2941 - 2947.
- Inder, V., and Nikunj, S. (1997): Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239 - 242.

- Johnson, R., Rosa, J. d. I., Abher, I., Kertayadnya, I., Entwistle, K., Fordyce, G., and Holroyd, R. (1988): Epidemiological studies of bovine spumavirus. *Vet Microbiol* **16**, 25 - 33.
- Josephson, N., Trobridge, G., and Russel, D. (2004): Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors. *Hum Gene Ther.* **15**, 87 - 92.
- Josephson, N., Vassilopoulos, G., Trobridge, G., Priestley, G., Wood, B., Papaynnopoulou, T., and Russel, D. (2002): Transduction of human NOD/SCID- repopulating cells with both lymphoid und myeloid potential by foamy virus vectors. *Medical Sciences* **99**, 8295 - 8300.
- Kaaden, O. R., Dietzschold, B., Matheka, H. D., and Tokui, T. (1971): Konzentrierung und Reinigung von Maul-und-Klauenseuche-(MSK) Virus durch Polyäthylenglykol (PEG). *Archiv für die gesamte Virusforschung* **35/1**, 554-559.
- Kang, Y., Blair, W. S., and Cullen, B. R. (1998): Identification and functional characterization of a high-affinity Bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter. *J Virol* **72**, 504-11.
- Keller, A., Partin, K. M., Löchelt, M., Bannert, H., Flügel, R. M., and Cullen, B. R. (1991): Characterization of the transcriptional trans activator of human foamy retrovirus. *J Virol* **65**, 2589-94.
- Kim, V., Mitrophanous, K., Kingsman, S., and Kingsman, A. (1998): Minimal requirement for a lentiviral vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* **72**, 811 - 816.
- Kohno, T., Mohan, S., Goto, T., Morita, C., Nakano, T., Hong, W., Sangco, J., Morimatsu, S., and Sano, K. (2002): A new improved method for the concentration of HIV-1 infective particles. *J. Virol. Methods* **106**, 167 - 173.
- Konvalinka, J., Löchelt, M., Zentgraf, H., Flügel, R. M., and Kräusslich, H. G. (1995): Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J Virol* **69**, 7264-8.
- Kuwabara, H., Katanaka, J., Nagai, M., Uda, H., Hojo, W., Yamada, A., Miki, H., Takeuchi, H., Teranishi, K., Matsuda, K., and et al. (1993): Human T lymphotropic virus type I associated myelopathy with pulmonary and cutaneous lesions. *J Clin Pathol* **46**, 273-5.

- Lee, A. H., Lee, H. Y., and Sung, Y. C. (1994): The gene expression of human foamy virus does not require a post-transcriptional transactivator. *Virology* **204**, 409-13.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollock, K., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D., and Hanenberg, H. (2003): Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD 34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* **10**, 509 - 519.
- Liaw, Y. F., Huang, M. J., Fan, K. D., Li, K. L., Wu, S. S., and Chen, T. J. (1993): Hepatic injury during propylthiouracil therapy in patients with hyperthyroidism. A cohort study. *Ann Intern Med* **118**, 424-8.
- Lindemann, D., Bock, M., Schweizer, M., and Rethwilm, A. (1997): Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J Virol* **71**, 4815-20.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., and Rethwilm, A. (2001): A particle associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J. Virol* **75**, 5762 - 71.
- Lindemann, D., and Rethwilm, A. (1998): Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J Virol* **72**, 4088-94.
- Linial, M. (2000): Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol* **8**, 284-9.
- Linial, M. L. (1999): Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* **73**, 1747-55.
- Linial, M. L., and Miller, A. D. (1990): Retroviral RNA packaging sequence requirements and implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**, 125 - 152.
- Löchelt, M., Aboud, M., and Flügel, R. M. (1993a): Increase in the basal transcriptional activity of the human foamy virus internal promoter by the homologous long terminal repeat promoter in cis. *Nucleic Acids Res* **21**, 4226-30.
- Löchelt, M., Flügel, R. M., and Aboud, M. (1994): The human foamy virus internal promoter directs the expression of the functional Bel 1 transactivator and Bet protein early after infection. *J Virol* **68**, 638-45.

- Löchelt, M., Muranyi, W., and Flügel, R. M. (1993b): Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7317-21.
- Lovelock, J. (1957): Denaturation of lipoprotein complexes as a cause of damage by freezing. *Cryobiology* **2**, 99-108.
- Mahieux, R., and Gessain, A. (2003): HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rev. Clin. Exp. Hematol.*, 336 - 361.
- Mann, R., Mulligan, R., and Baltimore, D. (1983): Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**, 153 - 159.
- Mayors, J. E. (1992): Retroviral vectors - strategies and applications. *Virology* **3**, 285 - 295.
- Meiering, C. D., and Linial, M. L. (2002): Reactivation of a complex retrovirus is controlled by a molecular switch and is inhibited by a viral protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15130 - 5.
- Mergia, A. (1994): Simian foamy virus type 1 contains a second promoter located at the 3' end of the env gene. *Virology* **199**, 219-22.
- Mergia, A., and Heinkelein, M. (2003): Foamy virus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* **277**, 131 - 159.
- Mergia, A., and Luciw, P. A. (1991): Replication and regulation of primate foamy viruses. *Virology* **184**, 475-82.
- Mergia, A., Renshaw-Gegg, L. W., Stout, M. W., Renne, R., and Herchenroeder, O. (1993): Functional domains of the simian foamy virus type 1 transcriptional transactivator (Taf). *J Virol* **67**, 4598-604.
- Mergia, A., and Wu, M. (1998): Characterization of provirus clones of simian foamy virus type 1. *J Virol* **72**, 817-22.
- Miller, A. D. (1992): Retroviral Vectors. *Curr. Top. Microbiol Immunolo* **158**, 1 - 24.
- Miller, A. D. (1997): Development and applications of retroviral vectors. *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, H.E. Varmus. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, 437 - 473.

- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O., and Rethwilm, A. (1997): Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* **71**, 7305-11.
- Morozov, V. A., Copeland, T. D., Nagashima, K., Gonda, M. A., and Oroszlan, S. (1997): Protein composition and morphology of human foamy virus intracellular cores and extracellular particles. *Virology* **228**, 307-17.
- Muranyi, W., and Flugel, R. M. (1991): Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J Virol* **65**, 727-35.
- Naldini, L. (1998): Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non -dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 457 - 463.
- Nestler, U., Heinkelein, M., Lucke, M., Meixensberger, J., Scheurlen, W., Kretschmer, A., and Rethwilm, A. (1997): Foamy virus vectors for suicide gene therapy. *Gene Ther* **4**, 1270-7.
- Netzer, K. O., Rethwilm, A., Maurer, B., and ter Meulen, V. (1990): Identification of the major immunogenic structural proteins of human foamy virus. *J Gen Virol* **71**, 1237-41.
- Neumann-Haefelin, D., Rethwilm, A., Bauer, G., Gudat, F., and zur Hausen, H. (1983): Characterization of a foamy virus isolated from Cercopithecus aethiops lymphoblastoid cells. *Med Microbiol Immunol* **172**, 75-86.
- Neumann-Haefelin, D., Schweizer, M., Corsten, B., and Matz, B. (1986): Detection and characterization of infectious DNA intermediates of a primary foamy virus. *J Gen Virol* **67**, 1993-9.
- Orlic, D. (1996): The level of mRNA encoding the amphotropic retrovis receptor in mouse and human hematopoetic stem cells is lo, and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 11097 - 11102.
- Park, J., Nadeau, P., and Mergia, A. (2002): A Minimal Genome Simian Foamy Virus Type 1 Vector System with Efficient Gene Transfer. *Virology* **302**, 236 - 244.
- Pfrepfer, K. I., Rackwitz, H. R., Schnolzer, M., Heid, H., Löchelt, M., and Flügel, R. M. (1998): Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J Virol* **72**, 7648-52.

- Picard-Maureau, M., Kreppel, F., Lindemann, D., Juretzek, T., Herchenröder, O., Rethwilm, A., Kochanek, S., and Heinkelein, M. (2004): Foamy virus: adenovirus hybrid vectors. *Gene Therapy* **0**, 1 - 7.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (1999): Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* **73**, 2613-21.
- Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2000): An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J Virol* **74**, 4474-82.
- Ramsey, W., Mullen, C., and Blaese, R. (1995): Retrovirus mediated gene transfer as therapy of adenosine deaminase (ADA) deficiency. *Leukemia*, 70.
- Rethwilm, A. (1996): Unexpected replication pathways of foamy viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **13**, S248-53.
- Rethwilm, A. (2003): The replication strategy of foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* **277**, 1 - 26.
- Rethwilm, A., Erlwein, O., Baunach, G., Maurer, B., and ter Meulen, V. (1991): The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 941-5.
- Rosener, M., Hahn, H., Kranz, M., Heeney, J., and Rethwilm, A. (1996): Absence of serological evidence for foamy virus infection in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Virol* **48**, 222-6.
- Russell, D. W., and Miller, A. D. (1996): Foamy virus vectors. *J Virol* **70**, 217-22.
- Russell, R.A. and Vassaux, G. (2004): Transient foamy virus vector production by adenovirus vectors. *Gene Ther.* **11**, 310 -316.
- Saib, A., Puvion-Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J., and de The, H. (1997): Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J Virol* **71**, 1155-61.
- Sandstrom, P. A., Phan, K. O., Switzer, W. M., Fredeking, T., Chapman, L., Heneine, W., and Folks, T. M. (2000): Simian foamy virus infection among zoo keepers [letter]. *Lancet* **355**, 551-2.

- Schliephake, A. W., and Rethwilm, A. (1994): Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol* **68**, 4946-54.
- Schmidt, M., Herchenröder, O., Heeney, J., and Rethwilm, A. (1997): Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus. *Virology* **230**, 167-78.
- Schmidt, M., and Rethwilm, A. (1995): Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* **210**, 167-78.
- Schweizer, M., Falcone, V., Gange, J., Turek, R., and Neumann-Haefelin, D. (1997): Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J Virol* **71**, 4821-4.
- Schweizer, M., Turek, R., Reinhardt, M., and Neumann-Haefelin, D. (1994): Absence of foamy virus DNA in Graves' disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 601-5.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E., Griffith, J., Romano, S., Kingsman, M., and Kingsman, A. (1995): A transient three plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* **23**, 628 - 633.
- Switzer, W. M., and Bhullar, V. (2004): Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J Virol* **78**, 2780 - 9.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemin, M. C., Lecellier, C. H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M. L., de The, H., and Saib, A. (2000): Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol* **74**, 4064-73.
- Trobridge, G., N., J., Vassilopoulos, G., Mac, J., and Russel, D. (2002): Improved Foamy Virus Vectors with minimal Viral Sequences. *Molecular Therapy* **6**, 321 - 328.
- Trobridge, G., and Russel, D. (2004): Cell Cycle Requirement for Transduction by Foamy Virus Vectors Compared to Those of Oncovirus and Lentivirus Vectors. *J. Virol* **78**, 2327 bis 2335.
- Trobridge, G. D., and Russell, D. W. (1998): Helper-free foamy virus vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 2517-25.
- Wagner, G., Card, J. L., and M., C. K. (1970): Immunochemical Studies of Foot-and-Mouth Disease. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **30**, 343-352.
- Wallis, C., and Melnick, L. (1968): Stabilization of Enveloped Viruses by Dimethyl Sulfoxide. *Journal of Virology* **2**, 953-954.

- Weiss, R. A. (1988): Foamy retroviruses. A virus in search of a disease [news]. *Nature* **333**, 497-8.
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flügel, R. M., and Löchelt, M. (2000): The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol* **74**, 2885-7.
- Winkler, I. G., Löchelt, M., Levesque, J. P., Bodem, J., Flügel, R. M., and Flower, R. L. (1997): A rapid streptavidin-capture ELISA specific for the detection of antibodies to feline foamy virus. *J Immunol Methods* **207**, 69-77.
- Wu, M., Chari, S., Yanchis, T., and Mergia, A. (1998): cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol* **72**, 3451-4.
- Wu, M., and Mergia, A. (1999): Packaging cell lines for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol* **73**, 4498-501.
- Yee, J., Miyanochara, A., LaPorte, P., Bouic, K., Burns, J., and Friedmann, T. (1994): A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9564 - 9568.
- Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S., and Linial, M. L. (1996a): Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* **271**, 1579-82.
- Yu, S. F., Edelmann, K., Strong, R. K., Moebes, A., Rethwilm, A., and Linial, M. L. (1996b): The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J Virol* **70**, 8255-62.
- Yu, S. F., and Linial, M. L. (1993): Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay. *J Virol* **67**, 6618-24.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D., and Linial, M. L. (1999): Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* **73**, 1565-72.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Marco Dressler
Geburtsdatum 29.12.1975
Geburtsort Brüssel
Anschrift Hühnenbergstrasse 2
6000 Luzern

Email: marco_dressler@web.de
Telefon 0041/765225130
Familienstand ledig

Schulausbildung

09/1982-07/1986 Grundschule, Ebern, Bayern
09/1986-07/1995 Friedrich-Rückert Gymnasium, Ebern, Bayern
Abschluss: Abitur, Grosses Latinum

Hochschulausbildung

11/1995 bis Julius-Maximilians-Universität Würzburg:
05/2002 Studiengang Humanmedizin

Praktische Erfahrung

04-08 /2001 Praktisches Jahr Tertial, Mayo General Hospital, Irland; Abteilung
Chirurgie
08-12 /2001 Praktisches Jahr Tertial im Kantonalen Spital Sursee, Schweiz;
Abteilung Medizin.
12-03/2002 Praktisches Jahr Tertial in der Neurologischen Klinik der Universität
Würzburg, Deutschland.
09/2002 bis Assistenzarzt im Kantonalen Spital Sursee, Schweiz; Abteilung Innere
09/2004 Medizin
Seit 10/2004 Assistenzarzt Medizin Kantonsspital Luzern; Abteilung Innere Medizin