

# **Herstellung und Anwendungen eines replikationsinkompetenten lentiviralen Vektorsystems**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Gergely Jármy  
aus Budapest

Würzburg, 2001

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel .....

Gutachter: Priv. Doz. Dr. C. Jassoy .....

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Danksagung**

Mein Dank gilt

an erster Stelle Dr. Christian Jassoy, der mir meine Promotion in Deutschland ermöglichte und der meine Arbeit mit sehr großem Interesse betreut hat.

Prof. Dr. Jürgen Kreft für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine Bereitschaft die Zweitkorrektur zu übernehmen.

Prof. Dr. Axel Rethwilm, Dr. Martin Heinkelein, Dr. Dirk Lindemann und Dr. Benedikt Weissbrich für die umfassende Betreuung und hilfreiche Unterstützung.

allen Kolleginnen und Kollegen im Labor für die freundliche Aufnahme.

Carina, die Margies [m], Moni, Thomas und alle meinen Freunde für die unvergessliche Würzburger Zeit.

Meinen Eltern für alles.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Lentiviren

Lentiviren lassen sich aufgrund ihrer taxonomischen Charakteristika, wie Struktur, Aufbau und Eigenheiten des Replikationsverhaltens, in die Familie der Retroviren einordnen (Coffin, 1992). Lentivirale Partikel haben einen Durchmesser von 80-100 nm und enthalten ein 8-9 kB großes einzelsträngiges, lineares, unsegmentiertes, in diploider Form vorliegendes RNA-Genom in Plusstrangorientierung, welches nach der Infektion der Zielzelle durch die virale Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wird. Das andere besondere Merkmal der ganzen Familie ist, dass diese doppelsträngige DNA durch die viruseigene Integrase in das Genom der Zielzelle integriert wird.

Die Lentiviren weisen verschiedene morphologische und genetische Unterschiede auf, nach denen sie in ein eigenes Genus eingeordnet wurden (Joag et al., 1996). Im Gegensatz zu anderen Retroviren, haben Lentiviren konische Kapside. Sie sind komplexe Retroviren, die neben den für die Strukturproteine (*gag*, *env*) und für die Replikation der Viren notwendigen viralen Enzyme kodierenden Gene (*pol*) zusätzliche akzessorische offene Leseraster besitzen, wie z.B. *tat* (*tax*) und *rev*, die bisher nur bei den Lentiviren identifiziert worden sind. Diese regulatorische Gene sind neben anderen Funktionen dafür verantwortlich, dass die lentivirale Genexpression in zwei Phasen erfolgt (Kim et al., 1989).

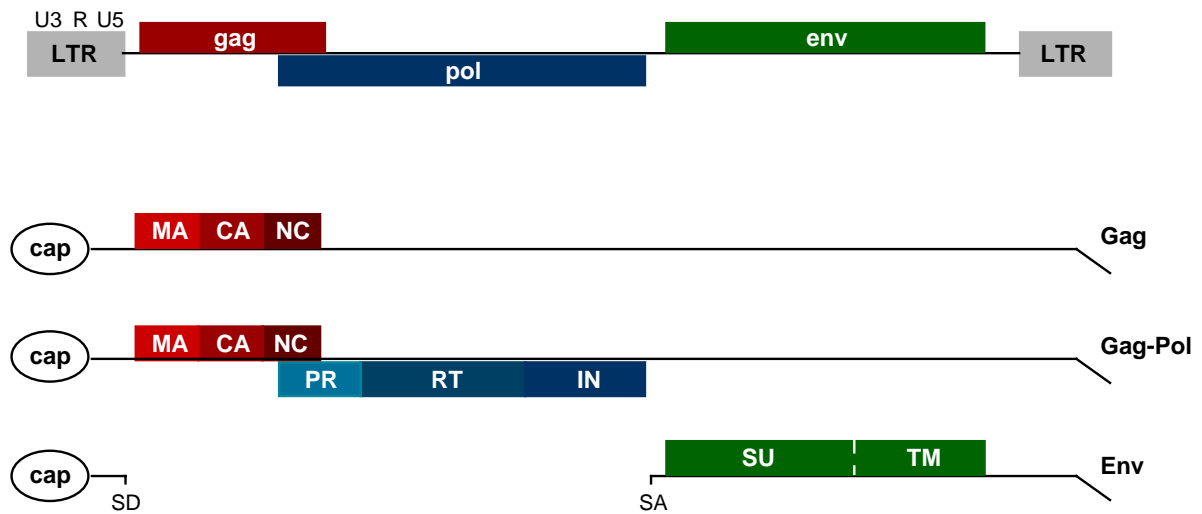
Vertreter dieser Virusgruppe wurden aus verschiedenen Primatenspezies und anderen Säugetieren, wie Schafen, Ziegen, Katzen, Rindern und Pferden isoliert (Joag et al., 1996). Im natürlichen Wirt etablieren die Lentiviren persistierende Infektionen, die meist chronische und langsam fortschreitende entzündliche Erkrankungen hervorrufen, weshalb sie ihren spezifischen Namen bekommen haben (lat.: *lenti* = langsam). Ein charakteristischer Vertreter der Lentiviren ist das Humane Immundefizienzvirus (HIV), der Erreger des erworbenen Immundefizienzsyndroms (AIDS).

### 1.1.1. Aufbau und virale Proteine

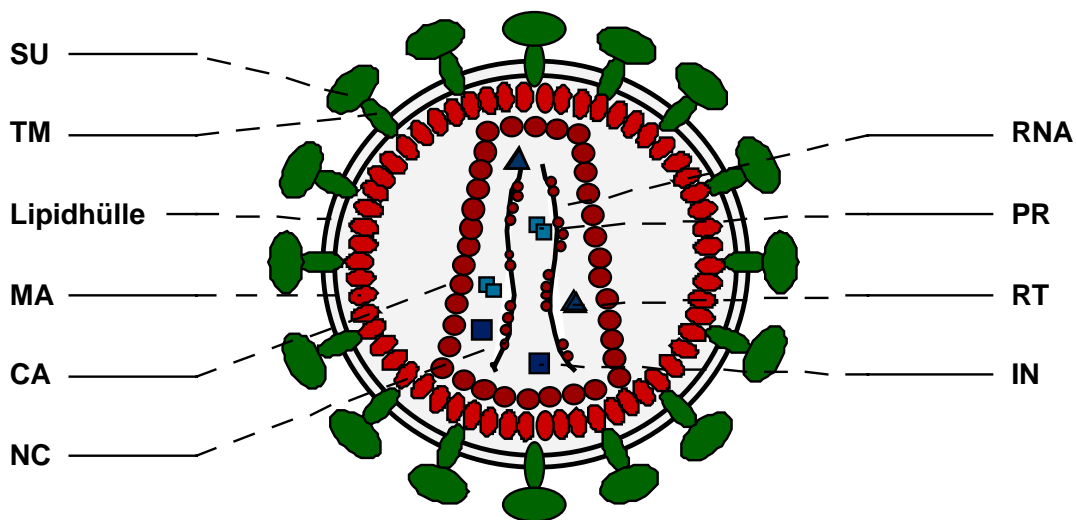
Die infektiösen viralen Partikel der Lentiviren sind von einer Lipidmembran umhüllt, die aus der Zellmembran der Wirtszelle gebildet wird. Die viralen Glykoproteine sind in dieser Membran eingelagert. Das Partikelinnere besteht aus dem Kapsid, welches das virale Genom beherbergt (Coffin et al., 1992). In der extrazellulären Phase des viralen Vermehrungszyklus, also in dem infektiösen viralen Partikel, liegt das Genom als diploide, einzelsträngige RNA vor. Die virale RNA hat, wie die eukaryotische mRNA, am 5'-Ende eine Capstruktur und am 3'-Ende eine Polyadenylierung. Nach der Infektion einer Wirtszelle wird die genomische RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben, welche als provirales Genom in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Abbildung 1 zeigt das provirale Genom eines Lentivirus, die verschiedenen RNA-Transkripte, sowie ein reifes Viruspartikel.

Das lentivirale Genom weist unter anderem die bei allen replikationskompetenten Retroviren typischen offenen Leseraster für die Strukturproteine *gag*, *pol* und *env* auf. Lentiviren sind komplexe Retroviren, die zusätzlich über akzessorische Gene verfügen. Das Genom wird zu beiden Seiten von "long terminal repeats" (LTR) flankiert. Die LTRs enthalten *cis*-aktive Sequenzen, wie Promotor- bzw. Enhancer-Elemente, die für die Expression der viralen Gene benötigt werden. Alle drei Strukturproteine, die am Aufbau infektiöser Partikel beteiligt sind, werden während der Morphogenese zunächst als Vorläuferproteine synthetisiert, die später durch die virale oder zelluläre Proteasen in einzelne Komponenten gespalten werden. Die inneren strukturellen Komponenten der viralen Partikel werden durch *gag* kodiert, das sich am 5'-Ende des viralen Genoms befindet. Das Gag (Gruppenspezifisches Antigen)-Protein wird von der genomischen RNA zunächst als ein 50-57 kD Vorläuferprotein synthetisiert, welches während der Morphogenese durch die virale Protease in einzelne Komponenten gespalten wird. Durch diesen Proteolyseprozess entstehen die Matrix (MA)-, Kapsid (CA)- und Nukleokapsid (NC)-Proteine (Freed, 1998).

A)



B)



### Abbildung 1: Genexpression und Struktur der Lentiviren

(A) Vereinfacht dargestellte Organisation eines lentiviralen Provirus (auf die Darstellung der akzessorischen Proteine wurde verzichtet). Der genaue Aufbau des lentiviralen Genoms wird in Abb. 3 dargestellt). Das integrierte Provirus wird zu beiden Seiten von den LTRs (long terminal repeats) abgeschlossen. Unterhalb des Provirus werden die viralen Transkripte dargestellt. Die ungespleißte RNA wird als genomische RNA in den zu bildenden neuen Partikel bzw. für die Expression von Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteinen verwendet. Das Hüllprotein wird von einer gespleißten RNA exprimiert (SD bzw. SA, Spleißdonor bzw. -akzeptor). Die exprimierten Proteine sind durch Rechtecke dargestellt. (B) Modell eines reifen Viruspartikels. Die Farbkodierung der einzelnen Komponenten entspricht der Darstellung in (A).

Bei manchen Vertreter der Lentiviren wurden weitere kleinere Spaltprodukte gefunden (z.B. p6, p2 und p1 bei HIV), deren Funktionen bislang nur ungenau charakterisiert wurden. Das Matrix-Protein wird posttranslational myristyliert und diese Myristylierung ist dafür verantwortlich, dass das Gag-Vorläuferprotein intrazellulär mit der Plasmamembran assoziiert. Diese Prozessierung ist unentbehrlich für die Entstehung infektiöser Virionen (Bryant und Ratner, 1990). Im reifen Partikel sind Matrixproteine zwischen Plasmamembran und viralem Kapsid lokalisiert. Das konische Kapsid wird durch die hydrophoben Kapsidproteine aufgebaut. Innerhalb dieser Struktur befindet sich der Ribonukleoproteinkomplex. Dieser wird aus den basischen Nukleokapsid-Proteinen und der diploid vorliegenden genomischen RNA gebildet. Die NC-Proteine enthalten Cystein-Histidin-Motive, durch die die Verpackung der genomischen RNA vermittelt wird. Das Gag-Polyprotein ist in der Lage, unabhängig von der Expression anderer viraler Proteine sogenannte "virus like particles" (VLPs) freizusetzen (Boulangier und Jones, 1996).

In das infektiösen Viruspartikel werden auch die von *pol* kodierten Enzyme, die Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) verpackt. Diese werden zusammen mit Gag als Fusionsprotein gebildet. Dabei findet eine -1 Leserasterverschiebung in das *pol* Leseraster statt und die Pol-Proteine werden an die synthetisierten Gag-Proteine als Fusionsprotein angefügt (Jacks et al., 1988). Diese Verschiebung findet bei etwa fünf Prozent der Translationsvorgänge statt. Auch das Gag-Pol-Fusionsprotein wird am aminoterminalen Ende myristyliert und über diese Prozessierung mit der Plasmamembran assoziiert. Auf diese Weise wird versichert, dass die viralen Enzyme gemeinsam mit den Strukturproteinen den Ort der Partikelbildung erreichen und in einem idealen Verhältnis in das entstehende Partikel gelangen. Die virale Protease spaltet sich autokatalytisch von dem Gag-Pol-Vorläuferprotein ab und ist dafür verantwortlich, während der Partikelreifung die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine in die einzelnen Komponenten zu prozessieren. Die Protease ist unentbehrlich für die Herstellung infektiöser Partikel (Kohl et al., 1988). Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die DNA sowohl von RNA als auch von DNA synthetisieren kann. Außerdem enthält dieses Enzym eine zusätzliche RNase H-Aktivität, welche die RNA der im Laufe der reversen Transkription auftretenden RNA-DNA Hybridstränge abbaut. Die Integrase katalysiert die Insertion der linearen doppelsträngigen DNA in das Genom der Wirtszelle.

Das *env*-Gen kodiert für die viralen Glykoproteine. Diese werden an der Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums von einer gespleißten subgenomischen mRNA zunächst als ein Polyprotein translatiert. Dieses gelangt über den sekretorischen Syntheseweg der Zelle in die Plasmamembran. Während des Transports wird das Polyprotein glykosiliert und durch eine furinähnliche zelluläre Protease in zwei Untereinheiten (surface, SU und transmembran, TM) gespalten, die nichtkovalent miteinander verbunden bleiben. Der Membranproteinkomplex wird über die TM-Untereinheit in der Virusmembran verankert, die SU-Untereinheit ist für die Adsorption der viralen Partikel an spezifischen Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche verantwortlich.

Wie schon oben erwähnt sind Lentiviren komplexe Retroviren, die neben den *gag*-, *pol*- und *env*-Gene noch über akzessorische Leseraster verfügen. Der lentivirale transkriptionelle Transaktivator (*tat*) und *rev* (regulator of expression of the virion) sind akzessorische Gene, die essentiell für die virale Replikation sind. Beide werden durch zwei Exone kodiert und werden als erste Proteine während des Replikationszyklus synthetisiert. Die Lentiviren besitzen noch weitere akzessorische Gene, die aber nicht essentiell für die virale Replikation sind. Diese akzessorischen Gene und ihre Funktionen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt (Cullen, 1998).

**Tabelle 1: Akzessorische Proteine der Lentiviren**

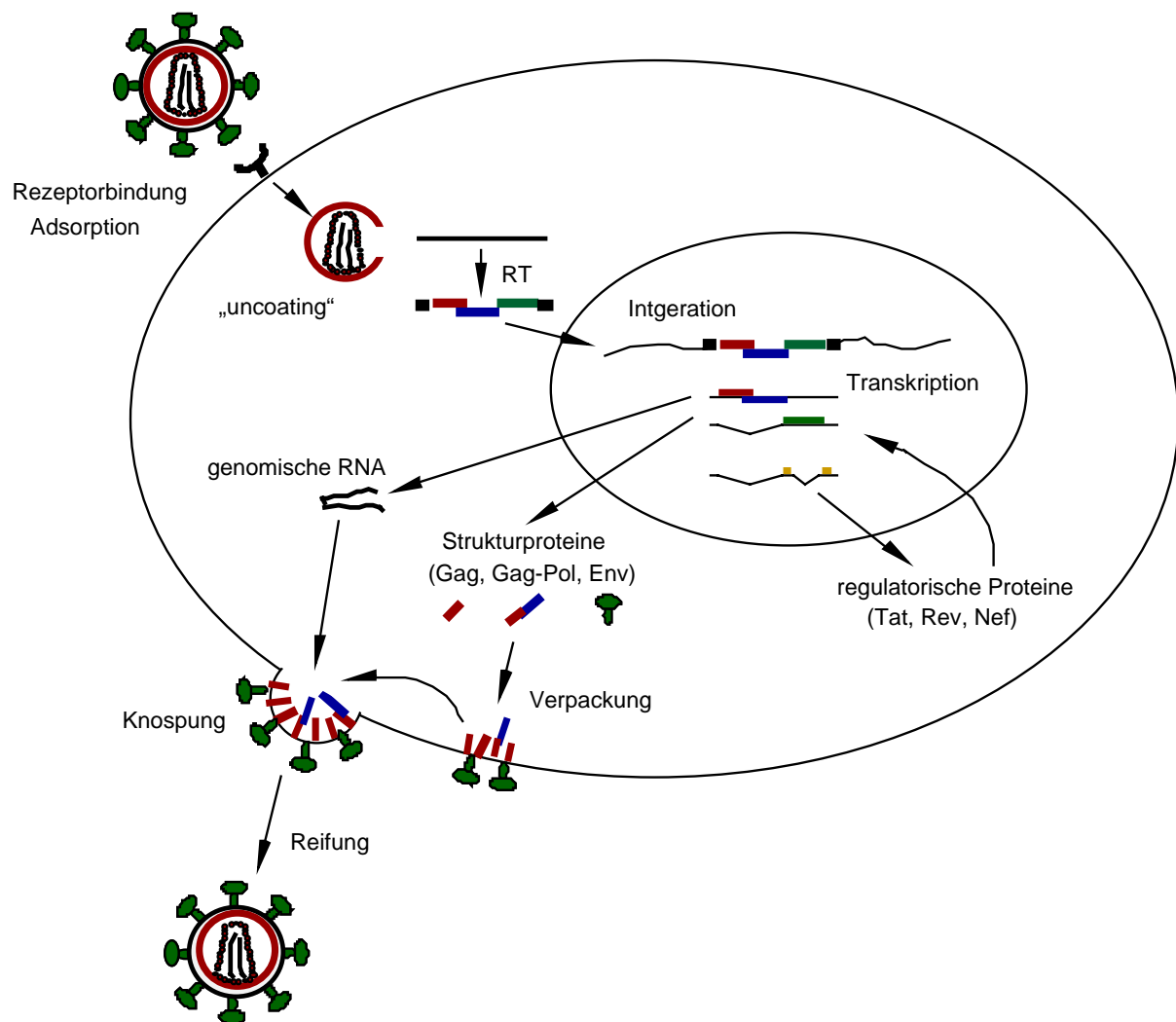
<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>
<b>vif</b>	„viral infectivity factor“, erhöht die Infektiosität der Virionen in primären T-Zellen
<b>vpr / vpx</b>	virionassoziiertes Protein, vermittelt den nukleären Import des Präintegrationskomplexes, stoppt Zellteilung in der G <sub>2</sub> -Phase
<b>vpu</b>	degradiert CD4-Rezeptoren im ER, verhindert damit deren Komplexbildung mit Env
<b>nef</b>	verringert die Expression von CD4-Rezeptoren und MHC-I-Antigenen an der Zelloberfläche, beeinflusst die Infektiosität der Virionen
<b>dut</b>	nur bei den Nicht-Primaten-Lentiviren, hat dUTPase-Aktivität



### **1.1.2. Replikationszyklus der Lentiviren**

Die Vorgänge des lentiviralen Replikationszyklus wird in Abbildung 2 zusammengefaßt. Den Eintritt des Virus in die Zielzelle stellt den ersten Schritt des viralen Replikationszyklus dar. Hierbei bindet sich das Virus durch die SU-Untereinheit des Membranproteinkomplexes an einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Bei einer HIV-Infektion interagiert die Oberflächenuntereinheit gp120 mit CD4-Rezeptoren, die auf der Oberfläche von T-Helferzellen und Makrophagen vorhanden sind (Dalglish et al., 1984). Zusätzlich sind an der Infektion weitere zelluläre Korezeptoren beteiligt. Für die Infektion von Makrophagen wird der CCR5, für die Infektion von T-Zellen entweder der CCR5 oder der CXCR4 Chemokinrezeptor benötigt (Doranz et al., 1999). Durch die Bindung an beide Rezeptoren wird eine Konformationsänderung der SU-Untereinheit ausgelöst, welche dazu führt, dass die TM-Untereinheit in die zelluläre Membran eindringt und die Virus- mit der Zellmembran fusionieren kann (Chan und Kim, 1998). Durch diese Membranfusion zwischen Virus und zu infizierender Zelle wird das virale Kapsid in die Zielzelle aufgenommen.

Nach der enzymatischen Entfernung ("uncoating") des viralen Kapsids wird die genomische RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben (Baltimore, 1970, Temin und Mizutani, 1970). Der Vorgang der reversen Transkription ist komplex und läuft folgendermaßen ab. Es wird zunächst eine kurze Negativ-Strang-DNA ausgehend von einer als Primer dienenden tRNA, welche an die PBS (primer binding site) der viralen RNA bindet, synthetisiert. Diese DNA wird als Minus-Strang strong-stop (-ss)-DNA bezeichnet und ist komplementär zu den R- und U5- Regionen an der genomischen RNA. Der kurze RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrids wird durch die RNase H abgedaut und die -ssDNA bindet an die komplementäre R-Region am 3'-Ende des RNA-Genoms und dient als Primer für die Minus-Strang DNA-Synthese. Der als Matrize dienende RNA-Anteil wird wiederum durch die RNase H abgedaut. Nur die kurze RNase H-resistente PPT (polypurine tract)-Sequenz bleibt erhalten. Sie dient als Primer für die Plus-Strang strong-stop (+ss) DNA-Synthese. Im 3' Bereich des pol Leserasters befindet sich der zentrale Polypurintrakt (cPPT), der als zweiter Startpunkt der Plus-Strang-DNA-Synthese dient. Die tRNA wird am Ende der Minus-Strang-DNA durch die RNase H abgedaut, so dass die zwei PBS-Regionen an der Minus-Strang-DNA bzw. an der +ssDNA hybridisieren und die DNA-Synthese vervollständigt wird. Auf dieser Weise entsteht eine doppelsträngige DNA, die zu beiden



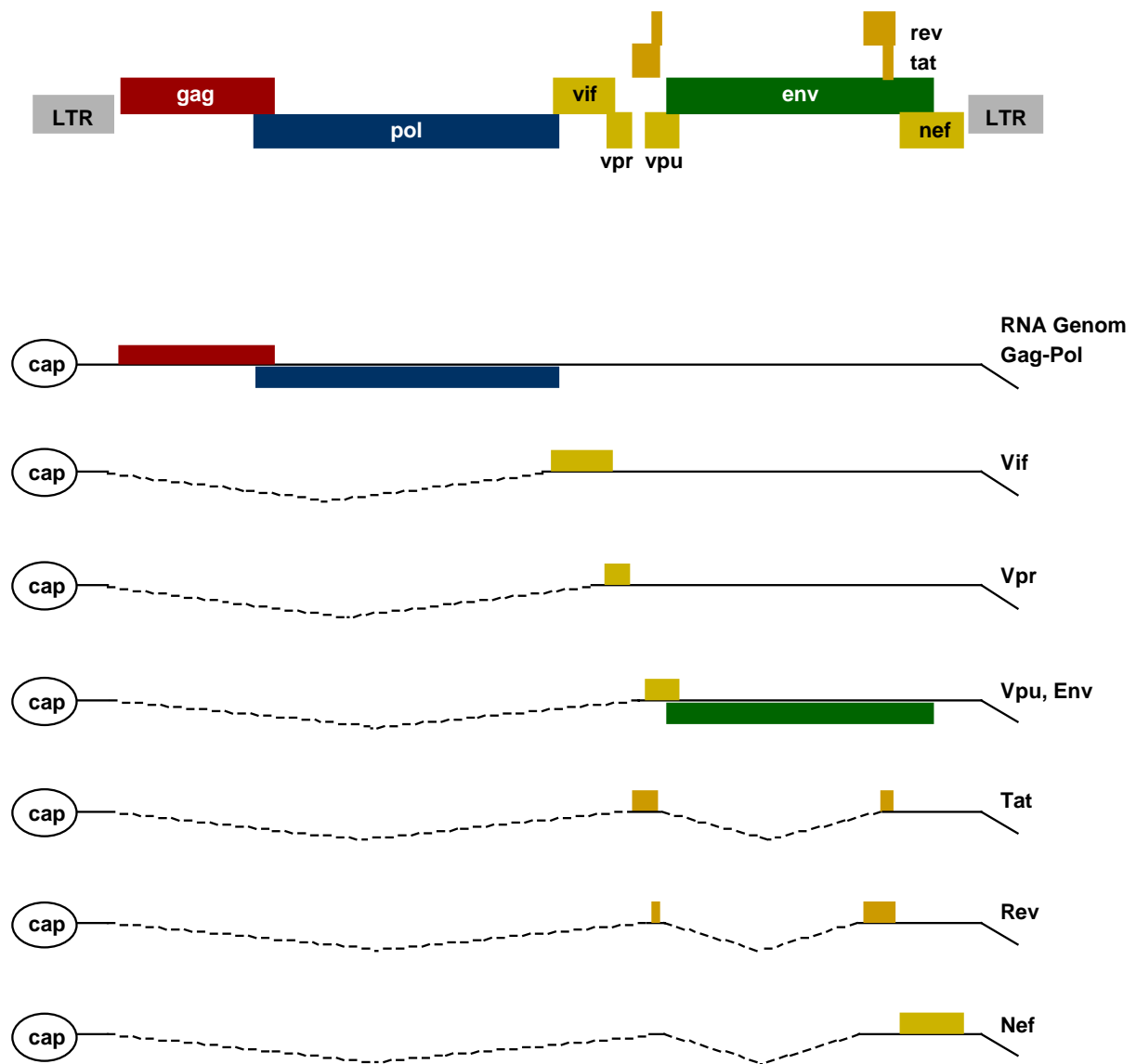
### **Abbildung 3: Replikationszyklus der Lentiviren**

Nach dem Eintritt des Virus in die Zielzelle wird das einzelsträngige RNA-Genom durch die virale Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Im Zellkern vermittelt die virale Integrase die Integration dieser DNA in das Wirtszellgenom. Das Provirus wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert. Zunächst werden mehrfach gespleißte mRNAs gebildet, die nach dem Export in das Zytoplasma translatiert werden. Die im Zytoplasma synthetisierten regulatorischen Proteine (Tat und Rev) werden in den Zellkern transportiert und führen zur verstärkten Transkription (Tat) bzw. zur Bildung ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs (Rev). Diese werden mit Hilfe von Rev in das Zytoplasma transportiert und zur Translation der viralen Strukturproteine verwendet. Die gebildeten Strukturproteine werden an der Zytoplasmamembran angelagert. Nach der Verpackung der genomischen RNA verlassen die unreifen Partikel die Zelle durch Knospung. Der abschließende Reifungsprozess, bei dem die virale Protease die Vorläuferproteine in die einzelnen Komponenten spaltet, erfolgt während und nach der Partikelfreisetzung.

Seiten von LTR-Sequenzen flankiert ist. Da die Reverse Transkriptase die Lesegenauigkeit nicht überprüfen kann, werden bei der Synthese mit einer Wahrscheinlichkeit von ca.  $10^{-4}$  falsche Nukleotide eingebaut. Dies trägt zu einer sehr hohen Mutationsrate bei. Aufgrund der hohen Mutationsrate sind die Viren in der Lage, sich schnell an veränderte Lebensbedingungen anzupassen (Coffin, 1995). Die durch die reverse Transkription synthetisierte doppelsträngige DNA bleibt mit den Proteinkomponenten des Kapsids verbunden. Diese als Präintegrationskomplex bezeichnete Struktur wird zur Integration in den Zellkern transportiert. Die anderen Retroviren, wie zum Beispiel das Murine Leukämievirus (MuLV), können nur teilende Zellen infizieren, weil sie während der Mitose die Auflösung der Zellkernmembran benötigen, da ihre Präintegrationskomplex nicht in den Zellkern transportiert werden kann (Roe et al., 1993). Lentiviren dagegen transportieren ihren Präintegrationskomplex durch die Zellkernmembran, so dass eine Zellteilung keine Voraussetzung für die Infektion ist. Sie sind also in der Lage auch nicht teilende, oder ruhende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, zu infizieren (Lewis et al., 1994). Im Zellkern wird das Provirus mit Hilfe der viralen Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert. Weil die nicht integrierte provirale DNA nicht transkribiert wird, ist die Integration essentiell für die Expression der viralen Gene.

Für die Expression viraler Gene spielen die *cis*-aktiven Sequenzen in den LTR-Regionen eine große Rolle, die sowohl zelluläre Transkriptionsfaktoren, als auch virale Transaktivatoren binden, und so der zellulären RNA-Polymerase II ermöglichen, das virale Genom in mRNA umzuschreiben. Trotz ihres kurzen Genoms kodieren die Lentiviren für viele (6 bis 9) Gene. Sie enthalten mehrere Spleißdonoren und -akzeptoren, welche die Expression der in verschiedenen Leserastern kodierten Gene von dem gleichen RNA-Transkript ermöglichen (Gallo et al., 1988; Schwartz et al., 1990). Es werden hauptsächlich drei verschiedene mRNA-Spezies gebildet; ungespleißte genomische, einfach gespleißte und mehrfach gespleißte mRNA-Moleküle. Abbildung 3 zeigt ein integriertes HIV-1-Genom und die verschiedenen viralen Transkripte.

Die lentivirale Genexpression erfolgt in zwei Phasen. In der frühen Phase der Expression werden die mehrfach gespleißten mRNAs gebildet. Diese kodieren für die regulatorischen Gene *tat*, *rev* und *nef*. Diese werden im Zytoplasma translatiert und die *Tat*- und *Rev*-Proteine



### **Abbildung 3: Genom und Genexpression des Humanen Immundefizienzvirus (HIV)**

Genetische Organisation eines integrierten Provirus. Die in unterschiedlichen Leserastern kodierte Gene sind durch Rechtecke dargestellt. Unterhalb des Provirus werden die charakteristischen Transkripte dargestellt. Die verschiedenen mRNAs werden am 5'-Ende mit einer Capstruktur versehen, am 3'-Ende polyadenyliert und zum Teil mehrfach gespleißt. Die von den jeweiligen mRNAs exprimierte Proteine sind durch Rechtecke angedeutet. Die ungespleißte mRNA wird auch als genomische RNA verwendet und in das zu bildende Partikel verpackt.

werden anschließend zurück in den Zellkern transportiert. Das Tat-Protein bindet sich an das TAR (trans-activation response)-Element, welches an den 5'-Enden aller viralen mRNA-Spezies lokalisiert ist und verstärkt deren Transkription durch Stimulierung der transkriptionellen Elongation (Gaynor, 1995). Das Rev-Protein ist für den Übergang von der frühen zur späten Phase verantwortlich. Es bindet an die als RRE (rev responsive element) bezeichnete RNA-Sequenz, welche sich in der Mitte des *env*-Gens an den ungespleißten und einfach gespleißten mRNAs befindet. Durch diese Bindung wird verhindert, dass diese zwei mRNA-Spezies weiter gespleißt werden. Außerdem vermittelt das Rev-Protein den Transport dieser mRNAs in das Zytoplasma. Bei den mehrfach gespleißten mRNAs wird das RRE-Sequenz durch Spleißen entfernt, so dass deren Expression Rev-unabhängig erfolgt (Hope und Pomerantz, 1995). Die als Polyprotein synthetisierten strukturellen Komponenten (Gag, Gag-Pol und Env) werden zur Zellmembran transportiert und dort angelagert. Die Verpackung der genomischen RNA erfolgt über die Bindung des RNA-Genoms an die Cystein-Histidin-Motive des Nukleokapsid-Anteils des Gag beziehungsweise Gag-Pol-Proteins. Diese Interaktion wird durch das als  $\Psi$  (packaging signal) bezeichnete *cis*-aktive Element vermittelt. Diese Sequenz wird aus den gespleißten mRNAs durch den Spleissvorgang entfernt. Auf diese Weise wird gesichert, dass in die virale Partikel überwiegend ungespleißten mRNAs verpackt werden (Aldovini und Young, 1990). Die gebildeten Partikel verlassen durch Knospung die Wirtszelle. Die Reifungsprozess, bei der die virale Protease die Vorläuferproteine in die einzelnen Komponenten spaltet, erfolgt während und nach der Partikelfreisetzung.

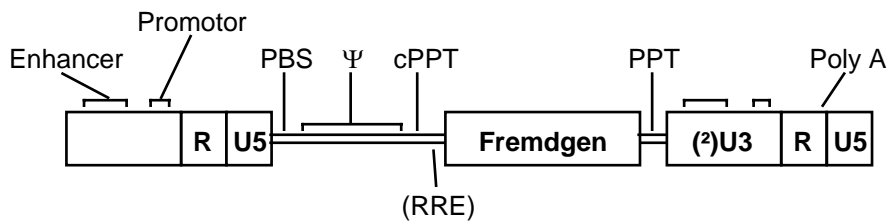
## 1.2. Lentivirale Vektoren

Virale Vektoren können verwendet werden, um fremde genetische Informationen in eukaryotische Zellen einzubringen. Weil Viren in der Lage sind, eukaryotische Zellen zu infizieren und sie nach der Infektion einer Zelle deren Synthesemaschinerie dazu veranlassen, ihr genetisches Material zu produzieren, stellen sie besonders gut geeignete Vektoren für den Gentransfer dar. Lentivirale Vektoren haben den Vorteil gegenüber anderen viralen Vektoren, dass sie in der Lage sind, ruhende oder nur langsam teilende Zellen zu infizieren und ihr genetisches Material in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Dies führt zu einer stabilen Expression des Zielgens in den infizierten Zellen und deren Tochterzellen (Verma und Somia, 1998).

### 1.2.1. Aufbau replikationsinkompetenter lentiviraler Vektoren

Replikationskompetente Vektoren können durch den Einbau eines fremden Gens in das schon existierende Virus hergestellt werden (Shimotohno und Temin, 1981). Diese Vektoren replizieren in den Zellen, exprimieren ihre für die Herstellung infektiöser Partikel notwendigen Proteine und sind in der Lage weitere Zielzellen zu infizieren. Durch den Einbau eines Markergens kann die virale Replikation mit replikationskompetenten Vektoren leicht untersucht werden. Für verschiedene genetische Studien und gentherapeutische Anwendungen werden aber weder die Expression viraler Proteine, noch die Herstellung neuer infektiöser Partikel in den Zielzellen erwünscht. Außerdem ist die Verpackungskapazität replikationskompetenter Vektoren gering. Beide Probleme wurden mit der Etablierung replikationsinkompetenter Vektorsysteme gelöst.

Um replikationsinkompetente Vektoren herzustellen, müssen alle für die viralen Strukturproteine kodierenden Regionen aus dem Genom entfernt werden, so dass der Vektor selbst keine virale Proteine produzieren kann. Die Sequenzen des lentiviralen Vektors werden dabei auf die *cis*-aktiven Sequenzen reduziert, die für die Verpackung, die reverse Transkription und Integration essentiell sind (Parolin et al., 1994, Kim et al., 1998). Diese Minimalsequenzen beschränken sich auf den Promotor, das Verpackungssignal ( $\Psi$ ), die für die reverse Transkription notwendigen Sequenzen - die R Region, die Primer-Bindungsstelle (PBS) der Polypurintrakt (PPT) und der zentrale Polypurintrakt (cPPT) -, die Erkennungssequenzen der Integrase in den U3 und U5 Regionen und das für die mRNA-Bildung wichtige Polyadenylierungssignal (Miller, 1997). Der zentrale Polypurintrakt ist für den Vektortransfer nicht zwingend notwendig. Vektoren, welche die cPPT-Sequenzen enthalten, zeigen jedoch bessere Gentransferrate. Außerdem scheint der cPPT eine wichtige Rolle bei der Transduktion ruhender Zellen zu spielen (Zennou et al., 2000). Wenn für den Export nicht oder einfach gespleißter mRNA-Moleküle in das Zytoplasma das rev-RRE System von HIV verwendet wird (siehe unten), muss der Vektor zusätzlich die RRE-Sequenzen enthalten (Abbildung 4).



#### **Abbildung 4: Aufbau eines replikationsinkompetenten lentiviralen Vektors**

Ein replikationsinkompetenter lentiviraler Vektor enthält außer eines Fremdgens nur die *cis*-aktiven Sequenzen, die für die Verpackung der genomischen RNA, für die reverse Transkription und Integration essentiell sind. (PBS - Primer-Bindungsstelle, Ψ - packaging signal, cPPT - zentraler Polypurintrakt, RRE - rev responsive element, PPT – Polypurintrakt, PolyA - Polyadenylierungssignal)

An Stelle der deletierten Sequenzen wird eine Expressionskassette eingesetzt, die das zu übertragende Fremdgen enthält. Die für die Infektion einer Zielzelle benötigten Proteine werden in *trans* zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe dieser Proteine wird das Vektorkonstrukt in Partikel verpackt, die das gewünschte Fremdgen auf die Zielzellen übertragen. Replikationsinkompetente Vektoren sind in der Lage, die Zielzellen zu infizieren, können aber keine neue Infektionszyklen einleiten, weil in den Zielzellen keine viralen Proteine exprimiert werden. Die Verpackungskapazität solcher Vektoren ist auch größer. In dem oben beschriebenen Vektor kann ein etwa 8 kB großes Fremdgen verpackt werden. Dieses Gen wird von einem fremden, internen Promoter exprimiert. Der Transfer und die Expression des Fremdgens in den Zielzellen wird als Transduktion bezeichnet, um es von der produktiven viralen Infektion zu unterscheiden. Die für die Transduktion notwendigen Proteine werden in *trans* zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hauptsächlich um die für die Partikelbildung benötigten Strukturproteine (Gag, Pol und Env). Um die Wahrscheinlichkeit zufälliger homologer Rekombination zu minimieren, werden die Gag-Pol- und Env-Expressionskonstrukte meist auf zwei Plasmide aufgeteilt. Weiterhin wird das Verpackungssignal aus beiden Konstrukten entfernt und damit verhindert, dass die RNA der Verpackungskonstrukte auch verpackt wird. Es ist schon seit langem bekannt, dass Nukleokapside verschiedener Viren in der Lage sind, Hüllproteine anderer Viren und sogar Hüllproteine von Viren aus fremden Virusfamilien in ihre Viruspartikel einzubauen (Swanstrom und Wills, 1997). Dieses, als Pseudotypisierung bezeichnete Phänomen wird auch bei der Herstellung viraler Vektorsysteme verwendet. Die von einem heterologen Hüllprotein pseudotypisierten viralen Partikel haben ein anderes - meist erweitertes - Wirtsspektrum, als der Wildtyp. Lentivirale Vektoren werden meistens mit dem Glykoprotein

des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) pseudotypisiert (Burns et al., 1993, Naldini et al., 1996). Das Glykoprotein des VSV benutzt einen Phosphattransporter als Rezeptor, damit das Virus in der Lage ist, Zellen von verschiedenen Spezies zu infizieren. Lentiviren kodieren für weitere regulatorische und akzessorische Proteine, deren Rolle in der Transkomplementation untersucht wurde. Die für die Replikation nicht essentiellen akzessorischen Proteine sind auch bei der Herstellung eines Vektorsystems entbehrlich. Der für die Replikation notwendige virale Transaktivator (*tat*) kann aus dem Verpackungskonstrukt deletiert werden, wenn der ursprüngliche U3 Promotor durch einen konstitutiv aktiven Promotor ersetzt wird. Bei der Herstellung *tat*-unabhängiger Expressionskonstrukte wird überwiegend der Promotor des Cytomegalievirus (CMV) verwendet (Dull et al., 1998). Das Rev-Protein wird in einem Vektorsystem zur Sicherstellung des RNA-Transports verwendet. Bei der Verwendung des HIV Rev-RRE-Systems, wird Rev koexprimiert, um mit dem auf dem Vektor oder auf dem Gag-Pol-Verpackungskonstrukt vorhandenen RRE zu interagieren. Das ursprüngliche rev-RRE-System kann aber durch andere heterologe Transportelemente, wie zum Beispiel durch das CTE (constitutive transport element) des Mason-Pfizer-Affen-Virus (Kim et al., 1998), oder das PRE (posttranscriptional regulatory element) des Woodchuck Hepatitis B-Virus (Zufferey et al., 1998) ersetzt werden. Bei der Verwendung heterologer Transportelemente können die RRE-Sequenzen aus dem Vektor deletiert werden. Neuere Untersuchungen haben gezeigt dass Konstrukte, bei denen die kodierenden Sequenzen für die Expression in humanen Zellen optimiert wurden, keine Transportelemente benötigen (Kotsopoulou et al., 2000).

### **1.2.2. Anwendung lentiviraler Vektoren**

Mit der Herstellung viraler Vektoren wurden sowohl die Untersuchung der viralen Replikation als auch die Struktur- und Funktionsanalyse von verschiedenen Genen und Genprodukten erleichtert. Durch den Einbau eines quantitativ auswertbaren Markergens kann die Replikation leicht untersucht werden. Durch die Einführung von Mutationen können die für die Replikation notwendigen Faktoren, essentielle Bereiche von Virusproteinen und Genen, oder unentbehrliche *cis*-aktive Sequenzen charakterisiert werden. Weil lentivirale Vektoren in der Lage sind, ihr genetisches Material in das Genom einer Zielzelle zu integrieren, können sie auch für die Herstellung von Zellen verwendet werden, die stabil ein Fremdgen exprimieren. In diesem Fall enthält der Vektor ein Fremdgen und meist ein damit gekoppeltes selektionierbares Markergen. Nach der Transduktion werden die Zielzellen



selektioniert und nur die Zellen überleben, die stabil das Ziel- und Markergen exprimieren. Mit Hilfe viraler Vektoren können auch Gene zu therapeutischen Zwecken in humanen Zellen eingebracht werden (Anderson et al., 1998). Gegenwärtig werden gentherapeutische Konzepte zur Therapie verschiedener erworbener und angeborener Erkrankungen erarbeitet. In den vergangenen Jahren wurden vor allem Vektoren aus drei verschiedenen Virusfamilien (Adeno-, Adenoassoziierte- und Retroviren) für solche gentherapeutischen Ansätze analysiert. In Tabelle 2 werden die Eigenschaften der verschiedenen Vektorsysteme zusammengefaßt und miteinander verglichen.

**Tabelle 2. Eigenschaften der zur Zeit verwendeten Vektorsysteme**

<b>Eigenschaft</b>	<b>Retrovirale Vektoren</b>	<b>Lentivirale Vektoren</b>	<b>Adenovirale Vektoren</b>	<b>AAV Vektoren</b>
Verpackungs-kapazität	7 - 7,5 kB	7 - 7,5 kB	etwa 30 kB	3,5 - 4 kB
Maximaler Titer	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^{11}$	$> 10^{12}$
Integration	ja	ja	nein	ja / nein
Dauer der Expression	kurz	lang	kurz	lang
Wirtszellimmunität	keine	keine	ja	ja

Die lentiviralen Vektoren sind in der Lage auch ruhende und sich nicht teilende Zellen zu infizieren. Die stabile Integration in das Zielzellgenom führt zur konstitutiven Expression des transferierten genetischen Material. Lentivirale Vektoren stellen daher eine attraktive Alternative zu anderen für gentherapeutische Ansätze verwendeten viralen Vektoren dar. Obwohl in den vergangenen Jahren mehrere lentivirale Vektoren entwickelt wurden, bleibt die Sicherheit der Vektoren eine wichtige Frage (Verma und Somia, 1997; Amado und Chen, 1999).

Die Tatsache, dass Vektoren weitgehende Gemeinsamkeiten mit Ursprungsviren haben, könnte darauf hinweisen, dass sie auch für andere Anwendungen geeignet sein könnten. So wäre es möglich, die von HIV abgeleitete Vektoren dort einzusetzen, wo bisher mit pathogenem HIV gearbeitet wurde.

So stellt zum Beispiel die Resistenztestung bei HIV-Infizierten Problem dar. Während der Therapie einer HIV-Infektion können sich Mutanten entwickeln, die gegen die eingesetzten antiviralen Medikamente resistent sind. Um die Wirksamkeit der zur Therapie verwendeten Substanzen zu analysieren, müssen phänotypische Resistenztestungen durchgeführt werden. Bei der bislang etablierten Testmethoden wird replizierendes Virus in Gegenwart der zu testenden Substanzen auf Zellkultur angezüchtet und der Grad der Virusvermehrung gemessen. Da HIV ein sehr hohes Infektionspotential hat, müssen diese Testungen unter hohen Sicherheitsbedingungen durchgeführt werden. Außerdem dauert die Anzucht replizierender Viren oft mehrere Wochen, was die Analyse und damit die Optimierung der antiviralen Therapie erheblich verzögert. Anhand der oben beschriebenen Tatsachen bestände die Möglichkeit die Resistenztestung mit Hilfe eines replikationsinkompetenten Vektorsystems durchzuführen.

### **1.3. Zielsetzungen**

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines replikationsinkompetenten lentiviralen Vektorsystems und dessen Anwendung für verschiedene Experimente. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zuerst der Frage nachgegangen, ob ein replikationsinkompetentes Vektorsystem für die Durchführung der oben beschriebenen phänotypischen Resistenztestung geeignet ist.

Weiterhin wurde untersucht, ob das Hüllprotein von Foamyviren aus verschiedenen Spezies in der Lage ist, lentivirale Vektoren zu pseudotypisieren und die dadurch hergestellten Pseudotypen eine gute Alternative zu herkömmlich verwendeten Hüllproteinen bieten. Außerdem wurden Bereiche des FV Hüllproteins charakterisiert, die bei der Pseudotypisierung lentiviraler Partikel wichtige Aufgaben erfüllen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte und Materialien

Automatisches Sequenziergerät, ABI 310	Perkin Elmer
Bakterienschüttler	Certomat
Eismaschine	Scotsman AF 10
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Durchflußzytometer	Becton & Dickinson
Feinwaage	Sartorius
Gefrierschrank	Bosch
Heizblock	Liebisch
Inkubatoren	Heraeus
Kühlschrank	Bosch
Laborzentrifugen	Biofuge 13, Heraeus
	Rotanta TRC, Hettich
	Sorvall RC5C, Du Pont mit den Rotoren
	GS 3 und SS 34, Sorvall
Laborwaage	Vibra
Luminometer	EG & G Berthold
Magnetrührer	M 32 GLW
Mikroskope	Leitz DM IL
Mikrowellenherd	Sharp R 210A
Neubauer-Zählkammer	GLW
PCR-Gerät	Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler
pH-Meter	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
Pipetten	Gilson und Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy plus, Tecnomara
Plastikmaterial	Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc
Quarzküvetten	Hellma
Spannungsgerät	Consort E 455
Spektrophotometer	Pharmacia
Sterilbank	Biological Safety Cabinets, Nuaire

Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm)	Millipore, Schleicher & Schuell
Ultrazentrifuge	Combi plus, Sorvall und L8-55 Beckman mit den Rotoren TH 641, Sorvall
UV-Handlampe	VL 4LC
UV-Leuchttisch mit Foto-Drucker	MWG-Biotech, Bio-Photonics
Vortexer	GLW L46
Wasserbad	IKA TER 2

### 2.1.2. Chemikalien

Alle für dieser Arbeit verwendeten Reagenzien werden in Abschnitt Lösungen oder im Methodenteil dargestellt.

### 2.1.3. Enzyme und Kits

Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, New England Biolabs, Roche Biochemicals
Klenow Fragment	MBI Fermentas
CIAP (calf intestine alkaline phosphatase)	MBI Fermentas
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
Pwo DNA-Polymerase	PeqLab
Omniscript RT Kit	Qiagen
AmpliTaQFS zur automat. Sequenzierung	Perkin Elmer
Geneclean III Kit	Bio 101 Inc., USA

### 2.1.4. Antivirale Substanzen

Medikamentengruppe	Medikament	Hersteller
Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren	Zidovudin	GlaxoSmithKline
	Didanosin	Sigma
	Stavudin	Sigma
	Abacavir	GlaxoSmithKline
Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase- Inhibitoren	Nevirapin	Boehringer Ingelheim
	Delavirdin	Pharmacia-Upjohn
	Efavirenz	DuPont Pharma

Protease-Inhibitoren	Saquinavir	Roche
	Indinavir	Merck, Sharp & Dohme
	Ritonavir	Abbott
	Nelfinavir	Roche
	Amprenavir	GlaxoSmithKline
Integrase-Inhibitoren	L-708.906	Merck, Sharp & Dohme
	L-731.988	Merck, Sharp & Dohme

### 2.1.5. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Verwendung	Literatur
E. coli DH5 $\alpha$	Transformation von neu ligierten Plasmiden	Appendix A in (Sambrook et al., 1989)
E. coli JM109	Präparativen Aufreinigung von Plasmiden	Appendix A in (Sambrook et al., 1989)

### 2.1.6. Zelllinien

293	Humane embryonale Nierenzelllinie
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, die stabil das große T-Antigen des SV40-Virus exprimieren (Du Bridge et al. 1987)

### 2.1.7. Virusisolate

Virusisolate	Charakteristika	Literaturstelle	Herkunft
105/A, B und F	AZT-resistente HIV-Isolate	Boucher et al., 1992	NIH AIDS Reagent Program
RTMDR1	HIV-Isolate, resistent gegen AZT, ddI und Nevirapin	Larder et al., 1993	NIH AIDS Reagent Program
HIV-1 SAQ <sup>R</sup>	Saquinavir-resistente HIV-Isolate	Jacobsen et al., 1995	NIH AIDS Reagent Program
pX15	Multiresistenter molekularer HIV-Klon	Walter et al., 1999	Universität Erlangen

Die Genotypen der Virusisolate sind in Tabelle 3 dargestellt.

### 2.1.8. Plasmide

pcDNA3.1 (+/Zeo)	Eukaryotischer Expressionsvektor (Promega)
------------------	--

pcHSRV2	Expressionsplasmid für ein CMV-getriebenes FV Provirus (Moebes et al., 1997) auf Basis von pcDNA3.1+/Zeo
pHXB-2D	Proviraies HIV-1-Plasmid (Shaw et al., 1984)
pczVSV-G	VSV-Glykoprotein-Expressionsplasmid auf Basis von pcDNA3.1+/Zeo (Pietschmann et al., 1999)
pGL-3	Luciferase Expressionsplasmid (Promega)
pMH62	PFV-1 Vektor mit SFFV U3 getriebenem EGFP-Markergen (Pietschmann et al., 1999)

*Heterologe und chimäre FV-Env-Expressionskonstrukte aus verschiedenen Spezies*

pczPFV-1 Env EM02	PFV-1-Env-Expressionsplasmid <sup>1</sup>
pczSFV-1 Env Wt	SFV-1-Env-Expressionsplasmid <sup>2</sup>
pczFFV Env Wt	FFV-Env-Expressionsplasmid <sup>2</sup>
pczBFV Env Wt	BFV-Env-Expressionsplasmid <sup>2</sup>
pczPFV-1 Env EM62, 63, 64 und 65	PFV-1-Env-Expressionsplasmide mit chimärem Signalpeptid aus verschiedenen Spezies <sup>2</sup>
pczPFV-1 Env EM43 und 70	PFV-1-Env-Expressionsplasmide mit verkürztem Signalpeptid <sup>3</sup>
pczPFV-1 Env Δ2 MuLV	Chimäres PFV-1-Env-Expressionsplasmid, der größte Teil der ursprünglichen CyD wurde durch die gesamte CyD von MuLV ersetzt <sup>1</sup>
pczFFV Env FM01 und FM02	FFV-Env-Expressionsplasmide mit chimärem Signalpeptid <sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Lindemann et al., 1997)

(<sup>2</sup> Picard-Maureau, 2000)

(<sup>3</sup> Lindemann et al., 2001)

Die in den Pseudotypisierungsexperimente (vgl 3.2.) verwendeten Expressionskonstrukte sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

## 2.1.9. Oligonukleotide

#568	CCTGCCCTGTTTCTGCTGGAATAACT
#570	TGCCATATTCCTGGACTACAGTCTACTT
#586	AAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGGGCT
#595	CACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAG
#617	CAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGAT
#618	AGCCTTCTGATGTTTCTAACAGGCCA
#619	CAGAGAGACCCGGTTCCTAAACCAGCTCTGCT
#559	AAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA
#625	GTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGG
#626	GCGCTCTAGATGCTAGAGATTTTCCACACT

## 2.1.10. Lösungen

### 2.1.10.1. Bakterienkultur

#### 5 x LB-Medium

- 100 g LB Broth Base (Gibco BRL)
- 25 g Natriumchlorid (AppliChem)
- 5 g Glucose (AppliChem)
- ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

#### LB Platten

- 10 g Agar-agar (Roth)
- 10 g LB Broth Base
- 2,5 g Natriumchlorid
- ad 500 ml Aqua dest., autoklavieren

Nach dem Autoklavieren wird bei einer Temperatur von ca. 60 °C 500 µl Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) zugegeben.

### 2.1.10.2. Zellkultur

#### MEM (Minimal Essential Medium)

- 500 ml MEM
- 50 ml FCS (10%)
- 3,5 ml L-Glutamin

0,6 ml Penicillin / Streptomycin Mix

### FCS

Tiefgefrorenes FCS (Seromed, Biochrom KG) wurde bei 37 °C aufgetaut und anschliessend zur Inaktivierung des Komplements für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert.

### Penicillin / Streptomycin Mix

5 g Penicillin

5 g Streptomycin

ad 50 ml Aqua dest., filtrieren und bei - 20 °C lagern

### ATV

8 g NaCl

0,4 g KCl

1 g D-Glucose

0,58 g NaHCO<sub>3</sub>

0,5 g Trypsin

0,2 g 1M EDTA

ad 1000 ml Aqua dest.

### LacZ Färbelösung

100 µl 400 mM Ferricyanidlösung (4 mM)

100 µl 400 mM Ferrocyanidlösung (4 mM)

200 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (2 mM)

200 µl 20 mg/ml X-Gal (0,4 mg/ml)

ad 10 ml PBS<sup>-</sup>

### X-Gal

20 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galaktosid), (Roth)

Die Lösung wird in Dimethylformamid angesetzt, aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

### FACS-Puffer

PBS, 0,1% BSA

0,05% Natriumazid



### **2.1.10.3. Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA**

#### Mini/Maxi-Lösung 1.

9,9 g Glucose (50 mM)  
20 ml 1M EDTA pH 8.0 (10 mM)  
25 ml 1M Tris-HCl pH 8.0 (25 mM)  
ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

#### Mini/Maxi-Lösung 2.

4 g 0,2 N NaOH  
50 ml 10% SDS  
ad 500 ml Aqua dest.

#### 3M Natriumazetat pH 5.2

408,1 g Natriumazetat (AppliChem)  
800 ml Aqua dest., autoklavieren

Der pH Wert der Lösung ergibt sich durch Zugabe von ca. 70 ml Eisessig.

#### 50x Tris-Azetat-EDTA (TAE)

242 g Tris Base  
100 ml 0,5 M EDTA  
57,1 ml Eisessig  
ad 1000 ml Aqua dest.

#### 6x BPB (Ladepuffer)

0,125 g Bromphenolblau (AppliChem)  
40 g Saccharose  
1 ml 10% SDS  
ad 100 ml Aqua dest., autoklavieren

### **2.1.10.4. DNA-Transfektion**

#### 2x HBS pH 7.02-7.05

8,18 g Natriumchlorid  
0,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)  
5,95 g HEPES (Roth)

ad 500 ml Aqua dest.

Der pH-Wert der Lösung wird mit 2N NaOH eingestellt, die Lösung wird filtriert (0,2 µm Porendurchmesser), aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

#### 2,5M CaCl<sub>2</sub>

18,3 g CaCl<sub>2</sub>

50 ml Aqua dest.

Die Lösung wird filtriert (0,2 µm), aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

#### 500 mM Natriumbutyrat

2,75 g n-Buttersäure (Merck)

50 ml PBS, steril

Die Lösung wird filtriert (0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

### **2.1.10.5. Standardlösungen und Puffer**

#### 1 M Tris pH 8.0

121,1 g Tris Base

800 ml Aqua dest., autoklavieren

Der pH Wert der Lösung wird durch Zugabe von cca. 42 ml HCl eingestellt.

#### 0,5 M EDTA pH 8.0

186,1 g EDTA, Dinatriumsalz (AppliChem)

800 ml Aqua dest., autoklavieren

EDTA Dinatriumsalz löst sich erst nachdem der pH-Wert eingestellt wurde. Der pH-Wert wird durch Zugabe von ca. 20 g NaOH eingestellt.

#### PBS

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

#### 10x TE

10 ml 1M Tris pH 8.0 (100 mM)

2 ml 0.5M EDTA pH 8.0 (10 mM)

ad 100 ml Aqua dest., autoklavieren

#### 10% SDS

100 g SDS

ad 1000 ml Aqua dest.

SDS wird bei einer Temperatur von 68 °C gelöst.

### **2.1.10.6. Lösungen zum Nachweis der Luciferase-Aktivität**

#### Assay Puffer

1250 µl 1M Tris / 1M MES (pH 7,8) (125 µM)

250 µl 1M Magnesiumacetat (25 µM)

500 µl 100mM ATP-Lösung (5 µM)

ad 10 ml Aqua dest.

#### 1M Tris / 1M MES pH 7.8

24,2 ml Tris Base

42,6 ml MES-Monohydrat (Sigma)

200 ml Aqua dest.

Der pH Wert der Lösung wird durch Zugabe von 1M NaOH eingestellt.

#### 100 mM ATP-Lösung

0,55 g ATP-Dinatriumsalz (Sigma)

10 ml Aqua dest.

Die Lösung wird aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

#### 25 mM Luciferin

10 mg Luciferin (Promega)

1,25 ml 5 mM K<sub>2</sub>H/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer

Die Lösung wird aliquotiert und bei - 20 °C gelagert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wird 25 mM Luciferin 1:100 in 5mM  $K_2H/KH_2PO_4$ -Puffer verdünnt.

5 mM  $K_2H/KH_2PO_4$ -Puffer, pH 8.0

9,4 ml 1M  $K_2HPO_4$ -Lösung

0,6 ml 1M  $KH_2PO_4$ -Lösung

190 ml Aqua dest.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Analyse und Klonierung von DNA**

#### **2.2.1.1. Transformation kompetenter Bakterien**

Bei der Transformation wird fremde DNA, wie z.B. Plasmide, von kompetenten Bakterien aufgenommen, um diese zu vermehren. Während der Transformation werden die Bakterien mit der Plasmid-DNA in einer Lösung aus Kalziumchlorid gemischt, dann einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt (Sambrook et al., 1989) und anschließend auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen. Da die Plasmide auch ein oder mehrere Gene für Antibiotikaresistenz enthalten, wachsen auf den Agarplatten nur plasmidhaltige Bakterien.

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden zunächst 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm (aus einer Glycerolstammkultur) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,2-0,3 (OD-Messung erfolgte bei 595 nm) kultiviert. Diese Kultur wurde für 5 Minuten auf Eis gehalten und anschließend für 10 Minuten bei 2500 rpm abzentrifugiert (4 °C). Das Sediment wurde in 40 ml Transformationspuffer 1 aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert und bei - 70 °C eingefroren.

Zur Transformation wurden die kompetenten Bakterien aufgetaut. Bei der klassischen Transformation wurden 10 µl von neu ligierten Plasmiden mit 100 µl Bakteriensuspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert, über 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt und anschließend wieder für 3 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) wurden die Bakterien für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 5000 rpm für 3 Minuten wurde das Bakterienpellet in 150 µl LB-Medium resuspendiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten (z.B. Ampicillin 100 µg/ml) ausgestrichen. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert. Um bereits hergestellte Plasmide zu transformieren wurde eine schnellere Transformationsmethode durchgeführt (Quick Transformation, nach Pope und Kent, 1996.) Hierzu wurde 100 µl Bakteriumsuspension mit 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend direkt auf vorgewärmten (30 Minuten bei 37 °C) antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert.

### **2.2.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Plasmide werden durch alkalische Lyse aus Bakterien gewonnen (Birnboim und Doly, 1979). Unter alkalischen Bedingungen werden die bakteriellen Proteine, die chromosomale und auch die Plasmid-DNA denaturiert. Das alkalische Lysat wird anschliessend mit 3M-Natriumazetat Lösung neutralisiert. Bei der dadurch entstandenen hohen Salzkonzentration werden die bakteriellen Proteine, die chromosomale DNA und die Zellreste präzipitiert, während die Plasmid-DNA renaturiert und in Lösung bleibt. Die Zelltrümmer können durch Zentrifugation abgetrennt werden, die Aufreinigung der DNA erfolgt über eine Präzipitation. Die Begriffe “Mini-” und “Maxi-Präparation” bedeuten verschiedenen Massstäbe.

#### Mini-Präparation

Nach der Transformation wurden Einzelklone mit sterilen Zahnstochern in 2 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (z.B. 100 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde in der Tischzentrifuge bei 13000 rpm für 1 Minute abzentrifugiert und das Sediment in 100 µl Lösung 1 aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl Lösung 2 wurden die Bakterien 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Daraufhin wurde 200 µl Lösung 3 zugefügt und die Proben wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer, die bakteriellen Proteine und die chromosomale DNA wurden in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (15 Minuten bei 13000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das 1 ml absoluten Ethanol enthielt. Die dabei ausfallende Plasmid-DNA wurde durch eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 13000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE/RNase A-Lösung aufgenommen.

#### Maxi-Präparation

150 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde mit einem Klon beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Durch eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 7000 rpm im Sorvall GS3 Rotor wurden die Bakterien sedimentiert, anschliessend in 5 ml Lösung 1 resuspendiert und mit 50 µl RNase A (10 µg/ml) für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Lösung 2 wurden die Bakterien 5 Minuten lysiert. Um die Lyse zu beenden wurde 10 ml Lösung 3 zugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer und die chromosomale DNA abzentrifugiert (15 Minuten bei 16000 rpm in dem Sorvall SS34 Rotor) und der Überstand wurde durch Gaze in ein neues Gefäß filtriert. Durch

Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA ausgefällt und über eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde wiederum mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml H<sub>2</sub>O zusammen mit 5 µl RNase A (10 µg/ml) aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Abtrennung von Proteinkontaminationen mit Phenol und Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert und 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch vermessen und auf 1 µg/µl eingestellt.

#### **2.2.1.3. Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA**

Bei der Extraktion werden Proteine aus einer DNA-Lösung entfernt. Dabei wurde die DNA-Lösung zuerst mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, gut durchgemischt und anschließend 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Proteine gingen in die Interphase über, während die DNA in der oberen, wässrigen Phase blieb. Diese wurde sorgfältig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in gleicher Weise noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Nach beiden Schritten wurde jeweils die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschliessend wurde die extrahierte DNA-Lösung mit Ethanol präzipitiert.

#### **2.2.1.4. Präzipitation von DNA**

Die Präzipitation wird zur Konzentrierung von DNA-Lösungen durchgeführt. Dabei wird den DNA Molekülen die Hydrathülle durch Ethanol entzogen, was zu deren Aggregation und Präzipitation führt. Die DNA-Lösung wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumazetat versetzt, gut durchgemischt und für 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in der gewünschten Menge H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.2.1.5. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion einer wässrigen DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, welche dem Absorptionsmaximum des  $\pi$ -Elektronen-Bindungssystems der DNA Basen entspricht, gemessen. Bei der Messung entspricht eine OD (optical density)-Einheit 50 µg/ml dsDNA. Da auch andere  $\pi$ -Elektronen-Bindungssysteme bei dieser Wellenlänge absorbieren (z.B. Phenol, Aminosäuren mit aromatischen

Seitenketten) wurden die Proben auch bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Aus beiden OD-Werten ( $OD_{260}$  bzw.  $OD_{280}$ ) wurde der Quotient errechnet, welcher Information über den Reinheitsgrad gibt. Für reine DNA sollte dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### **2.2.1.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, eine große Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren, welche zur Klonierung oder zur Einführung von Mutationen eingesetzt werden kann (Mullis et al., 1986). Bei einer Reaktion wird eine einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges verwendet. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei einer Temperatur von 94 °C in Einzelstränge zerlegt (Denaturierungsphase). Daraufhin wird ein Paar von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) an den gewünschten Stellen an die einzelsträngige Matrize anlagert (Hybridisierungsphase). Dies erfolgt bei geeigneten Temperaturen (50-65 °C), bei der die Primer sich an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle binden können. In der Elongationsphase synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) die Zielsequenz zwischen den gebundenen Primern. Bei diesem Schritt wird die Temperatur auf die optimale Wirktemperatur des Enzyms erhöht (72 °C). Dieser Reaktionszyklus wird mehrfach hintereinander wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Anreicherung der gewünschten Zielsequenz kommt, die dann für Klonierungen weiterverwendet werden kann. Es können auch Mutationen oder zusätzliche Schnittstellen mit geeigneten Primern in die Zielsequenz eingeführt werden (rekombinante PCR).

Um eine möglichst hohe Amplifikationsgenauigkeit zu erreichen, wurde in dieser Arbeit die Pwo-DNA-Polymerase (PeqLab) verwendet. Die Pwo-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und ist in der Lage primäre Fehler der 5'-3'-Polymerase zu korrigieren (Proofreading-Aktivität). In ein PCR-Reaktionsgefäß wurden die folgenden Komponenten auf Eis zusammenpipettiert:

- 1 µl Plasmid-DNA (100 ng/µl)
- 2 µl dNTPs (10 mM von jeden Deoxynukleotid)
- 3 µl Primer #1 (10 pmol/µl)
- 3 µl Primer #2 (10 pmol/µl)
- 10 µl 10x Reaktionspuffer (mit 20 mM  $MgSO_4$ )



2,5 µl Pwo-DNA-Polymerase (1 U/µl)  
ad 100 µl H<sub>2</sub>O

Bei Verwendung eines Thermocyclers mit unbeheizbarem Deckel mussten die Proben mit Mineralöl überschichtet werden. Die Proben wurden in dem Thermocycler nach folgendem Protokoll amplifiziert:

15 Sekunden bei 94 °C	Denaturierung
30 Sekunden bei 50-65 °C	Hybridisierung (annealing)
45 Sekunden - 2 Minuten bei 72 °C	Elongation

Die Temperatur des Hybridisierungszyklus hängt von der Schmelztemperatur der Primer ab, die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab. Der oben angegebene Reaktionszyklus wurde 25-30 Mal wiederholt, die Proben wurden anschließend noch 7 Minuten bei 72 °C inkubiert (verlängerte Elongation). Die amplifizierte DNA wurde auf einem 1%-igen Agarosegel analysiert.

#### **2.2.1.7. RT-PCR**

Bei dieser Methode wird die für die retrovirale Replikation notwendige reverse Transkription verwendet. Das Schlüsselenzym dieses Vorgangs, die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die DNA sowohl von einer DNA-, als auch von einer RNA-Matrize synthetisieren kann. Mit Hilfe dieses Enzyms kann RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden, die als Ausgangsmaterial für eine weitere PCR-Amplifikation oder für die Herstellung von cDNA-Banken verwendet wird.

Für die Herstellung der cDNA wurde in dieser Arbeit das Omniscript RT-Kit verwendet. Hierbei wurde zunächst 50 ng - 2 µg RNA in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben, mit Mineralöl überschichtet und anschließend 10 Minuten auf 70 °C inkubiert. Danach wurden die folgenden Komponenten auf Eis zupipettiert:

1 µl dNTPs (10 mM von jeden Deoxynukleotid)  
2 µl Antisense-Primer (10pmol/µl)  
2 µl 10x Puffer RT  
4 µl H<sub>2</sub>O (RNase frei)

1 µl Omniscript - RT (4U/µl)

Der Ansatz wurde zuerst 50 Minuten bei 42 °C inkubiert, dann noch zusätzliche 15 Minuten auf 75 °C inkubiert um die enzymatische Aktivität der Reversen Transkriptase zu stoppen.

#### **2.2.1.8. Restriktionsverdau der DNA**

Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten spezifische DNA-Sequenzen. Mit Hilfe dieser Enzyme wurden Plasmide anhand der spezifischen Restriktionskarten analytisch identifiziert (analytischer Verdau), oder wurden aus Plasmiden spezifische Spaltprodukte gewonnen, die für weitere Klonierungen verwendet wurden (präparativer Verdau). Analytische Verdaue wurden mit 1 µg DNA in 20 µl, präparative Verdaue mit 5 µg DNA in 50 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Die Reaktionspuffer und das Enzym wurde gemäß den Angaben des Herstellers zugesetzt und die Probe 3-16 Stunden bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

#### **2.2.1.9. Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow Fragment**

Nach einem Restriktionsverdau entstandene einzelsträngige 5'-Überhänge können mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt werden. Dabei wurde die 5'-3'-Polymerase-Aktivität des Enzyms verwendet, welche in der Anwesenheit von phosphorylierten Desoxyribonukleotiden (dNTPs) rezessive Enden bis zur Doppelsträngigkeit auffüllt. Zunächst wurden 5µl dNTPs (10 mM; Endkonzentration 0,5 mM) zusammen mit 1 µl Klenow-Polymerase (10 U/µl, MBI Fermentas) zum präparativen Restriktionsansatz gegeben und anschliessend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzymaktivität wurde die Probe für 10 Minuten bei 75 °C inkubiert.

#### **2.2.1.10. Entfernung von 3'-Überhängen mit der T4-DNA-Polymerase**

Um nach einem Restriktionsverdau entstandene einzelsträngige 3'-Überhänge zu entfernen, wurden diese mit der T4 DNA-Polymerase abgedaut. Hierbei wurde 1 µl T4 DNA-Polymerase (5 U/µl, MBI Fermentas) zum Restriktionsansatz zugegeben und für 20 Minuten bei 12 °C inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität für 10 Minuten bei einer Temperatur von 75 °C inaktiviert.

#### **2.2.1.11. Dephosphorylierung von DNA mit CIAP**

Um bei einer Ligation zu verhindern, dass die Enden eines linearisierten Vektors mit einander religieren können, wurden die 5'-Enden des Vektors mit dem Enzym "calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)" dephosphoryliert. Da das Enzym in allen gängigen Restriktionspuffern aktiv ist, wurde zu den bereits verdauten Restriktionsansätzen 1 µl CIAP (10 U/µl, MBI Fermentas) pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Aktivität des Enzyms wurde durch Zugabe von 5 mM EDTA und Inkubation für 10 Minuten bei 75 °C inaktiviert.

#### **2.2.1.12. Agarose-Gelelektrophorese**

Nukleinsäuren wurden im Agarosegel analysiert. Während einer Elektrophorese wurden die durch Restriktionsverdau entstandenen Fragmente im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Abhängig von der Länge der aufzutrennenden Fragmente wurden 0.8 - 2.0 prozentige Gele hergestellt. Hierzu wurde die entsprechende Menge an Agarose (0.8 - 2.0 g) in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen in Mikrowellenherd gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf eine Temperatur von ca. 50 °C wurden 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und das Gel in Gelkammer gegossen. Die Nukleinsäure-Proben wurden mit 6x BPB-Ladepuffer versetzt und auf das erkaltete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE bei 75 - 90V. Anschließend konnten die DNA-Fragmente aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht analysiert werden.

#### **2.2.1.13. Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit dem Geneclean-Kit**

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde der Geneclean-Kit (BIO 101, USA) verwendet. Dabei wurde zunächst das gewünschte Fragment mit einem Skalpel unter einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurde 900 µl NaI-Lösung zugegeben und das ausgeschnittene Agarosestück bei 55 °C zum Schmelzen gebracht. Danach wurde 5-10 µl Glasmilch (Silikatmatrix, welche die DNA selektiv bindet) zugegeben, das Reaktionsgefäß geschüttelt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde 1 Minute bei 4600 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment dreimal mit je 500 µl NewWash-Puffer gewaschen. Schließlich wurde das Sediment getrocknet, in 12 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 3 Minuten bei 55 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur löst sich die DNA aus der Glasmilch. Die Glasmilch wurde durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Elution von DNA wurde noch einmal wiederholt.

#### 2.2.1.14. Ligation linearer DNA-Fragmente mit T4-Ligase

Die nach einem präparativem Verdau gewonnenen linearen DNA-Fragmente können mit Hilfe einer Ligase miteinander verbunden werden. Die T4 DNA-Ligase ist in der Lage, sowohl glatte ("blunt ends") als auch kohäsive Enden ("sticky ends") miteinander zu verknüpfen. Bei einer Ligation wurde der folgende Ansatz zusammenpipettiert:

100 ng Vektor-DNA  
2-300 ng Insert-DNA  
2 µl 10x Ligase Puffer  
1 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl, MBI Fermentas)  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 14-16 °C inkubiert und anschließend für die Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

#### 2.2.1.15. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden mit der Ampli Taq FS-Polymerase (Applied Biosystems) durchgeführt. Zunächst wurde das zu sequenzierende DNA-Fragment mit einer zyklischen PCR vervielfältigt. Dazu wurde der folgende Ansatz zusammenpipettiert:

0,5 - 1 µg Plasmid-DNA  
10 pmol Primer  
2 µl Big-Dye Mix  
ad 10 µl Aqua dest.

Der Ansatz wurde im Thermocycler nach dem folgenden Protokoll amplifiziert:

Denaturierung	30 Sekunden bei 96 °C
Hybridisierung	15 Sekunden bei 50 °C
Elongation	4 Minuten bei 60 °C

Nach der PCR wurde der Ansatz mit 90 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3M Natrium-Azetat (pH 5,2) und 250 µl Ethanol versetzt, gut gemischt und für 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen.

Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 15 µl TSR-Puffer aufgenommen, 2 Minuten bei 94 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde in ein Sequenziergefäß überführt und mit dem ABI 310-Kapillarsequenziergerät analysiert.

## **2.2.2. Zellbiologische Methoden**

### **2.2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärennten Zellen (vgl. 2.1.6.) wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in Kulturflaschen kultiviert. Als Kulturmedium wurde MEM mit 10% FCS verwendet (vgl. 2.1.10.2.). Die Zellen wurden inkubiert, bis sie einen zu ca. 80% konfluenten Zellrasen bildeten. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen wurden mit ATV gewaschen, anschließend abgelöst und 1/5-1/10 der Zellsuspension wurde in neuem Kulturmedium weiterkultiviert. Die Zellsuspensionen wurden zweimal wöchentlich passagiert.

### **2.2.2.2. Calciumphosphat-Transfektion**

Bei der Transfektion werden fremde Nukleinsäuren (z.B. Plasmid-DNA) von eukaryotischen Zellen aufgenommen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die von Soneoka beschriebene Calciumphosphatmethode (Soneoka et al. 1995.) verwendet. Dabei handelt es sich um eine transiente Transfektionsmethode, weil die in die eukaryotischen Zellen eingebrachten fremden Nukleinsäuren im Laufe der Zellteilungen verloren gehen. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme bei dieser Methode ist im einzelnen noch nicht verstanden. Vermutlich wird die DNA an Calciumphosphatkristalle gebunden und durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und dort zur Expression gebracht. Für die Transfektion wurden 293T-Zellen verwendet. Die 293T-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die stabil das grosse SV40 T-Antigen exprimieren (Du Bridge et al. 1987.) Dadurch kommt es zur Replikation der Plasmide, die den SV40-Replikationsursprung (ori) tragen. Dies führt zu einer stärkeren Expression der auf diesen Plasmiden kodierten Proteine.

1,8x10<sup>6</sup> 293T-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6 cm-Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das Kulturmedium abgesaugt und 4 ml neues Medium auf die Zellen gegeben. Um das Medium zu equilibrieren, war er zuvor über Nacht im Brutschrank vorgewärmt worden. Anschließend wurde der folgende Transfektionsmix hergestellt:

je 6 µg Plasmid-DNA  
50 µl 2.5 M CaCl<sub>2</sub>  
ad 500 µl steriles H<sub>2</sub>O  
+ 500 µl 2x HBS pH 7.02-7.05

Das Transfektionsmix wurde tropfenweise aufgetragen, dann wurden die Zellen 7-8 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um die Transfektion zu stoppen und den optimalen pH-Wert der Zellen zu sichern, wurde danach das Transfektionsmedium gegen 5 ml neues MEM-Medium ausgetauscht. Die Expression transfizierter Plasmide, die Gene unter der Kontrolle eines CMV- Promotors enthalten, wurden nach der Transfektion induziert. Die Induktion erfolgte am Tag nach der Transfektion durch Zugabe von Natrium-Butyrat in einer Endkonzentration von 10 mM. Die Induktion wurde nach 8 Stunden durch einen erneuten Mediumwechsel beendet. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht inkubiert und dann für die anschließenden Experimente verarbeitet.

#### **2.2.2.3. Generierung viraler Überstände zur Transduktion von Zielzellen**

Zur Transduktion von Zielzellen wurde das in dieser Arbeit hergestellte retrovirale replikationsinkompetente Vektorsystem verwendet. Dabei handelte es sich um ein Vektor- und Verpackungskonstrukt (Gag-Pol), das zusätzlich über ein Markergen verfügt. Dieses Konstrukt wurde zusammen mit den jeweiligen Env-Expressionskonstrukten in 293T-Zellen kotransfiziert. Dabei wurden virale Partikel freigesetzt, die in der Lage sind, Zielzellen zu infizieren. Die Transfektion und Induktion durch Natrium-Butyrat erfolgte, wie oben beschrieben. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die viruspartikelhaltigen Überstände geerntet, sterilfiltriert (Millipore Filter, Porengröße 0,45 µm) um grobe Zelltrümmer abzutrennen und für die Transduktion von 293-Zellen verwendet. Die Infektion wurde 8 Stunden später durch einen Mediumwechsel beendet. Aufgrund des retroviralen Gentransfers wurde der Vektor in das Genom der Zielzelle integriert. Dies führte zu einer stabilen Expression des Markergens, welche weitere 48 Stunden später mit den entsprechenden Nachweisverfahren bestimmt werden konnte.

#### **2.2.2.4. Hemmung der Partikelreifung durch Zugabe von Protease Inhibitoren**

Die Protease des HIV sorgt dafür, dass die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine in einzelne Komponenten gespalten werden. Diese Prozessierung erfolgt zuerst bei der Virusreifung im

bereits von der Zelloberfläche freigesetzten Partikel. Der für die Entstehung infektiöser Partikel essentielle Vorgang kann mit Hilfe verschiedener Protease-Inhibitoren (vgl. 2.1.4.) blockiert werden. Weil die virale Protease zuerst nach der Partikelfreisetzung aktiv wird, wurden die Protease-Inhibitoren auf die transfizierten 293T-Zellen gegeben.

Für die Generierung viraler Überstände bei der Austestung von Protease-Inhibitoren wurden homogene (gleichmässig transfizierte) Zellpopulationen verwendet. Damit wurde sichergestellt, dass sich bei den Endergebnissen nur der Effekt des Inhibitors und nicht die Schwankung der Transfektionseffizienz widerspiegelt. Dazu wurden 8 Stunden nach der Transfektion die 293T-Zellen mit ATV abgelöst und in den Platten ausgesät. Für die Titrierung wurden 12-er, für den Nachweis der Luciferase-Expression 96-er Platten verwendet. Um die  $IC_{50}$  genau bestimmen zu können, wurden die Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Durch die Hemmung der PR-Inhibitoren kam es nach der anschließenden Transduktion zu einer verringerten Anzahl an transduzierten Zellen. Weil es bekannt war, dass die freigesetzten Partikel in Abwesenheit der PR-Inhibitoren nachreifen können, wurden diese auch bei der Transduktion auf die Zielzellen gegeben.

#### **2.2.2.5. Hemmung der Markergenexpression durch Zugabe von RT- und Integrase-Inhibitoren**

Die reverse Transkription kann durch Zugabe von verschiedenen nukleosidischen und nicht-nukleosidischen RT-Inhibitoren (vgl. 2.1.4.) gehemmt werden. Diese Substanzen blockieren das für die virale Replikation essentielle Umschreiben des viralen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA. Die Integrase-Inhibitoren hemmen die Integration dieser DNA in das Zielzellgenom. Weil beide Vorgänge zuerst in den Zielzellen stattfinden, wurden diese während der Transduktion in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Es kam ebenfalls zu einer reduzierten Markergenexpression, welche durch die anschließende Analyse quantitativ bestimmt wurde.

Die Generierung viraler Überstände erfolgte, wie oben geschrieben (vgl. 2.2.2.3.). Zur Hemmung der Markergenexpression wurden, wie bei den PR-Inhibitoren, verschiedene Platten (12-er bzw. 96-er) verwendet.

#### **2.2.2.6. Titrierung von Virusüberständen (LacZ Färbung)**

Zur Bestimmung des Virustiters nach der Transduktion  $\beta$ -Galaktosidase exprimierender Vektoren, wurde eine histochemische LacZ Färbung durchgeführt. Die Zielzellen, die effizient mit den Vektoren transduziert wurden, exprimierten das E.coli  $\beta$ -Galaktosidase-Gen, das über eine enzymatische Farbreaktion quantifiziert wurde.

293-Zellen wurden einen Tag vor der Transduktion mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$  pro Napf in einer 12er-Platte ausgesät. Die Überstände wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet, sterilfiltriert ( $0.45 \mu\text{m}$ ) und für die Transduktion von Zielzellen verwendet. Um die Auswertung der Transduktionseffizienz zu erleichtern, wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Überstände transduziert (unverdünnt bis  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  verdünnt). Die Transduktion wurde 6-8 Stunden später durch einen Mediumwechsel beendet. 48 Stunden später wurde die histochemische LacZ-Färbung durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen, die Zellen mit PBS gewaschen und dann in 1 ml Fixierlösung (0,5% Glutaraldehyd in PBS) für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml LacZ-Färbelösung (vgl. 2.1.10.2.) wurden diese für weitere 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Weil das verwendete lacZ Gen ein Kernlokalisationsignal trägt (NLS-lacZ) wurde der Zellkern der  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden Zellen blau angefärbt. Diese als positiv beurteilte Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und der Titer in cfu (colony forming unit) / ml angegeben.

#### **2.2.2.7. Nachweis der Luciferase-Expression in infizierten Zellen**

Nach der Transduktion mit dem Luciferase-exprimierenden Vektor, kommt es in den Zielzellen zur Expression von Luciferase, welche sich über ein chemilumineszentes Verfahren nachweisen und quantifizieren lässt.

Am Tag der Transduktion wurden zunächst die Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen in 96er-Platten vorpipettiert, dann die 293-Zellen mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$  pro Napf in 100  $\mu\text{l}$  Volumen ausgesät. Den Vektortransfer erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Virusüberstand. 48 Stunden später wurde das Medium von den transduzierten Zellen abgenommen und die Zellen wurden 30 Minuten durch Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (Roche Biochemicals) lysiert. 50  $\mu\text{l}$  Zelllysat und 50  $\mu\text{l}$  Assay-Puffer (vgl. 2.1.10.6.) wurde pro Napf in eine Luminometerplatte pipettiert, 100  $\mu\text{l}$  Luciferin-Lösung wurde automatisch durch das Lumineszenzmessgerät auf die Proben injiziert. Die Aktivität der Luciferase wurde für jede



Probe über 15 Sekunden vermessen und zu einem Gesamtwert verrechnet. Die Meßwerte wurden in rlu (relative light unit) angegeben.

#### **2.2.2.8. Bestimmung der Infektionseffizienz durch durchflußzytometrische Analyse**

Es wurden Vektoren hergestellt, welche über ein EGFP (enhanced green fluorescent protein)-Markergen verfügen. Die Transduktion der Zielzellen mit diesen Vektoren führt zur Expression von EGFP, welches sich leicht über durchflußzytometrische (fluorescence activated cell sorter) Analyse detektieren und quantifizieren lässt.

Die 293-Zellen wurden genauso vorbereitet, wie die für die Titration (vgl. 2.2.2.6.). 48 Stunden nach der Transduktion wurden die Zielzellen einmal mit ATV gewaschen, abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. 3 ml FACS-Puffer (vgl. 2.1.10.2.) wurde zugesetzt und die Zellen für 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Sediment je nach Zelldichte in 100 - 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messungen wurden an einem FACScan (Beckton & Dickinson) durchgeführt und mit der CellQuest Software ausgewertet.

#### **2.2.2.9. Konzentrierung viraler Partikel**

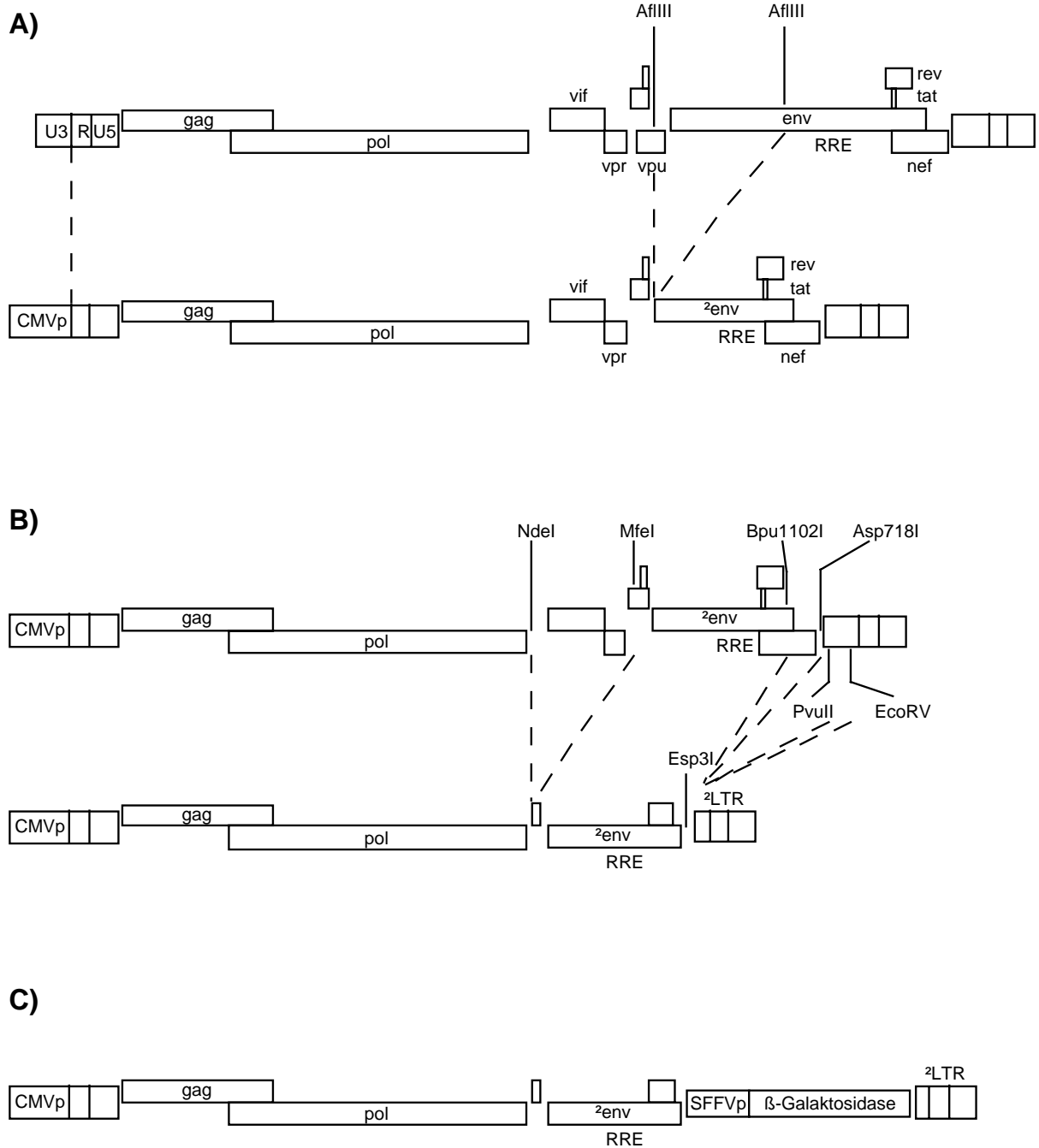
Um eine höhere Transduktionseffizienz zu erreichen, können die hergestellten viralen Partikel konzentriert werden. Die Generierung viraler Überstände erfolgte wie oben beschrieben. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Überstände geerntet, sterilfiltriert (0,45 µm) und mit Kulturmedium auf 11 ml aufgefüllt. 1 ml wurde gleich zur Transduktion von 293-Zellen verwendet. Um die Auswertung der Transduktionseffizienz zu erleichtern, wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Überstände transduziert (unverdünnt bis  $10^{-4}$  oder  $10^{-5}$  verdünnt). Der Rest wurde in Ultrazentrifugenröhrchen (Nunc, Ultra Tube 14x89 mm) überführt und in einem TH-641 Rotor für 3 Stunden bei 4°C und 25000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgenommen. Das Sediment wurde kurz getrocknet, in 1 ml TNE resuspendiert und über Nacht im Kühlschrank (4°C) gelagert. Am nächsten Tag wurde der Überstand zur Transduktion von 293-Zellen verwendet. Wie oben beschrieben wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Überstände transduziert (unverdünnt bis  $10^{-6}$  verdünnt). 48 Stunden später wurde die Transduktionseffizienz durch Titration bestimmt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Etablierung einer phänotypischen Resistenztestung von HIV

##### 3.1.1. Klonierung eines replikationsinkompetenten $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden lentiviralen Vektors

Für die Herstellung des auf HIV basierenden replikationsinkompetenten Vektors wurde das Plasmid pHXB2D (Gen-Bank Nr. K03455), welches das gesamte provirale HIV-1 Genom enthält, verwendet. Aus dem proviralen Foamyvirus-Plasmid pcHSRV2 (Moebes et al., 1997) wurde das Foamyvirus Genom durch Restriktionsverdau mit NdeI und PmeI entfernt. Die 5' R Region aus der HIV-LTR wurde mit Hilfe einer rekombinanten PCR (mit Primern #559 und #619 bzw. #617 und #618, vgl. 2.1.9.) hinter den konstitutiv aktiven CMV-Promotor genau an den Transkriptionsstart gesetzt. Das PCR-Fragment wurde mit NdeI und BssHII geschnitten und zusammen mit den von BssHII und AflIII bzw. AflIII und XbaI verdauten Fragmenten aus dem pHXB2D-Plasmid in das verdaute pcHSRV2 hineinkloniert. Die zellulären Restsequenzen wurden mit rekombinanter PCR (mit Primern #625 und #626, vgl. 2.1.9.) entfernt. Das dadurch erhaltene Konstrukt pGJ1, enthält das HIV-Genom mit Deletionen in den *vpu* und *env* offenen Leserastern. Durch einen Restriktionsverdau mit PvuII und EcoRV wurde eine Deletion in der 3' U3-Region von pGJ1 eingeführt (pGJ1  $\Delta$ U3), das *nef* Gen wurde durch einen Verdau mit Bpu1102I und Asp718I teilweise entfernt (pGJ2). Durch Verdau mit NdeI und MfeI wurden die *vif*-, *vpr*- und *tat*-Gene aus dem Konstrukt deletiert. Das erhaltene Plasmid wurde pGJ3 genannt. Anschließend wurde das E. coli lacZ-Gen, welches am N-Terminus ein Kernlokalisierungssignal trägt (NLS-lacZ), unter der Kontrolle eines Spleen Focus Forming Virus (SFFV) Promotors in die Esp3I Restriktionsstelle hineinkloniert. Das endgültige Konstrukt pGJ3-lacZ enthält einen CMV-Promotor, die R- und U5-Regionen der 5' LTR, die *gag*- und *pol*-Gene bzw. das *rev*-RRE-System des HIV, eine lacZ Expressionskassette und die deletierte 3' LTR. In Abbildung 5 wird die Klonierungsstrategie und der Aufbau der Konstrukte schematisch dargestellt.



### **Abbildung 5. Herstellung des replikationsinkompetenten lentiviralen Vektors**

Für die Herstellung des auf HIV basierenden replikationsinkompetenten Vektors wurde das provirale HIV-1 Plasmid pHXB2D verwendet. (A) Die 5' R-Region wurde mit Hilfe einer rekombinanten PCR hinter den konstitutiv aktiven CMV-Promotor, genau an den Transkriptionsstart, gesetzt. Sequenzen der *vpu*- und *env*-Gene wurden zwischen zwei AflIII-Spaltestellen deletiert. (B) Die 3' U3-Region wurde in weiten Teilen durch einen Restriktionsverdau mit PvuII und EcoRV (pGJ1 ΔU3) und das *nef*-Gen durch einen Verdau mit Bpu1102I und Asp718I teilweise entfernt (pGJ2). Durch Verdau mit NdeI und MfeI wurden die *vif*-, *vpr*- und *tat*-Gene aus dem Konstrukt deletiert (pGJ3). (C) In das pGJ3-Plasmid wurde das β-Galaktosidase (NLS-lacZ)-Markergen unter der Kontrolle des Spleen Focus Forming Virus (SFFV)-Promotors in die Esp3I-Restriktionsstelle hineinkloniert.

### **3.1.2. Analyse der Transduktionseffizienz**

Es wurde zunächst untersucht, ob der hergestellte Vektor mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) pseudotypisiert werden kann und die dadurch entstandenen Pseudotypen in der Lage sind, Zellen zu transduzieren. Dazu wurden 293T-Zellen mit jeweils 6 µg pGJ3-lacZ und mit einem Plasmid, welches das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus enthält, pczVSV-G (Pietschmann et al. 1999), transfiziert (vgl. 2.2.2.2.). Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand geerntet, sterilfiltriert (0.45 µm Porendurchmesser) und zur Transduktion von 293-Zellen verwendet.

Weil der Vektor in der hinteren U3-Region deletiert wurde, ist dieser nach der reversen Transkription gebildete Promotor inaktiv. In den Zielzellen werden deshalb keine virale Proteine exprimiert, nur die β-Galaktosidase unter Kontrolle des internen SFFV-Promotors. Die Transduktionseffizienz wurde weitere 48 Stunden später durch eine histochemische LacZ-Färbung (vgl. 2.2.2.6.) bestimmt. Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurde ein Titer von  $10^5 - 4 \times 10^5$  colony forming unit (cfu) / ml erreicht.

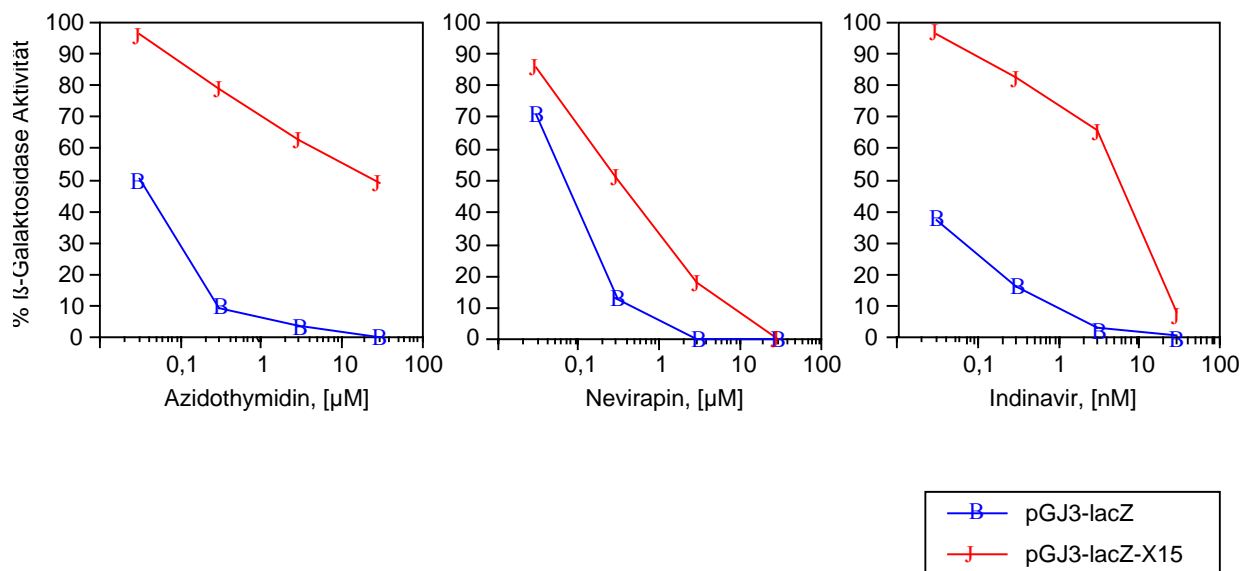
Um sicherzustellen, dass von den Zielzellen keine infektiöse Partikel freigesetzt werden, wurden mit dem Überstand der transduzierten Zellen 293-Zellen transduziert und 48 Stunden später wieder eine LacZ-Färbung durchgeführt. Dabei wurden keine Zellen gefunden, die β-Galaktosidase exprimierten. Mit diesem Experiment wurde nachgewiesen, dass der Vektor replikationsinkompetent ist. Der Vektor ist also in der Lage, die Zielzellen der ersten Generation zu transduzieren. Er kann jedoch keinen neuen Replikationszyklus einleiten.

### **3.1.3. β-Galaktosidase-Expression kann durch Zugabe von RT- und Protease- Inhibitoren gehemmt werden**

Weiterhin wurde untersucht, ob antivirale Medikamente in der Lage sind, die β-Galaktosidase-Expression während der Testung zu reduzieren. Die zur Zeit zur Therapie der HIV-Infektion verwendeten antiviralen Medikamente hemmen die Funktion der Reversen Transkriptase (RT) und der Protease des HIV. Weil die Medikamente verschiedene Vorgänge des viralen Replikationszyklus blockieren, mussten sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf die Zellen gegeben werden (vgl. 2.2.2.4. bzw. 2.2.2.5.).

Das oben beschriebene Verfahren wurde in Abwesenheit oder Gegenwart von verschiedenen antiviralen Medikamenten durchgeführt. Abbildung 6 zeigt ein Beispiel, bei dem jeweils ein nukleosidischer RT-Inhibitor (Azydothymidin), ein nicht-nukleosidischer RT-Inhibitor (Nevirapin) und ein Protease-Inhibitor (Indinavir) verwendet wurden. Die Medikamente

wurden in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Für jedes Medikament und jede Konzentration ergaben sich diskrete Messwerte, die auch graphisch dargestellt wurden. Wie in den Graphiken der Abbildung gezeigt wird, nahm mit der Erhöhung der Inhibitor-Konzentration die Anzahl der  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Zielzellen ab.



### **Abbildung 6. Hemmung der $\beta$ -Galaktosidase-Expression durch Zugabe von RT- und PR-Inhibitoren**

293T-Zellen wurden mit jeweils 6  $\mu$ g der  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Vektoren (pGJ3-lacZ bzw. pGJ3-lacZ-X15) und mit 6  $\mu$ g des pczVSV-G transfiziert. Die entstandenen pseudotypisierten Partikel wurden zur Transduktion von 293-Zellen verwendet. Die Transduktion der  $\beta$ -Galaktosidase kann durch Zugabe von RT- und PR-Inhibitoren auf konzentrationsabhängige Weise reduziert werden. Die Funktion des resistenten Vektors pGJ3-lacZ-X15 wird nur in geringem Maße durch die antiviralen Wirkstoffe beeinträchtigt.

Mit Hilfe der einzelnen Messwerten wurden die sogenannte  $IC_{50}$  (50% inhibitory concentration) ausgerechnet. Die  $IC_{50}$  entspricht der Wirkstoffkonzentration, welche benötigt wurde, die Anzahl der Markergen-exprimierenden Zielzellen auf 50% im Vergleich zur negativ Kontrolle zu reduzieren. Mit diesem Experiment wurde bestätigt, dass die Transduktion der  $\beta$ -Galaktosidase durch den replikationsinkompetenten HIV-Vektor von RT- und Protease-Inhibitoren auf konzentrationsabhängige Weise blockiert wird.

### 3.1.4. Klonierung eines HIV-Vektors mit multiplen Resistenzen gegen antivirale Substanzen

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Funktion des Wildtypvektors in Anwesenheit von verschiedenen Substanzen inhibiert werden kann, wurde untersucht, ob Resistenzen der viralen Enzyme gegen diese Inhibitoren mit dem Vektorsystem nachgewiesen werden könne. Dazu wurde das *pol*-Gen des Vektors mit einem multiresistenten *pol*-Gen, welches mehrere Mutationen in den Protease- und RT- Bereichen enthält, ausgetauscht. Die Sequenz stammte von einem molekularen HIV-Klon (pX15). Der Geno- bzw. Phänotyp des multiresistenten Klons wird in Tabelle 3 gezeigt. Um die Klonierung einfach überprüfen zu können, wurde zunächst ein KpnI-Linker im Bereich des *pol* Gens in das Plasmid pGJ3-lacZ, an die EcoRV Schnittstelle eingefügt. Dann wurde das dadurch erhaltene Plasmid pGJ3-lacZ-KpnI mit ApaI - PshAI verdaut und das mit denselben Enzymen geschnittene Fragment von pX15 hineinligiert. Da die zusätzliche KpnI-Schnittstelle nach der Insertion des Fragments verschwindet, konnte die erfolgreiche Klonierung über einen Restriktionsverdau mit KpnI getestet werden.

**Tabelle 3. Phäno- und Genotyp der in dieser Arbeit verwendeten Virusisolate**

<b>Virusisolat</b>	<b>Phenotyp</b>	<b>Genotyp</b>
X15 <sup>1</sup>	Resistenz gegen alle RT-Inhibitoren  Resistenz gegen IDV und RTV	M41L, D67N, K70R, K103N, M184V, L210W, R211K, L214F, T215Y, K219E V32I, M46I, A71V, V82A
105/A <sup>2</sup>	Wildtyp	
105/B <sup>2</sup>	schwache AZT-Resistenz	T215Y
105/F <sup>2</sup>	hohe AZT-Resistenz	D67N, K70R, T215Y, K219E
LAI <sup>3</sup>	Laborisolat (Wildtyp)	
RTMDR1 <sup>4</sup>	Resistenz gegen AZT, ddI und NVP	M41L, L74V, V106A, T215Y
SAQ <sup>R 5</sup>	Resistenz gegen Saquinavir	G48V, L90M

<sup>1</sup> (Universität Erlangen)

<sup>2</sup> (Boucher et al., 1992)

<sup>3</sup> (Wain-Hobson et al., 1985)

<sup>4</sup> (Larder et al., 1993)

<sup>5</sup> (Jacobsen et al., 1995)

### 3.1.5. Resistenzen gegen antivirale Wirkstoffe können nachgewiesen werden

Im Anschluss an die Klonierung des resistenten Klons wurde der oben beschriebene Test parallel mit beiden Konstrukten (pGJ3-lacZ und pGJ3-lacZ-X15) in Anwesenheit der gleichen Medikamente (Azidothymidin, Nevirapin und Indinavir) wiederholt. Mit dem multiresistenten Vektor wurde die gleiche Transferrate erreicht, wie mit dem wildtypischen. Wie die in Abbildung 6 dargestellten Graphiken zeigen wurde die Funktion des HIV-Vektors mit den resistenten Mutationen nur in geringem Maße durch die antiviralen Wirkstoffe beeinträchtigt. Es wurden wiederum die  $IC_{50}$  aus den einzelnen Daten ausgerechnet und miteinander verglichen. Tabelle 4 faßt die Daten dreier unabhängiger Experimente zusammen. Wie erwartet wurden bei dem resistenten Vektor Verschiebungen in den  $IC_{50}$  beobachtet. Die Resistenz wurde als Faktor gegenüber dem sensitiven  $IC_{50}$ -Wert angegeben.

**Tabelle 4.**

Medikament	$IC_{50}$ ( $\mu$ M) $\pm$ SEM (n=3)		fach Resistenz $\pm$ SEM (n=3)
	pGJ3-lacZ	pGJ3-lacZ-X15	
<b>AZT</b>	0,0343 $\pm$ 0,0075	27,66 $\pm$ 0,2728	910 $\pm$ 135,67
<b>Nevirapin</b>	0,1426 $\pm$ 0,0069	0,598 $\pm$ 0,2451	4,1 $\pm$ 1,4843
<b>Indinavir</b>	0,0008 $\pm$ 0,0003	0,07 $\pm$ 0,0272	8,65 $\pm$ 3,1789

(SEM - standard error)

### 3.1.6. Etablierung eines phänotypischen Resistenztests mit Hilfe eines Luciferase exprimierenden lentiviralen Vektors

Nachdem gezeigt wurde, dass mit dem Vektorsystem sowohl die Sensibilität als auch die Resistenz gegen Inhibitoren der viralen Enzyme nachgewiesen werden kann, wurde der Vektor weiterentwickelt und für die weitere Anwendung optimiert. Um das Testsystem schneller und aussagekräftiger durchführen zu können, wurde das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen durch das Luciferase-Gen ersetzt. Die Luciferase ist sehr sensitiv und hat einen hohen Messbereich. Die Analyse der Genexpression ist rasch durchführbar und die Vermessung der Enzymaktivität erfolgt im Luminometer und ist einfacher zu quantifizieren.

Zunächst wurde das Luciferase-Gen aus dem Luciferase-Expressionsplasmid pGL-3 (Promega) mit NheI und XbaI ausgeschnitten und in das von SacII und Esp3I verdauten

pGJ3- lacZ hineinligiert. Von dem klonierten Plasmid pGJ3-luci wurden weitere Plasmide, pGJ3-luci-KpnI bzw. pGJ3-luci-X15, analog zu den oben beschriebenen Plasmiden hergestellt. Anschließend wurde ein Resistenztest mit beiden Plasmiden (pGJ3-luci und pGJ3-luci-X15) durchgeführt und bestätigt, dass die Luciferase in den Zielzellen exprimiert wird und sowohl die Sensitivität, als auch die Resistenz des Vektors gegenüber Inhibitoren der Protease und Reversen Transkriptase nachgewiesen werden kann. Die Daten dieser Ergebnisse wurde mit den Daten verglichen, welche mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden Vektorsystems beobachtet wurden. Wie die Graphiken in Abbildung 7 zeigen, wird die Aktivität beider Markergene in gleichem Maße durch die Inhibitoren reduziert.

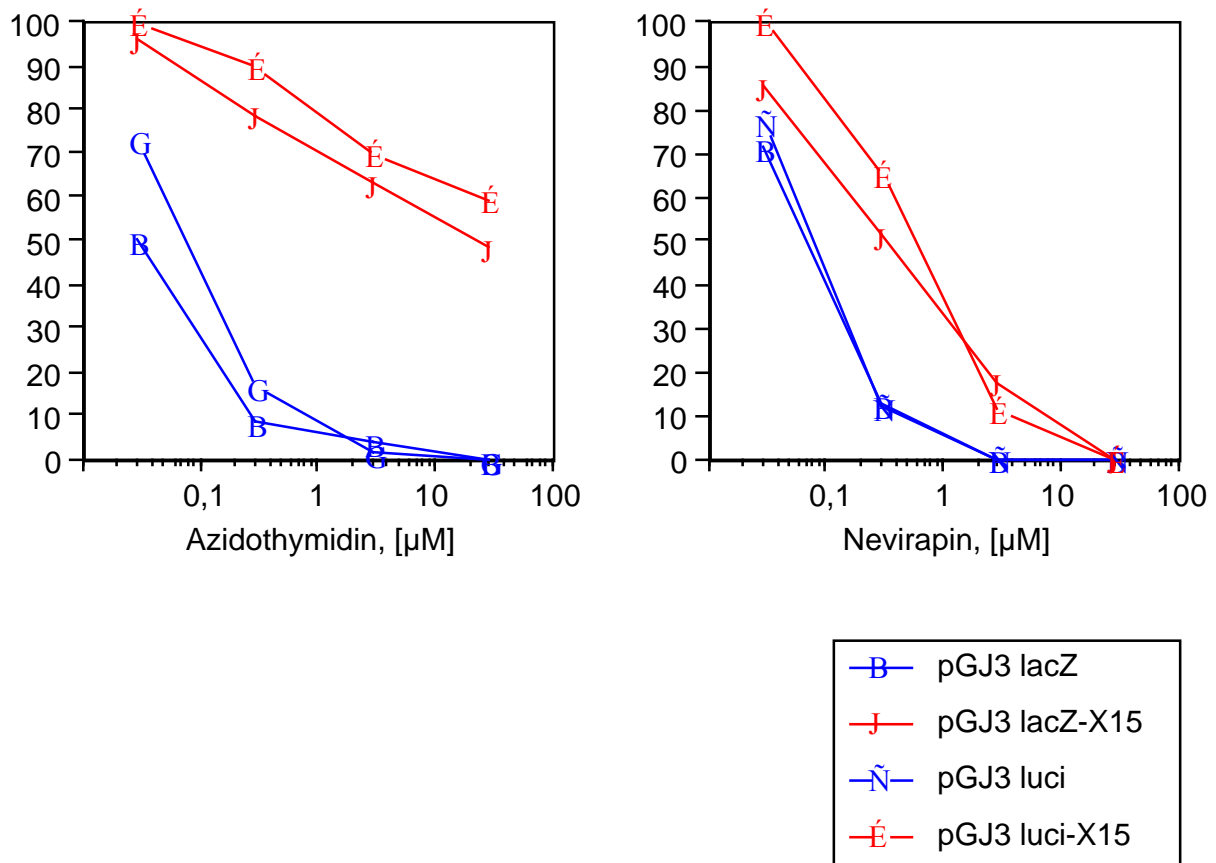
Nach den positiven Ergebnisse dieser Experimente wurde das Testsystem für die Durchführung größerer Versuchsansätze weiterentwickelt (vgl. 2.2.2.7.).

### **3.1.7. Klonierung und Austestung von HIV-Virusisolaten mit bekannten Resistenzen**

Um zu zeigen, ob mit Hilfe des Vektorsystems Resistenzen gegen antivirale Substanzen bei HIV nachgewiesen werden können, wurden zunächst Virusisolate mit bekannten Geno- und Phenotypen analysiert (Tabelle 3). Die virale RNA aus den verschiedenen Virusisolaten wurde zunächst mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Ein 2,2 kB großes Fragment aus dem *pol* Gen wurde durch nested-PCR mit den spezifischen äußeren (outpr2 und outrt) bzw. inneren Primern (outpr1 und inrt) amplifiziert (vgl. 2.1.9.). Die inneren Primer enthalten ApaI- bzw. PshAI-Spaltestellen, über die die amplifizierten Fragmente in das Plasmid pGJ3-luci-KpnI hineinkloniert wurden. Die erfolgreiche Insertion der Fragmente wurde über einen Restriktionsverdau mit KpnI überprüft.

Anschließend wurde eine Resistenztestung mit den dadurch erhaltenen Plasmiden nach dem modifizierten Protokoll (vgl. 2.2.2.7.) in Abwesenheit oder Gegenwart verschiedener Medikamente durchgeführt. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass sich die Resistenzprofile der viralen Isolate mit Hilfe des weiterentwickelten Testsystems reproduzierbar nachweisen lassen. Die in den Experimenten beobachteten Resistenzprofile korrelierten mit den aus der Literatur bereits für diese Virusisolate bekannten Resistenzen.





### **Abbildung 7. Vergleich der $\beta$ -Galaktosidase- und Luciferase-exprimierenden Vektorsystemen**

293T-Zellen wurden jeweils mit 6  $\mu$ g der oben angegebenen Vektorkonstrukte und mit 6  $\mu$ g des pczVSV-G transfiziert. Die hergestellten pseudotypisierten Partikel wurden zur Transduktion von 293-Zellen verwendet. 48 Stunden nach der Transduktion wurde die Expression der jeweiligen Markergene mit dem entsprechenden Nachweisverfahren quantitativ analysiert. Die Ergebnisse der zwei verschiedenen Vektorsysteme sind vergleichbar.

### **3.1.8. Austestung von Resistenzen von HIV aus dem Serum HIV-infizierter Patienten**

Im Anschluss an die Experimente mit bekannten Virusisolaten wurde HIV aus dem Serum HIV-infizierter Patienten getestet. Die virale RNA wurde aus dem Patientenplasma mit Hilfe des QiaAmp Viral RNA Kits (Qiagen) aufgereinigt, auf die oben geschriebene Weise amplifiziert und anschließend in den Vektor pGJ3-luci-Kpn hineinkloniert.

A)

Drug	Isolate	IC 50 (µM)			
		1	2	3	Mean ± SEM
AZT	105/A	0,065	0,05	0,1	0,072 ± 0,015
	105/B	2,13	2,03	3,8	2,65 ± 0,57
	105/F	36,98	35,69	43,25	38,64 ± 2,34
NVP	LAI	0,184	0,213	0,166	0,188 ± 0,01
	RTMDR1	5,74	12,76	9,75	9,417 ± 2,03
SQV	105/A	5,5	3	6,1	4,867 ± 0,95
	SAQ <sup>R</sup>	11,76	14	10,41	12,057 ± 1,05

B)

Drug	Isolate	Fach Resistenz			
		1	2	3	Mean ± SEM
AZT	105/A				
	105/B	32,8	40,6	38	37,13 ± 2,3
	105/F	568,9	713,8	432,5	571,74 ± 81,2
NVP	LAI				
	RTMDR1	31,2	59,9	58,7	49,93 ± 9,37
SQV	105/A				
	SAQ <sup>R</sup>	2,14	4,67	1,7	2,837 ± 0,925

**Tabelle 5. Phänotypische Resistenztestung von HIV-Isolaten mit bekannten Resistenzen**

Virusisolaten mit bekannten Geno- und Phänotypen wurden mit dem weiterentwickelten Testsystem (vgl. 2.2.2.7.) analysiert. Die viralen Isolate wurden in Gegenwart der entsprechenden Medikamente getestet und aus den einzelnen Messwerten die IC<sub>50</sub>-Werte ausgerechnet (A). Die Resistenz wurde als Faktor gegenüber dem IC<sub>50</sub>-Wert eines sensitiven Kontrollisolates angegeben (B). Wie die Daten aus drei unabhängigen Experimenten zeigen, sind die Ergebnisse reproduzierbar und decken sich mit den publizierten Resistenzprofilen der entsprechenden Virusisolate. (SEM - standard error)

Die in 3.1.6. beschriebene Resistenztestung wurde durchgeführt. Für die Hemmung der PR- bzw. RT-Enzyme wurden alle zur Zeit zur Verfügung stehenden Medikamente verwendet

(vgl. 2.1.4.). Parallel zur phänotypischen Testung wurden die Patienten in der Diagnostik-Abteilung des Institutes auch genotypisch getestet. Die Phäno- und Genotypen der getesteten Isolate werden in Tabelle 6 bzw. 7 gezeigt. Die getesteten Phänotypen zeigten eine enge Korrelation mit den Genotypen. Bei Patient 1, bei dem Resistenzen gegen mehrere Substanzen aus der Gruppe der RT- und PR-Inhibitoren gefunden wurden, wurden zahlreiche Mutationen im Bereich beider Gene detektiert. Die von Patient 2 gewonnenen HIV-Gene zeigten weder bedeutsame Mutationen noch auffällige Resistenz im Test.

**Tabelle 6. Virusphänotyp von zwei HIV-infizierten Patienten**

	Medikament	IC <sub>50</sub> (Fach Resistenz)		
		Wildtyp	Patient #1	Patient #2
NRTIs	Zidovudin [µM]	0,036	26,1 (726)	0,023 (1)
	Didanosin [µM]	10,7	25,6 (2,4)	9,99 (1)
	Stavudin [µM]	0,98	9,18 (9,4)	0,81 (1)
	Abacavir [µM]	1,7	20,8 (12,6)	1,2 (1)
NNRTIs	Nevirapin [µM]	0,22	> 3 (> 13,5)	0,13 (1)
	Delavirdin [µM]	0,036	2,98 (83)	0,023 (1)
	Efavirenz [µM]	0,023	> 3 (> 130)	0,014 (1)
PIs	Saquinavir [nM]	7,26	> 100 (> 14)	2,14 (1)
	Indinavir [nM]	11	280 (25,5)	13,4 (1,2)
	Ritonavir [nM]	24,74	> 300 (> 12)	19,2 (1)
	Nelfinavir [nM]	17,32	68,5 (4)	17,1 (1)
	Amprenavir [nM]	2,32	17 (7,3)	10 (4,3)

**Tabelle 7. Virusgenotyp von zwei HIV-infizierten Patienten**

Patient	Mutationen im PR-Bereich	Mutationen im RT-Bereich
#1	L10I, M46I, L63P, A71V, V77I, I84V, L90M	M41L, D67N, T69D, L74V, L100I, K103N, V108I, M184V, L210W, R211K, T215Y
#2	L10I, A71T	

### 3.1.9. Austestung antiviraler Substanzen gegen die HIV-Integrase

In den vergangenen Jahren wurden Substanzen gegen die Integrase des HIV entwickelt. Diese wurden bisher nicht als Medikamente zur Therapie der HIV-Infektion eingesetzt. In vitro-Experimente haben gezeigt, dass die Inhibitoren die für die virale Replikation notwendige Integration in das Genom der Wirtszelle hemmen (Hazuda et al, 2000).

Es wurde untersucht, ob die Sensitivität der Vektor pGJ3-luci gegen die Integrase-Inhibitoren mit Hilfe des Testsystems nachgewiesen werden kann. Dazu wurde das oben beschriebene Protokoll durchgeführt. Die Substanzen wurden bei der Transduktion auf die Zielzellen gegeben (vgl. 2.1.4.). Die Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Aus den einzelnen Daten wurden die  $IC_{50}$  ausgerechnet. Die Daten dieser Experimente werden in Tabelle 8 zusammengefasst. Es wurde nachgewiesen, dass die Transduktion der Luciferase durch den HIV-Vektor von Integrase-Inhibitoren auf konzentrationsabhängige Weise blockiert wird.

**Tabelle 8. Austestung antiviraler Substanzen gegen die HIV-Integrase**

<b>Medikament</b>	<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu</math>M) <math>\pm</math> SEM (n=3)</b>
L 708.906	1,16 $\pm$ 0,34
L 731.966	2,28 $\pm$ 0,66

(SEM - standard error)

## **3.2. Analyse der Pseudotypisierbarkeit von HIV-Kapsiden**

Lentiviren sind in der Lage, Hüllproteine anderer Retroviren (z.B. MuLV) und sogar Hüllproteine von Viren aus fremden Virusfamilien (z.B. VSV oder Influenza) in ihre Viruspartikel einzubauen. Durch diese Pseudotypisierung kann es zu einer Verschiebung des Wirtsspektrums kommen und die hergestellten gemischten Viruspartikel können Zielzellen infizieren, die durch das Wildtypvirus normalerweise nicht infizierbar sind. Da Foamyviren (FV) ein sehr breites Wirtsspektrum haben, wurde der Frage nachgegangen, ob lentivirale Vektoren das Hüllprotein von FV in ihre Partikel einbauen und damit infektiöse Partikel freisetzen können.

### **3.2.1. Expressionskonstrukte für Foamyvirus-Hüllproteine**

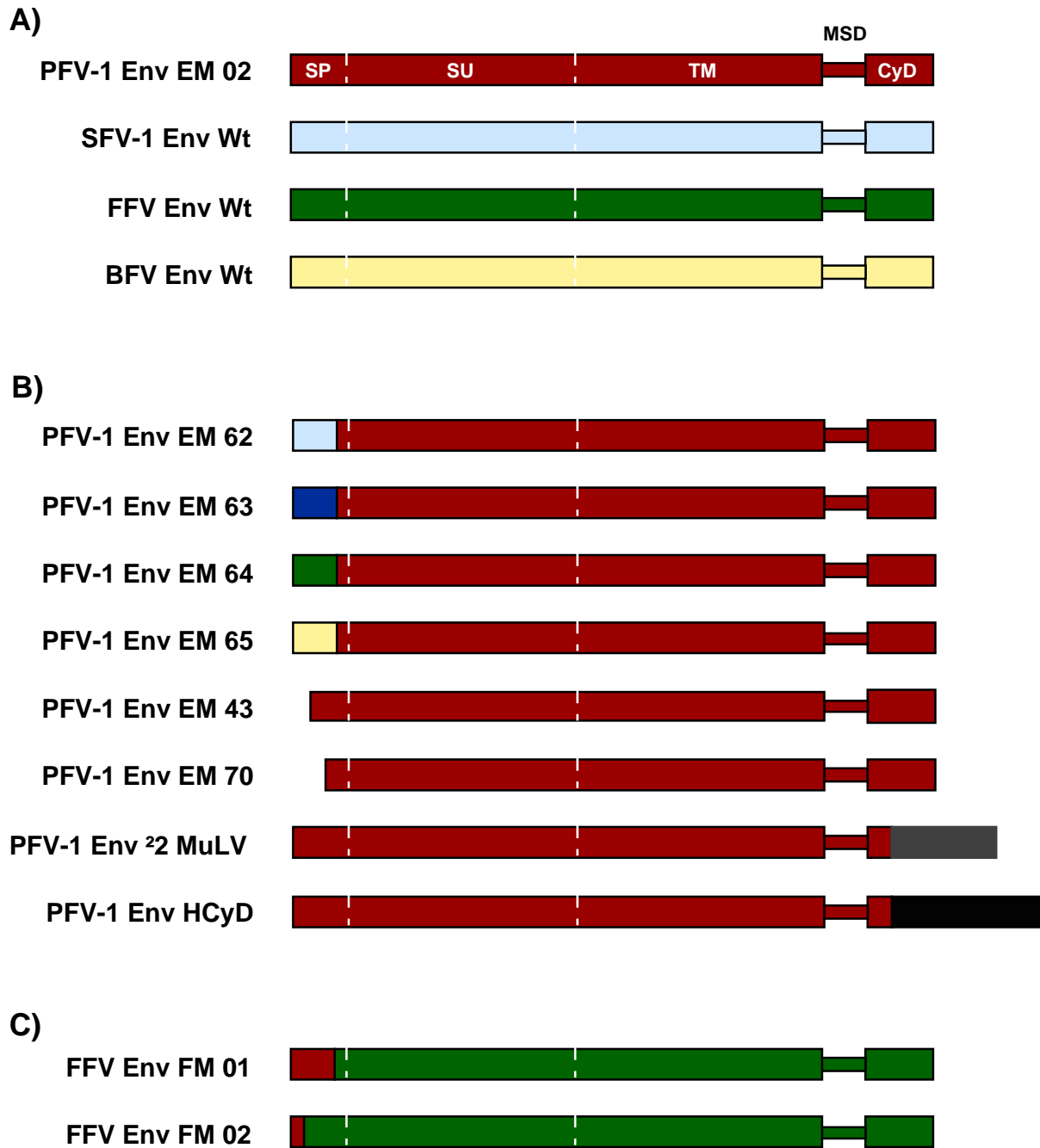
Zur Untersuchung der Pseudotypisierbarkeit von HIV-Kapsiden wurden FV-Hüllproteine von Virusisolaten aus verschiedenen Spezies untersucht. Es wurden Hüllproteine von FV-Isolaten aus Primaten (Primate Foamy Virus; PFV-1 und Simian Foamy Virus; SFV), Rindern (Bovine Foamy Virus; BFV) und Katzen (Feline Foamy Virus; FFV) verwendet. Zusätzlich wurde eine Reihe chimärer Expressionskonstrukte hergestellt, um die Funktion der verschiedenen Hüllproteinebereiche näher zu analysieren.

Ein großer Teil der verwendeten Expressionskonstrukte standen für die Testung bereits zur Verfügung (vgl. 2.1.8.). Bei dem Plasmid pczPFV-1-Env EM02 wurde das interne Spleissdonor und -akzeptorpaar durch Einfügung von Mutationen inaktiviert, so dass ein alternatives Spleißen der Env mRNA, das zu einer verkürzten, sekretierbaren Form der extrazellulären Domänen des PFV-1-Env Proteins führt, verhindert wird (Lindemann et al., 1998). Außerdem wurden wildtypische Expressionskonstrukte verwendet, die für die vollständigen Hüllproteine des SFV-1, BFV und FFV kodierten (Abbildung 8a). Diese Plasmide wurden als Ausgangskonstrukte für die Herstellung weiterer Mutanten verwendet. Neueste Experimente zeigten, dass bei der Interaktion zwischen Hüllprotein und Kapsid von Primaten-Foamyviren das N-terminal liegende Signalpeptid des FV-Env Proteins eine essentielle Funktion hat (Lindemann et al., 2001). Um die Rolle des FV Signalpeptids bei der Pseudotypisierung von HIV-Kapsiden zu untersuchen, wurden die Signalpeptidchimäre EM 62 - 65 verwendet. Bei diesen Mutanten wurde der N-Terminus des ursprünglichen PFV-1-Env Signalpeptids durch den des Signalpeptids von SFV-1- (EM62), SFV-3- (EM63), FFV- (EM64) bzw. BFV-Env (EM65) ersetzt (Abbildung 8b). Die Mutanten EM43 bzw. EM70 sind Verkürzungen des PFV-1-Env Proteins, bei denen vom N-terminalen Bereich des

Signalpeptids sukzessive größere Teile entfernt worden sind (Abbildung 8b) (Lindemann et al., 2001). Um die Rolle des C-terminal liegenden zytoplasmatischen Region der TM-Untereinheit bei der Pseudotypisierung zu untersuchen, wurde die Mutante pczPFV-1-Env  $\Delta$ 2MuLV verwendet, bei der der größte Teil der zytoplasmatischen Domäne (CyD) des PFV-1-Env Proteins durch die gesamte unprozessierte CyD des MuLV-Env Proteins ersetzt wurde (Lindemann et al., 1997). Dieses Konstrukt ist im Vergleich zum wildtypischen PFV-1-Env in der Lage, MuLV-Kapside mit hoher Effizienz zu pseudotypisieren (Lindemann et al., 1997). Analog zu diesem Konstrukt wurde im Rahmen dieser Arbeit die Mutante PFV-1-Env HCyD hergestellt, bei der die vollständige CyD von HIV-1-Env an das C-terminale Ende der verkürzten PFV-1-Env CyD fusioniert wurde.

Auf Basis des wildtypischen FFV-Env-Expressionskonstrukts wurden zwei Signalpeptidchimäre, FM01 bzw. FM02 hergestellt (Abbildung 8c). Bei der FM01-Mutante wurden die ersten 59 Aminosäuren (AS) des FFV-Env Signalpeptids durch die ersten 61 AS des PFV-1-Env SP, bei der FM02 Mutante die ersten 6 AS des FFV-Env SP durch die ersten 4 AS des PFV-1-Env SP ersetzt.

Die bei der Pseudotypisierungsstudie verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.



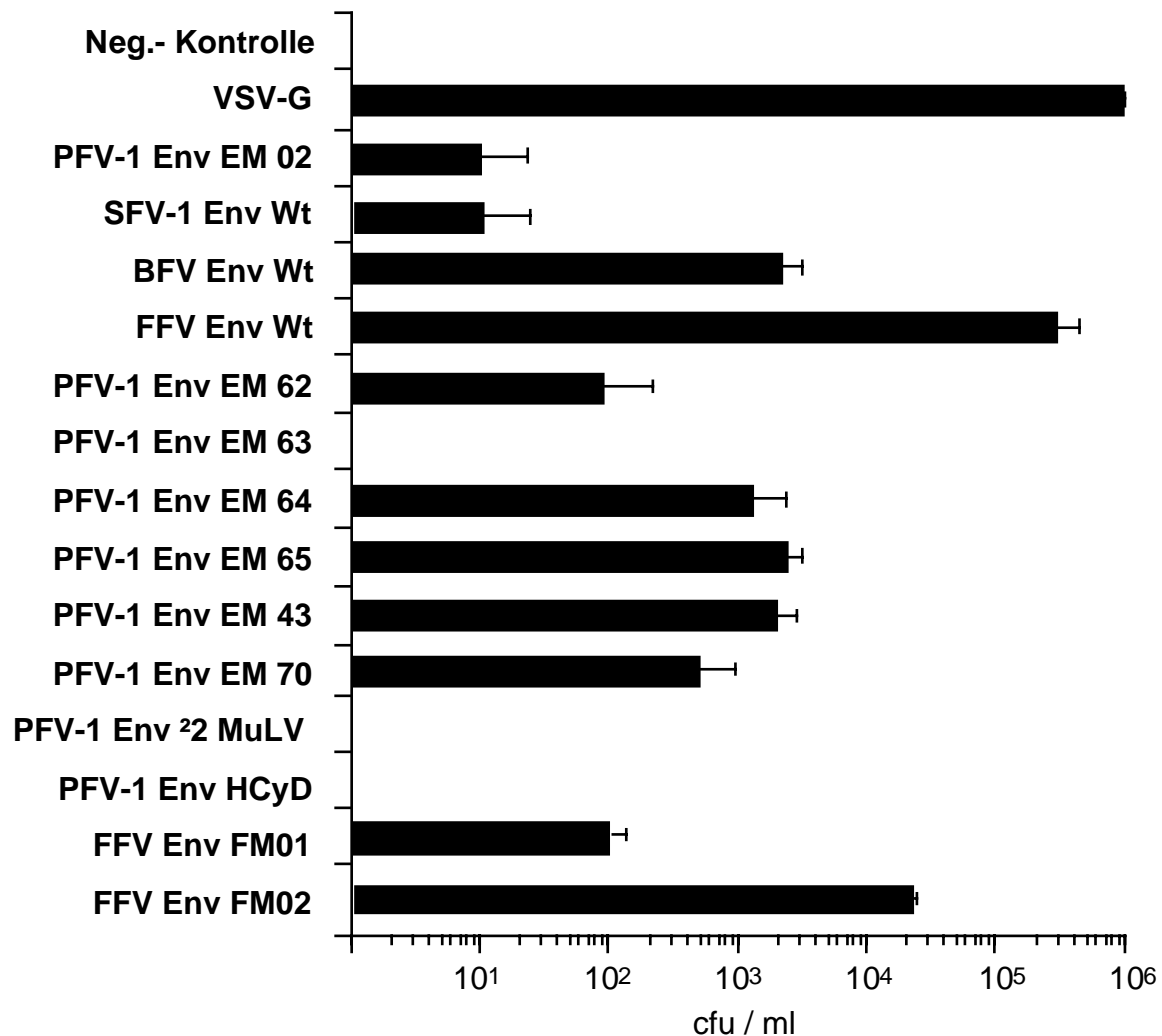
### **Abbildung 8. Schematische Darstellung der FV Env-Expressionskonstrukte**

In (A) sind die wildtypischen Env-Expressionskonstrukte aus verschiedenen Spezies dargestellt. In (B) sind die Signalpeptid (SP)- bzw. zytoplasmatische Domäne (CyD)-Mutanten von PFV-1 Env, in (C) die Signalpeptidmutante von FFV Env schematisch dargestellt. Die extrazellulären Anteile sowie die membranspannende Domäne (MSD) und die CyD der Hüllproteine sind graphisch voneinander abgesetzt. Die Hüllproteine werden in die Oberflächen- (surface - SU) und Transmembranuntereinheit (TM) prozessiert. Das N-terminal liegende SP, das dafür verantwortlich ist, dass das Env Protein in den sekretorischen Syntheseweg der Zelle gelangt, wird posttranslational durch ein zelluläres Enzym abgespalten. Beide Spaltstellen sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Die schematisch dargestellten Expressionskonstrukte wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+/Zeo kloniert und durch den CMV-Promotor exprimiert.

### **3.2.2. Analyse der Transduktionseffizienzen von pseudotypisierten HIV Kapside durch Titration**

Zunächst wurde untersucht, ob HIV in der Lage ist, die verschiedenen heterologen und chimären FV-Hüllproteine in ihre Kapside einzubauen und damit pseudotypisierte, infektiöse Partikel freizusetzen. Dazu wurde der replikationsinkompetente lentivirale Vektor pGJ3-lacZ verwendet (vgl. 3.1.1.). Der Vektor exprimiert außer den für die Partikelfreisetzung notwendigen Gag- und Pol-Proteinen ein zusätzliches  $\beta$ -Galaktosidase Markergen, welches die Bestimmung der Transduktionseffizienz der Zielzellen ermöglichte. Es wurden zunächst 293T-Zellen mit jeweils 6  $\mu$ g der in Abbildung 8 dargestellten Expressionskonstrukte und mit je 6  $\mu$ g des pGJ3-lacZ Vektors transfiziert. Achtundvierzig Stunden später wurden die Überstände geerntet, sterilfiltriert (0,45  $\mu$ m) und für die Titration auf 293-Zellen verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde weitere 48 Stunden später durch eine histochemische Färbung der Virusverdünnungen analysiert. Die Daten dieser Experimente sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Wie in der Literatur beschrieben zeigten die Ergebnisse, dass das PFV-1-Env HIV-Kapside nur äußerst schlecht pseudotypisieren kann (Mochizuki et al., 1998). Ähnlich verhielt sich das andere getestete Primaten FV-Env Konstrukt, SFV-1-Env. Für das BFV-Env Protein war jedoch bereits eine deutliche Steigung der Pseudotypisierung beobachtbar. Die mit Abstand höchsten Pseudotypentiter von etwa  $3 \times 10^5$  cfu / ml wurden allerdings durch das FFV-Env Protein erreicht (Abbildung 9). Im Gegensatz zum PFV-1-Env zeigten die Signalpeptidchimäre PFV-1-Env EM64 und EM65 eine deutlich erhöhte Pseudotypisierbarkeit von HIV-Vektoren. Im Gegensatz dazu wurde die Pseudotypisierbarkeit des FFV-Env Proteins durch das sukzessive Einfügen von PFV-1-Env SP Sequenzen (FM01 und FM02) deutlich verringert. Eine Erhöhung der Pseudotypisierungsfähigkeit des PFV-1-Env Protein konnte ebenfalls durch eine N-terminale Verkürzung des ursprünglichen Signalpeptids im Vergleich zum wildtypischen Protein erreicht werden. Der Austausch der ursprünglichen FV-Env zytoplasmatischen Domäne durch die von MuLV bzw. HIV hingegen hatte keinen Einfluss auf die Pseudotypisierbarkeit von HIV Kapsiden.





**Abbildung 9. Transduktionseffizienz heterologer und chimärer Hüllproteine**

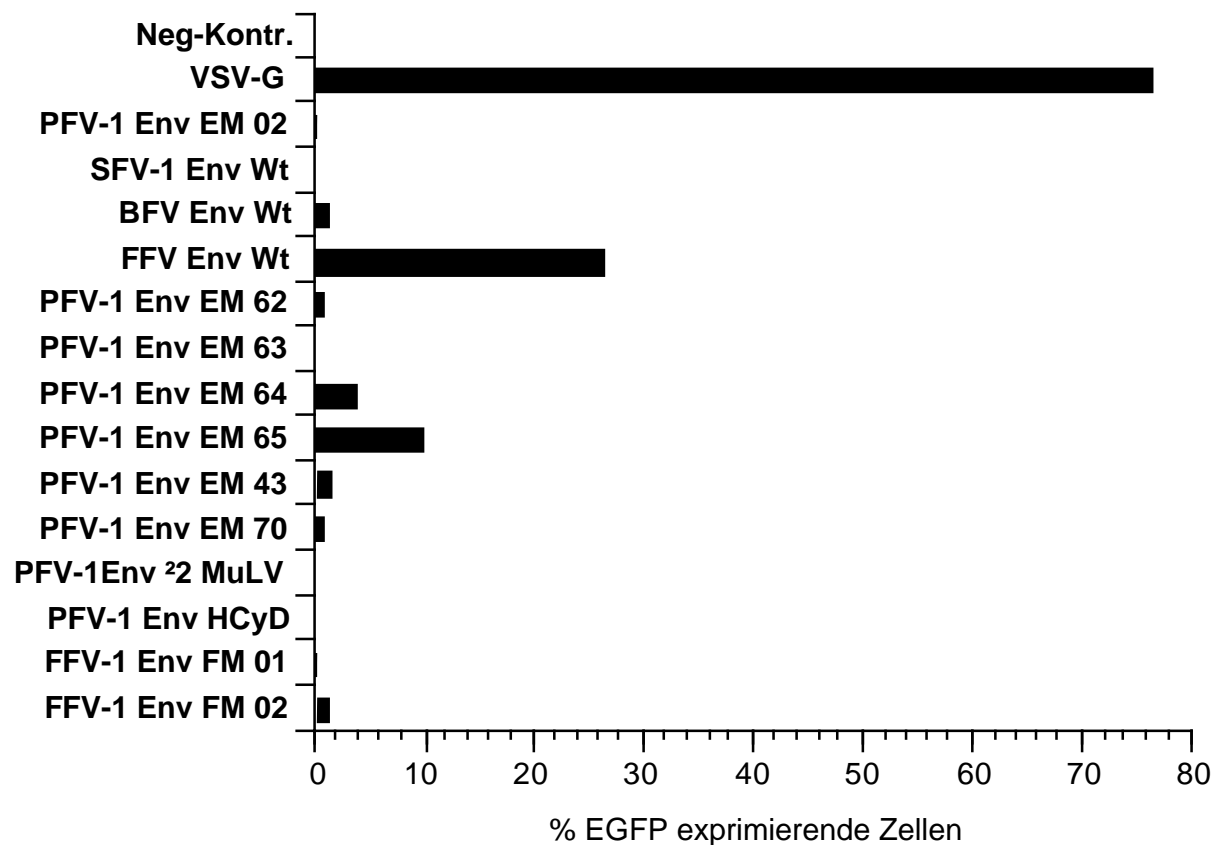
293T-Zellen wurden jeweils mit 6 µg der in Abbildung 8 dargestellten Expressionskonstrukte und mit 6 µg des β-Galaktosidase-exprimierenden pGJ3-lacZ-Vektors transfiziert. Die hergestellten Partikel wurden zur Transduktion von 293-Zellen verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde 48 Stunden später durch eine histochemische LacZ-Färbung qualitativ analysiert. Die β-Galaktosidase-exprimierenden Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und der Titer in cfu (colony forming unit) / ml angegeben.

### 3.2.3. Analyse der relativen Transduktionseffizienz durch durchflußzytometrische Analyse

Ergänzend zu den oben beschriebenen Experimenten wurde die Transduktionseffizienz der verschiedenen Pseudotypen mit Hilfe eines EGFP (enhanced green fluorescent protein)-exprimierenden Vektors analysiert. Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde die EGFP-Expressionskassette aus dem Foamyvirus-Vektor pMH118 einem Derivat von pMH62

(Pietschmann et al., 1999), mit AatII und NotI ausgeschnitten und in den pGJ3-Vektor an die Esp3I-Restriktionsstelle hineinkloniert.

Die Herstellung pseudotypisierter Partikel und die Transduktion erfolgte wie oben beschrieben. Die Transduktionseffizienz wurde weitere 48 Stunden später durch durchflußzytometrische Analyse bestimmt. Die Daten dieser Experimente werden in Abbildung 10 gezeigt.



**Abbildung 10. Relative Transduktionseffizienz heterologer und chimärer Hüllproteine**

293T-Zellen wurden jeweils mit 6 µg der oben dargestellten Expressionskonstrukte und mit je 6 µg des EGFP-exprimierenden Vektors, pGJ3-egfp transfiziert. Die hergestellten Partikel wurden zur Transduktion von 293-Zellen verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde 48 Stunden später durch durchflußzytometrische Analyse bestimmt.

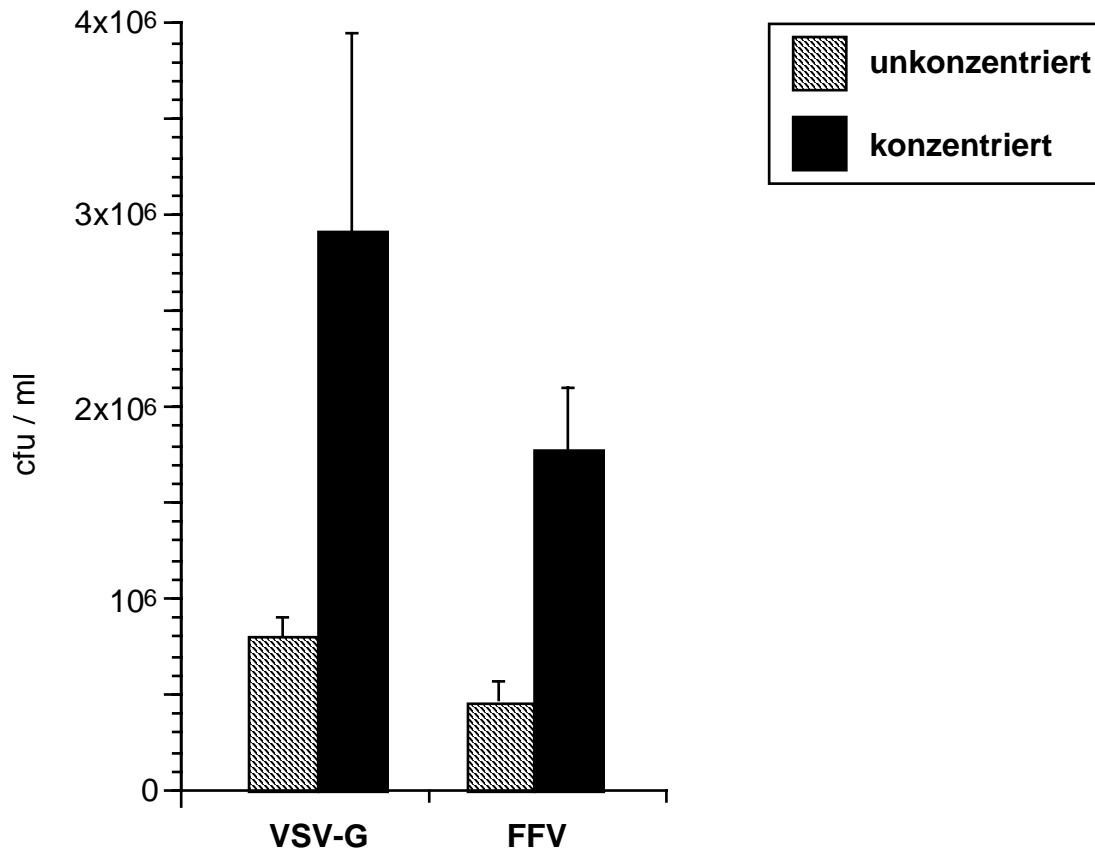
Die relative Transduktionseffizienz der einzelnen EGFP-Konstrukte korrelierte gut mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit dem pGJ3-lacZ-Vektor. Beim Vergleich der Daten ist zu beachten, dass bei der Titration aufgrund der hohen Sensitivität des β-Galaktosidase-

Markergen auch niedrige Vektortransferraten quantifiziert werden konnten. Daher wurde in Abbildung 9 ein logarithmischer Maßstab zur Darstellung der Daten gewählt.

#### **3.2.4. Konzentrierung pseudotypisierter viraler Partikel**

Wie bereits beschrieben bestimmt das zur Pseudotypisierung verwendete Hüllprotein die Stabilität der hergestellten Pseudotypen. Diese spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Konzentrierung von Vektoren. Mit VSV-G pseudotypisierte Partikel sind sehr stabil und lassen sich durch Zentrifugation ohne großen Aktivitätsverlust konzentrieren (Burns et al., 1993). Nachdem gezeigt wurde, dass das Hüllprotein von FFV die Partikelfreisetzung des HIV mit hoher Effizienz unterstützen kann, wurde nun untersucht, ob diese Pseudotypen auch konzentriert werden können. Für die Konzentrierungsexperimente wurden Pseudotypen des  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden HIV-Vektors verwendet. Die viralen Überstände wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll hergestellt. Ein Teil der Überstände wurde unkonzentriert für die Transduktion von 293-Zellen verwendet, während der Rest vorher in der Ultrazentrifuge pelletiert und anschließend 20-fach konzentriert wurde (2.2.2.9.). Um den jeweiligen Titer zu bestimmen, wurde 48 Stunden später eine histochemische LacZ-Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die mit VSV als auch die mit FFV-Env pseudotypisierten HIV-Partikel konzentriert werden konnten (Abbildung 11).

Obwohl die Konzentrierbarkeit von FFV-Pseudotypen niedriger war, als die von VSV-Pseudotypen, zeigte sich, dass durch die Pseudotypisierung von HIV-Kapsiden mit dem wildtypischen FFV-Env stabile Partikel entstehen.



**Abbildung 11. Konzentrierung pseudotypisierter viraler Partikel**

293T-Zellen wurden jeweils mit 6 µg des pczVSV-G bzw. pczFFV Env und mit je 6 µg des pGJ3-lacZ Vektors transduziert. Ein Teil der viruspartikelhaltigen Überstände wurde unkonzentriert zur Transduktion von 293-Zellen verwendet, der Rest wurde unter den beschriebenen Bedingungen (vgl. 2.2.2.9.) 20-fach konzentriert und danach zur Transduktion verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde durch Titration bestimmt.

## 4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines replikationsinkompetenten lentiviralen Vektorsystems. Mit Hilfe dieses lentiviralen Vektorsystems wurde zunächst eine Methode zur Testung der Wirksamkeit von antiviralen Medikamente bei HIV-Infizierten etabliert. Weiterhin wurden mit dem Vektorsystem Pseudotypisierungsexperimente durchgeführt, um zu testen, ob Foamyvirus (FV) Hüllproteine aus verschiedenen Spezies HIV-Kapside pseudotypisieren können und welche Bereiche des Hüllproteins für die Pseudotypisierung notwendig sind.

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe lentiviraler Vektoren, meist abgeleitet vom Humanen Immundefizienzvirus (HIV), für verschiedene Studien hergestellt. Da HIV ein sehr hohes Pathogenitätspotential hat, müssen bei der Herstellung der auf HIV basierenden Vektorsysteme wichtige Sicherheitsaspekte beachtet werden (Verma und Somia, 1997). Ein Vektorsystem besteht aus den Vektor- und Verpackungskonstrukten. Das Vektorkonstrukt selbst enthält außer dem zu transferierenden Fremdgen nur die *cis*-aktiven Sequenzen, die für die Verpackung der viralen RNA, für die reverse Transkription und Integration essentiell sind (Aldovini et al., 1990, Parolin et al., 1994). Durch die Deletion der kodierenden Regionen aus dem Vektorkonstrukt wird sichergestellt, dass dieses nach der Transduktion von Zielzellen nicht replizieren kann. Die für die Transduktion notwendigen Proteine werden in *trans* zur Verfügung gestellt. Bei der Herstellung eines sicheren Vektorsystems muß verhindert werden, dass das Verpackungskonstrukt durch homologe Rekombination mit dem Vektorkonstrukt rekombinieren kann. Um dies zu erreichen, werden die für die Produktion viraler Partikel benötigten Gag-Pol- und Env-Expressionskonstrukte auf zwei weitere Plasmide aufgeteilt und möglichst alle *cis*-aktiven Sequenzen aus diesen Konstrukten entfernt. Bei dem ersten publizierten Vektorsystem enthielt das Gag-Pol-Expressionskonstrukt jedoch noch alle akzessorischen Gene (Naldini et al., 1996). Bei weiterentwickelten Vektorsystemen wurden daraufhin alle, für die Replikation entbehrlichen akzesorischen Gene (*vif*, *vpu*, *vpr* und *nef*) deletiert (Zufferey et al. 1997). Damit wurden wichtige Pathogenitätsfaktoren aus dem Verpackungskonstrukt entfernt und dieses auf die *gag*, *pol*, *tat* und *rev* Gene von HIV reduziert. Weitere Experimente haben gezeigt, dass auch *tat* aus dem Verpackungskonstrukt deletiert werden kann. Durch den Austausch der ursprünglichen 5'U3-Region mit einem konstitutiv aktiven Promotor wurden *tat*-unabhängige Konstrukte hergestellt (Kim et al., 1998, Dull et al., 1998). Das Rev wird zur Sicherstellung des RNA-Transports verwendet.

Alternativ dazu können *rev*-unabhängige Vektorsysteme hergestellt werden, bei denen anstelle von *rev* ein heterologes Transportelement verwendet wurde, (Kim et al., 1998, Zufferey et al., 1998). Dull und seine Kollegen haben ein wieder anderes Vektorsystem entwickelt, in dem das Rev aus einem eigenen Konstrukt exprimiert wird. Damit wurde die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination nochmals deutlich minimiert (Dull et al., 1998).

Außerdem können die Promotorsequenzen aus der 3'U3-Region des Vektors deletiert werden. Diese eingeführte Deletion hat keinen Effekt auf den Vektortransfer, da aber die 5'U3-Region im Laufe der reversen Transkription aus dem 3'U3 der viralen RNA gebildet wird, ist dieser Promotor in den Zielzellen nach dem Umschreiben der viralen RNA inaktiv und deswegen werden keine virale Proteine exprimiert. Die Herstellung dieser sogenannten self-inactivating Vektoren führt zu einer erhöhten Sicherheit (Zufferey et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde ein replikationsinkompetentes lentivirales Vektorsystem etabliert. Für die Herstellung des Vektors wurde das provirale HIV-Plasmid, pHXB-2D (Shaw et al., 1984) verwendet. Die ursprüngliche 5'U3-Region wurde durch den konstitutiv aktiven CMV-Promotor ersetzt, so dass *tat* deletiert werden konnte. Außerdem wurden aus dem HIV-Genom *env* und alle akzessorische Gene mit der Ausnahme von *rev*, sowie die Promotorsequenzen aus der 3'U3-Region deletiert. In den Vektor wurde anschließend ein Markergen ( $\beta$ -Galaktosidase, Luciferase oder EGFP), unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors eingesetzt. Mit Hilfe dieses Vektorsystems wurden ausschließlich verschiedene in vitro-Experimente durchgeführt. Da durch die eingeführten Deletionen *env* und die wichtigen Virulenzfaktoren aus dem Vektorkonstrukt entfernt worden sind, wurde die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination deutlich reduziert und deswegen auf die Trennung der Vektor- und Gag-Pol-Expressionskonstrukte verzichtet. Damit wurde das oben beschriebene Dreiplasmidsystem (Vektor-, Gag-Pol- und Env-Expressionskonstrukt) auf zwei Komponenten reduziert.

## **4.1. Etablierung einer Methode zur Testung der Wirksamkeit von antiviralen Substanzen bei HIV-infizierten Patienten**

Die Infektion mit HIV führt zu einer progredienten Zerstörung des Immunsystems mit tödlichem Ausgang. Zur Zeit leben über 36 Millionen Menschen weltweit mit HIV/AIDS und jedes Jahr werden über 5 Millionen Menschen mit dem tödlichen Virus infiziert (UNAIDS Report, 2000).

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Medikamente zur Therapie einer HIV-Infektion entwickelt. Die Substanzen, die zur Zeit verwendet werden, hemmen die Funktion der Protease oder der Reversen Transkriptase des HIV (Schmit et al., 1997). Reverse Transkriptase-Inhibitoren blockieren das Umschreiben des viralen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA, die Protease-Inhibitoren binden an die virale Protease und verhindern die Prozessierung der gebildeten Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine. Diese Substanzen können die Viruslast der Patienten reduzieren und im idealen Fall auf niedrigem Niveau halten. Sie können die Viren aber nicht vollständig aus dem infizierten Körper eliminieren. Aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus können sich während der Therapie Mutanten entwickeln, die gegen eines oder mehrere der eingesetzten Medikamente resistent sind (Coffin, 1995). Dies führt dazu, dass sich Viren trotz Therapie wieder vermehren und das Immunsystem des Infizierten weiter zerstören. Da mehrere Medikamente zur Behandlung von Infizierten zur Verfügung stehen, besteht die Möglichkeit bei einer Medikamentenresistenz den Infizierten mit Wirkstoffen zu behandeln, gegen die das Virus noch sensibel ist. Das Resistenzprofil der Viren in Infizierten kann sowohl genotypisch als auch phänotypisch charakterisiert werden (Hirsch et al. 1998). Mit Hilfe der genotypischen Resistenztestung können die charakteristischen Mutationen in den Protease- und RT-Bereichen des viralen *pol*-Gens nachgewiesen werden, welche die Resistenzen gegen die Inhibitoren verursachen. Die genotypische Resistenztestung stellt eine rasch durchführbare Methode dar. Allerdings lässt sie nur Aussagen über bereits definierte Mutationen zu. Um die Auswirkung eines komplexen Genotyps auf das Resistenzprofil zu untersuchen, müssen phänotypische Resistenztestungen durchgeführt werden. Bei einer phänotypischen Resistenztestung wird das Virus in Anwesenheit von antiviralen Medikamenten kultiviert und die Virusvermehrung vermessen. Bei den ersten durchgeführten phänotypischen Testmethoden wurde Virus aus Patientenplasma isoliert und auf primären mononukleären Zellen des peripheren Blut (PBMC) in Gegenwart von Medikamenten kultiviert und die Virusvermehrung gemessen (Japour et al.,

1993). Bei einer weiterentwickelten Methode werden die PR- und RT-Gene aus Patientenplasma mittels RT-PCR amplifiziert und durch homologe Rekombination in ein provirales HIV-Plasmid, aus dem die entsprechenden Genabschnitte deletiert wurden, eingesetzt. Die Vermehrung der rekombinanten Viren wird in Gegenwart von Medikamenten vermessen (Hertogs et al, 1998). Beide Methoden besitzen wesentliche Nachteile. Sie erfordern die Anzucht von infektiösen Viren und können deswegen nur in Sicherheitslaboratorien der Stufe 3 durchgeführt werden. Die Durchführung der Methoden dauert mehrere Wochen, sogar Monate. Diese Zeitverzögerung ist für die Optimierung einer Behandlung HIV-infizierter Patienten ungünstig. Außerdem können während des Verfahrens besondere Virusstämme selektioniert werden, so dass die Ergebnisse nicht die reelle in vivo-Situation widerspiegelt (Hirsch et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob eine phänotypische Resistenztestung mit Hilfe des hergestellten replikationsinkompetenten Vektorsystems durchführbar ist. Ein replikationsinkompetentes Vektorsystem ist in der Lage Zielzellen zu infizieren ohne neue infektiöse Partikel herzustellen. Da in den Zielzellen keine viralen Proteine hergestellt werden, besteht kein Infektionsrisiko, so dass der Test unter niedrigen Sicherheitsstufen durchgeführt werden kann. Ausserdem, kann durch den Einbau eines Markergens in den Vektor die Inhibition der Infektiösität des Vektors leicht untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass der Vektor pGJ3 in der Lage ist das Markergen in die Zielzellen zu transferieren. Dazu wurden virale Partikel durch transiente Transfektion hergestellt (Soneoka et al., 1995). Die Partikel wurden mit dem Hüllprotein des Vesikulären Stomatitis Virus pseudotypisiert und für die Infektion von Zielzellen verwendet. Mit den pseudotypisierten Partikel konnten 293-Zellen mit hoher Effizienz transduziert werden, so dass für die Durchführung weiterer Experimente ausschließlich diese Zelllinie wurde verwendet. Weil die Promotorsequenzen aus der 3'U3-Region entfernt wurden, ist dieser Promotor nach der reversen Transkription inaktiv und es werden in den Zielzellen keine viralen Proteine exprimiert. Nach der Integration des Genoms reguliert der interne SFFV-Promotor die Expression des jeweiligen Markergens, das durch die anschließende Analyse detektiert und quantifiziert wurde.



Um zu zeigen, dass die Transduktion des Markergens durch Zugabe antiviraler Medikamente reduziert wird, wurden Protease-, Reverse Transkriptase- und Integrase-Inhibitoren zugesetzt. Da die virale Protease während der Partikelfreisetzung aktiviert wird, mußten die PR-Inhibitoren während der Produktion der Pseudotypen auf die 293T-Zellen gegeben werden. Die reverse Transkription und Integration erfolgen in den Zielzellen. Deshalb mußten die Inhibitoren, die die Aktivität dieser Enzyme hemmen, während der Infektion von Zielzellen zugesetzt werden. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass die Expression beider Markergene auf konzentrationsabhängige Weise reduziert wird.

Durch den Einbau eines fremden *pol*-Gens in den Vektor, welches mehrere Mutationen in den PR- und RT-Bereichen enthält, wurde ein multiresistentes Konstrukt hergestellt. Nach der Durchführung des Resistenztests wurde gezeigt, dass eine Reduktion der Markergenexpression bei Zugabe von höheren Medikamentenkonzentrationen zu beobachten war. Für jedes Medikament wurde die Konzentration ausgerechnet, die erforderlich war, die Expression des Markergens im Vergleich zur Negativkontrolle auf 50% zu reduzieren ( $IC_{50}$  - inhibitory concentration 50%). Die  $IC_{50}$ -Werte wurden miteinander verglichen und ausgerechnet, wievielfach resistent der multiresistente Klon gegenüber dem Wildtyp ist (Tabelle 4). Der Geno- und Phänotyp des molekularen Klons pX15, aus dem das multiresistente *pol*-Gen in den pGJ3-lacZ bzw. pGJ3-luci Vektor umklontiert wurde, war bekannt (Tabelle 3). Die in dieser Arbeit ermittelten Phänotypen korrelierten sowohl mit den publizierten genotypischen, als auch mit den phänotypischen Daten (Walter et al., 1999).

Für die Resistenztestung wurden zwei verschiedene Markergen-exprimierende Vektoren verwendet. Diese stammten aus dem gleichen Ausgangskonstrukt, pGJ3. Die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression erfolgte auf der Einzelzellebene, um die Anzahl transduzierter Zellen genau bestimmen zu können. Die Zellen, die das Markergen exprimierten wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Bei der Bestimmung der Aktivität von Luciferase wurde die Expression der gesamten Zellpopulation durch ein chemilumineszentes Verfahren analysiert. Es wurde gezeigt, dass die Daten mit den verschiedenen Markergen-exprimierenden Vektoren sich trotz der unterschiedlichen Nachweismethoden deckten (Abbildung 6).

Nachdem gezeigt wurde, dass sich sowohl die Sensitivität, als auch die Resistenz der Vektoren gegen antivirale Substanzen nachweisen läßt, wurden weitere Virusisolate mit

bekanntem Resistenzprofil getestet (Tabelle 3). Die Resistenzen der viralen Isolate konnten nachgewiesen werden, die  $IC_{50}$ -Werte korrelierten mit denen, die in anderen Tests bereits erhoben worden sind. Es ist bekannt, dass die durch verschiedene Testsysteme charakterisierten Resistenzwerte von viralen Isolaten von den verwendeten Zelllinien, von der Menge des eingesetzten viralen Inokulum und vom Markergen abhängen (Hirsch et al., 1998). Dies erklärt die geringfügigen Unterschiede der  $IC_{50}$ -Werte in unserem Testsystem im Vergleich zu den publizierten Daten (Boucher et al., 1992; Larder et al., 1993; Jacobsen et al., 1995). Die viralen Isolate wurden auch in Gegenwart von Medikamenten getestet, gegen die diese keine Resistenz entwickelt haben. Die Sensitivität gegen diese Inhibitoren wurde bestätigt. Damit wurde sichergestellt, dass der Nachweis der Resistenzen bei den jeweiligen Isolaten spezifisch war (Daten nicht gezeigt).

Abschließend wurden Isolate von HIV-infizierten Patienten sowohl phäno-, als auch genotypisch getestet. Unter den bereits definierten Mutationen unterscheidet man primäre und sekundäre Mutationen (Hirsch et al., 1998). Primäre Mutationen sind inhibitorspezifisch und treten während der Therapie als erstes auf. Die primären Mutationen üben einen direkten Effekt auf die Empfindlichkeit gegenüber entsprechenden Medikamenten aus. Sekundäre Mutationen werden nach der Entstehung einer oder mehrerer primärer Mutationen auftreten. Diese haben keinen direkten Effekt auf die Empfindlichkeit, können aber die Replikationsfähigkeit der Viren erhöhen (Hirsch et al., 1998). Bei Patient #1 wurden sowohl primäre, als auch sekundäre Mutationen detektiert. Neben den charakteristischen primären Mutationen im PR- (M46I und L90M), sowie im RT-Bereich des *pol*-Gens (L74V, K103N, V108I, M184V und T215Y) wurden eine Reihe verschiedener sekundärer Mutationen detektiert. Die phänotypischen Daten haben die genotypischen unterstützt, das Isolat zeigt gegen die zur Zeit zur Verfügung stehende Medikamente eine sehr hohe Resistenz. Bei Patient #2 wurden nur zwei Mutationen in der Protease nachgewiesen, die nicht mit bekannten Resistenzen assoziiert sind. Diese Beobachtung korreliert mit den Daten aus der phänotypischen Resistenztestung.

Es wurde gezeigt, dass die phänotypische Resistenztestung mit Hilfe des hergestellten replikationsinkompetenten Vektorsystems durchgeführt werden kann. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen beschrieben (Petropoulos et al., 2000). Im Unterschied zu unserem Test wird bei dieser Testmethode ein Luciferase-exprimierender

lentiviraler Vektor verwendet, aus dem nur *env* deletiert wurde. Das Konstrukt wird mit dem Glykoprotein des Murinen Leukämievirus pseudotypisiert und für die Infektion von Zielzellen verwendet. Da der Vektor außer *env* alle Struktur- und akzessorische Proteine enthält, kann in den transfizierten Zellen durch ein einfaches Rekombinationsereignis infektiöses Virus mit allen wildtypischen Pathogenitätsfaktoren entstehen (Reiprich et al., 1997). Da der Vektor die vollständige 3'U3-Region enthält, ist dieser Promotor in den Zielzellen aktiv und reguliert die Expression der viralen Gene. Im Endeffekt liegen in den Zielzellen das Gag und Pol, die regulatorischen Proteine und alle Pathogenitätsfaktoren vor. Im Falle einer oben beschriebenen homologen Rekombination können von den Zielzellen infektiöse Viren hergestellt werden, so dass bei der Durchführung des Tests ein hohes Infektionsrisiko besteht.

Der in dieser Arbeit hergestellte Vektor wurde durch die eingefügten Deletionen auf die *gag*-, *pol*- und *rev*-Gene reduziert. Dabei wurden *env* und alle akzessorische Gene bzw. der starke viruseigene Transaktivator (*tat*) aus dem Vektorkonstrukt entfernt. Da die deletierten Komponente zu keiner Zeit während des Verfahrens zugefügt werden, stehen diese für eine Rekombination in keinen Fall zur Verfügung. Damit ist kaum denkbar, dass die oben beschriebene homologe Rekombination in dem hier vorgestellten Vektorsystem zur Entstehung eines replikationskompetenten Rekombinante führen kann. Da die Promotorsequenzen in der 3'U3-Region entfernt worden sind, werden in den Zielzellen keine viralen Proteine exprimiert, was zu einer erhöhten Sicherheit des Vektorsystems führt. Das entwickelte Vektorsystem stellt damit eine sichere Alternative für die Resistenztestung dar.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse dieser Experimente ergeben, dass ein replikationsinkompetentes lentivirales Vektorsystem geeignet ist eine phänotypische Resistenztestung durchzuführen. In den Vektor können patientenspezifische Sequenzen eingesetzt und sowohl die Sensitivität als auch die Resistenz gegenüber den verschiedenen Medikamenten nachgewiesen werden. Mit der Verwendung des replikationsinkompetenten Vektorsystems kann die Testung unter niedrigen Sicherheitstufen innerhalb von zwei Wochen ausgeführt werden.

## 4.2. Pseudotypisierbarkeit von HIV Kapsiden

Lentivirale Kapside können durch fremde virale Hüllproteine pseudotypisiert werden. Bei der Auswahl des zur Pseudotypisierung verwendeten Hüllproteins spielen die Eigenschaften der jeweiligen Hüllproteine eine wichtige Rolle. Die hergestellten Pseudotypen haben idealerweise ein breites Wirtsspektrum und sind außerdem vor der Neutralisierung durch das Serum des Wirtsorganismus geschützt. Die Stabilität der Pseudotypen wird ebenfalls durch das eingebaute Hüllprotein bestimmt. Für die Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren werden zur Zeit meist die Hüllproteine des Vesikulären Stomatitis-Virus oder des Murinen Leukämievirus verwendet (Burns et al., 1993, Yee et al., 1994). Diese Pseudotypen besitzen jedoch einige entscheidende Nachteile. So können MuLV-Pseudotypen nur bestimmte Zellen infizieren und aufgrund der Instabilität des Hüllproteins nicht gut konzentriert werden. VSV-Pseudotypen dagegen haben ein sehr breites Wirtsspektrum und die Pseudotypisierung mit dem VSV-Glykoprotein führt zur Entstehung von stabilen Partikeln, die mit hoher Effizienz konzentriert werden können. Da aber das Glykoprotein toxisch für Zellen ist, stellt die Herstellung von stabil exprimierenden Verpackungszelllinien ein Problem dar (Chen et al., 1996). Zusätzlich werden diese Pseudotypen von humanen Serum inaktiviert (DePolo et al., 2000). Aufgrund der beschriebenen Nachteile, der zur Pseudotypisierung von lentiviralen Vektoren herkömmlich verwendeten Hüllproteine besteht deshalb der Bedarf für andere Alternativen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Hüllproteine von Foamyviren (FV) aus verschiedenen Spezies in lentiviralen Partikel eingebaut werden und so pseudotypisierte lentivirale Vektoren hergestellt werden können. Foamyviren haben ähnlich wie VSV ein sehr breites Wirtsspektrum. Bis heute wurde keine Zelllinie gefunden, die nicht durch Foamyviren infizierbar ist. Außerdem macht das Fehlen von Antikörpern gegen FV in der humanen Population das FV Hüllprotein zu einem attraktiven Kandidat für solche Pseudotypisierungsstudien.

Aus Experimenten unseres Labores und bereits beschriebenen Ergebnissen war bekannt, dass das Hüllprotein des primaten Foamyvirus (PFV-1) nicht in der Lage ist lentivirale Vektoren effizient zu pseudotypisieren (Mochizuki et al., 1998). Deshalb wurden zur weiteren Analyse der Pseudotypisierbarkeit von HIV-Kapsiden in den beschriebenen Experimenten sowohl wildtypische als auch chimäre FV-Env Expressionskonstrukte aus verschiedenen Spezies

verwendet (vgl. 3.2.1.). Als Vergleich zu diesen Konstrukten wurden HIV-Kapside mit dem Glykoprotein des VSV pseudotypisiert. Wie erwartet ergaben diese Pseudotypen einen hohen Titer ( $10^6$  cfu/ml). Ein vergleichbar hoher Titer, etwa  $3 \times 10^5$  cfu/ml wurde mit Pseudotypen erreicht, die das wildtypische FFV-Env enthielten. Mit den Wildtyp PFV-1 und SFV-1 Env Proteinen konnten HIV-Kapside nur sehr schlecht pseudotypisiert werden ( $10^1$  cfu/ml), wohingegen die BFV-Env Pseudotypen einen hundertfach niedrigen Titer ( $2 \times 10^3$  cfu/ml), als die mit dem FFV-Env pseudotypisierten Partikel ergaben.

Neueste Ergebnisse zeigten, dass bei der Inkorporation des Hüllproteins in das FV-Kapsid das PFV-1-Env Signalpeptid (SP) die primäre Rolle spielt (Lindemann et al., 2001). Um den Einfluss des Signalpeptids auf die Pseudotypisierbarkeit von HIV-Kapsiden zu untersuchen, wurden die Signalpeptidchimäre PFV-1-Env EM62-65 verwendet, bei denen der N-Terminus des ursprünglichen Signalpeptids von PFV-1-Env durch den des SP von SFV-1- (EM62), SFV-3- (EM63), FFV- (EM64) oder BFV-Env (EM65) ersetzt wurde (vgl. 3.2.1.). Es wurde gezeigt, dass das SFV-1-Env SP (EM62) nur einen geringen Effekt auf die Pseudotypisierbarkeit hatte. Mit der EM63-Mutante konnte keine Infektion nachgewiesen werden. Die Mutanten EM64 bzw. 65 führten dagegen zu einer deutlichen Verbesserung der Pseudotypisierung von HIV-Kapsiden. Mit beiden Mutanten wurde ein Titer von  $10^3$  -  $2 \times 10^3$  cfu / ml erreicht (Abbildung 9). Die Insertion des BFV- bzw. FFV-Env SP in das PFV-1-Env konnte dessen Defekt zur Herstellung infektiöser Partikel aufheben. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei der Pseudotypisierung von HIV-Kapsiden mit FV-Env Proteinen das Signalpeptid eine wichtige Rolle spielt. Weil die Wildtyp BFV-Env und die EM65-Pseudotypen (BFV SP) ähnliche Titer ergaben, ist die Pseudotypisierbarkeit von HIV-Kapsiden mit dem BFV-Env wahrscheinlich primär vom SP abhängig. Da die EM64-Mutante die HIV-Kapside mit einer etwa hundertfach niedrigeren Effizienz pseudotypisierte als das Wildtyp FFV-Env Protein, kann im Falle von FFV vermutet werden, dass auch andere Bereiche des FFV-Env Proteins bei der effizienten Pseudotypisierung von HIV beteiligt sind. Allerdings enthalten beide Konstrukte verschiedene SU-Untereinheiten, die vermutlich die FV-Rezeptorbindungsbereiche beinhalten. Deshalb könnte auch eine unterschiedliche Effizienz der verschiedenen SU-Rezeptorinteraktionen für diesen Unterschied in der relativen Transduktionseffizienzen dieser Konstrukte verantwortlich sein. Da zur Zeit keine geeigneten Antiseren gegen die FFV-Env SP Bereich vorhanden sind, ist keine Aussage über den

relativen Einbau der beiden Proteine in HIV-Partikel möglich, um zwischen diesen beiden alternativen Erklärungen unterscheiden zu können.

Die Bedeutung des FFV-Env SP für die Pseudotypisierung von HIV-1 wird zusätzlich durch die Ergebnisse der Experimente mit den FM01- bzw. FM02-Mutanten unterstützt. Bei der FM02-Mutante wurden die ersten 6 Aminosäuren (AS) des FFV-Env SP gegen die ersten 4 AS des PFV-1-Env SP ausgetauscht. Dieser Austausch verursachte eine zehnfache Reduktion in der Pseudotypisierbarkeit von HIV-Kapsiden ( $2 \times 10^4$  cfu / ml). Bei der FM01-Mutante wurde ein größerer Bereich (60 AS) des FFV-Env SP durch das PFV-1-Env SP ersetzt. Diese Mutante führte zu einer noch geringeren Pseudotypisierungseffizienz ( $10^2$ ).

Die Untersuchungen zur Rolle des FV-Env SP während der FV Partikelfreisetzung zeigten, dass die ersten 15 AS, die sogenannte „budding domain“, von entscheidender Bedeutung sind (Lindemann et al., 2001). Dementsprechend konnten die verkürzten SP-Mutanten EM43, bei der die ersten 16 AS des PFV-1-Env SP bzw. EM70, bei der die ersten 25 AS des PFV-1-Env SP deletiert wurden, nicht die FV Partikelfreisetzung unterstützen (Lindemann et al., 2001). Im Gegensatz zu diesem Ergebnis, konnten in dieser Arbeit HIV-Kapside mit diesen Mutanten mit höheren Effizienzen pseudotypisiert werden, als mit dem Wildtyp PFV-1-Env ( $2 \times 10^3$  mit der EM43-Mutante bzw.  $5 \times 10^2$  mit der EM70-Mutante). Anhand dieser Daten scheint die beschriebene Region des PFV-1-Env SP bei der Pseudotypisierung von HIV-Kapsiden einen inhibitorischen Effekt zu haben.

Es wurde gezeigt, dass MuLV-Kapside nicht mit Wildtyp PFV-1-Env pseudotypisiert werden können, aber die  $\Delta 2$ MuLV-Mutante, bei der der größte Teil von der cytoplasmatischen Domäne (CyD) von PFV-1-Env durch die gesamte CyD von MuLV-Env ersetzt wurde, in der Lage ist, MuLV-Kapside mit hoher Effizienz zu pseudotypisieren (Lindemann et al., 1997). Im Gegensatz dazu, konnte diese Mutante jedoch nicht die HIV Partikelfreisetzung unterstützen, obwohl HIV-Partikel effizient mit dem wildtypischen MuLV-Env pseudotypisiert werden können. Deshalb wurde analog zu diesem Konstrukt die Mutante PFV-1-Env HCyD hergestellt, bei der das PFV-1-Env CyD durch die vollständige CyD von HIV-Env ersetzt wurde. Diese Mutante führte allerdings auch nicht zur Pseudotypisierung von HIV-Kapsiden. Angesichts dieser Befunde ist es möglich, dass die CyD des HIV-Env Proteins in Kontext eines Fusionsproteins keine essentielle Funktion beim Einbau des

Hüllproteins in die HIV-Partikel hat. Alternativ wäre es auch vorstellbar, dass die CyD des HIV-1-Env an der falsche Stelle an der verkürzten PFV-1-Env CyD fusioniert wurde, was zur Herstellung einer nicht funktionellen Mutante führte.

Zusammenfassend haben die Pseudotypisierungsexperimente gezeigt, dass lentivirale Kapside mit dem Hüllprotein der Primaten Foamyviren nur sehr schlecht, mit dem FFV-Env dagegen mit sehr hoher Effizienz pseudotypisiert werden können. Bei der Pseudotypisierbarkeit spielt der N-terminale Bereich des Signalpeptids eine wichtige Rolle. Die Unterschiede in der Effizienz der Pseudotypisierung zwischen Hüllproteinen von FV verschiedener Spezies werden primär durch das jeweilige SP bedingt. Aufgrund seines breiten Wirtsspektrum und der Konzentrierbarkeit bietet das FFV-Env bei der Produktion und Anwendung von HIV-Vektoren eine attraktive Alternative zu herkömmlich verwendeten Hüllproteinen, wie zum Beispiel dem VSV-G und MuLV-Env Proteine. Die Verwendung verschiedener Hüllproteine kann auch bei in vivo Experimenten mit mehrfachen Vektorapplikation von Vorteil sein, da die Bildung neutralisierender Antikörper gegen das Hüllprotein die Effektivität mehrfache Vektorapplikationen deutlich herabsetzen können.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Amado, R.G. und Chen, S.Y. (1999). Lentiviral vectors - the promise of gene therapy within reach? *Science* 285:674-676.
- Anderson, W.F. (1998). Human gene therapy. *Nature* 392:25-30.
- Aldovini, A. und Young, R.A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* 64:1920-1926.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226:1209-1211.
- Boucher, C.A.B, O'Sullivan, E., Mulder, J.W., Ramautarsing, C., Kellam, P., Darby, G., Lange, J.M.A., Goudsmit, J. und Larder, B.A. (1992). Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J. Infect. Dis.* 165:105-110.
- Boulanger, P. und Jones, I. (1996). Use of heterologous expression systems to study retroviral morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214:237-260.
- Bryant, M. und Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:523-527.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. und Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to a very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037.
- Chan, D.C. und Kim, P.S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* 93:681-684.
- Chen, S.T., Iida, A., Guo, L., Friedmann, T. und Yee, J.K. (1996). Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10057-10062.
- Coffin, J.M. (1992). Structure and classification of retroviruses. In *The Retroviridae* (ed. Levy, J.A.) Plenum Press, New York. pp. 19-49.
- Coffin, J.M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science* 267:483-489.
- Cullen, B.R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93:685-692.
- Dalglish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greeves, M.F. und Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-767.
- DePolo, N.J., Reed, J.D., Sheridan, P.L., Townsend, K., Sauter, S.L., Jolly, D.J. und Dubensky, T.W. (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Therapy* 2:218-222.
- Doranz, B.J., Baik, S.W. und Doms, R.W. (1999). Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J. Virol.* 73:10346-10358.
- Du Bridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. und Calos, M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7:379-387.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. und Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 72:8463-8471.
- Freed, E.O. (1998). HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251:1-15.



- Friedmann, T. und Yee, J.K. (1995). Pseudotyped retroviral vectors for studies of human gene therapy. *Nat. Med.* 1:275-277.
- Gallo, R., Wong-Staal, F., Montagnier, L., Haeltine, W.A. und Yoshida, M. (1988). HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature* 333:504-505.
- Gaynor, R.B. (1995). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 gene expression by the transactivator protein Tat. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 193:51-78.
- Hazuda, D.J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J.A., Espeseth, A., Gabryelski, L., Schleif, W., Blau, C. und Miller, M.D. (2000). Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287:646-650.
- Hertogs, K., de Béthune, M.P., Miller, V., Ivens, T., Schel, P., van Cauwenberge, A., van den Eynde, C., van Gerwen, V., Azijn, H., van Houtte, M., Peeters, F., Staszewski, S., Conant, M., Bloor, S., Kemp, S., Larder, B. und Pauwels, R. (1998). A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:269-276.
- Hirsch, M.S., Conway, B., D'Aquila, R.T., Johnson, V.A., Brun-Vézinet, F., Clotet, B., Demeter, L., Hammer, S.M., Jacobsen, D.M., Kuritzkes, D.R., Loveday, C., Mellors, J.W., Vella, S. und Richman, D. (1998). Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection. *JAMA* 279:1984-1991.
- Hope, T. und Pomerantz, R.J. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: a pivotal protein in the viral life cycle. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 193:91-106.
- Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. und Varmus, H.E. (1988). Characterisation of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331:280-283.
- Jacobsen, H., Yasargil, K., Winslow, D.L., Craig, J.C., Kröhn, A., Duncan, I.B. und Mous, J. (1995). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 mutants with decreased sensitivity to protease inhibitor Ro 31-8959. *Virology* 206:527-534.
- Japour, A.J., Mayers, D.L., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Beckett, L.A., Arduino, J.M., Lane, J., Black, R.J., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T. und Crumpacker, C.S., the RV-43 Study Group and the AIDS Clinical Trial Group Virology Committee Resistance Working Group. (1993). Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1095-1101.
- Joag, S.V., Stephens, E.B. und Narayan, O. (1996). Lentiviruses. In *Fields Virology*, Third Edition, Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. et al., eds. (Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia)
- Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., DiMassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M. und Saag, M.S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Medicine* 4:1302-1306.
- Kim, S.Y., Byrn, R., Groopman, J. und Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.* 63:3708-3713.
- Kim, V.M., Mitrophanous, K., Kingsman, S. und Kingsman, A.J. (1998). Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:811-816.
- Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A.F., Scolnick, E.M. und Sigal, I.S. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4686-4690.
- Kotsopoulou, E., Kim, V.N., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M. und Mitrophanous, K.A. (2000). A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J. Virol.* 74:4839-4852.

- Larder, B.A., Kellam, P. und Kemp, S.D. (1993). Convergent combination therapy can select viable multidrug-resistant HIV-1 in vitro. *Nature* 365:451-453.
- Lewis, P.F. und Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 68:510-516.
- Lindemann, D., Bock, M., Schweizer, M. und Rethwilm, A. (1997). Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J. Virol.* 71:4815-4820.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H. und Rethwilm, A. (2001). A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J. Virol.* 75:5762-5771.
- Miller, A.D. (1997). Development and applications of retroviral vectors. In *Retroviruses*, Coffin, J.M., Hughes, S.H. und Varmus, H.E., eds. (Plainview, NY 11803: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Mochizuki, H., Schwartz, J.P., Tanaka, K., Brady, R.O. und Reiser, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J. Virol.* 72:8873-8883.
- Moeses, A., Ennsle, J., Bieniasz, P.D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M.O. und Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J. Virol.* 71:7305-7311.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273.
- Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I. und Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- Petropoulos, C.J., Parkin, N.T., Limoli, K.L., Lie, Y.S., Wrin, T., Huang, W., Tian, H., Smith, D., Winslow, G.A., Capon, D.J. und Whitcomb, J.M. (2000). A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents. Chemother* 44: 920-928.
- Parolin, C., Dorfman, T., Palú, G., Göttlinger, H. und Sodroski, J. (1994). Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J. Virol.* 68:3888-3895.
- Picard-Maureau, M. (2000). Analyse der Fusion von Foamyviren mit Zielzellen. Diplomarbeit.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A. und Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J. Virol.* 73:2613-2621.
- Reiprich, S., Gundlach, B.R., Fleckenstein, B. und Überla, K. (1997). Replication-competent chimeric lentivirus with expanded host cell tropism. *J. Virol.* 71:3328-3331.
- Roe, T.Y., Reynolds, T.C., Yu, G. und Brown, P.O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO* 12:2099-2108.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmit, J.C. und Weber, B. (1997). Recent advances in antiretroviral therapy and HIV infection monitoring. *Intervirology* 40:304-321.
- Schwartz, S. Felber, B.K., Fenyo, E.M. und Pavlakis, G.N. (1990). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* 64:2519-2529.
- Shimotohno, K. und Temin, H.M. (1981). Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* 26:67-77.

- Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M. und Kingsman, A.J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucl. Acids Res.* 23:628-633.
- Swanstrom, R. und Wills, J.W. (1997). Synthesis, assembly and processing of viral proteins. In *Retroviruses*, Coffin, J.M., Hughes, S.H. und Varmus, H.E., eds. (Plainview, NY 11803: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 263-334.
- Temin, H. und Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213.
- Verma, I.M. und Somia, N. (1997). Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 389:239-242.
- Walter, H., Schmidt, B., Korn, K., Vandamme, A., Harrer, T. und Überla, K. (1999). Rapid, phenotypic HIV-1 drug sensitivity assay for protease and reverse transcriptase inhibitors. *J. Clin. Virol.* 13:71-80.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. und Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173-185.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. und Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 15:871-875.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. und Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72:9873-9880.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D. und Hope, T.J. (1998). Woodchuck hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* 73:2886-2892.

## 6. ANHANG

### 6.1. Zusammenfassung

Aufgrund ihrer Charakteristika stellen die Lentiviren besonders gut geeignete Vektoren für den Gentransfer in eukaryotische Zellen dar. Lentivirale Vektoren sind in der Lage ruhende und sich nicht teilende Zellen zu infizieren und ihr genetisches Material in das Zielzellgenom zu integrieren. Dies führt zu einer stabilen Expression des Zielgens in den infizierten Zellen und deren Tochterzellen. In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe replikationsinkompetenter lentiviraler Vektoren für verschiedene Studien, meist für gentherapeutische Ansätze, hergestellt. Replikationsinkompetente Vektoren sind in der Lage Zielzellen einmalig zu infizieren, können aber in den Zielzellen nicht weiter replizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf HIV-1 basierendes replikationsinkompetentes Vektorsystem etabliert. Mit Hilfe des replikationsinkompetenten Vektorsystems wurde eine rasch durchführbare phänotypische Resistenztestung etabliert, welche für die Messung der Sensitivität von HIV gegen antivirale Inhibitoren geeignet ist. Die Transduktionseffizienz wurde durch den Einbau eines Markergens in das Vektorsystem untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass mit dem Vektorsystem Zielzellen mit hoher Effizienz transduziert werden können. Inhibitoren gegen die virale Protease, Reverse Transkriptase und Integrase waren in der Lage die Transduktion auf konzentrationsabhängige Weise zu reduzieren. In das Vektorsystem konnten PR- und RT-Sequenzen sowohl von viralen Isolaten als auch von Patienten eingesetzt werden und deren Sensitivität bzw. Resistenz gegen die zur Zeit zur Verfügung stehenden Medikamente konnten nachgewiesen werden. Da das hergestellte Vektorsystem den wichtigen Sicherheitsmaßnahmen entspricht, stellt dieses eine sichere Alternative zur Testung der Wirksamkeit von antiviralen Substanzen bei HIV-infizierten Patienten dar. Unter Verwendung des replikationsinkompetenten Vektorsystems konnte die Testung unter biologischer Sicherheitstufe 2 innerhalb von zwei Wochen ausgeführt werden. Damit wurden die bislang zur Verfügung stehenden phänotypischen Resistenztestungen deutlich verbessert.

In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, ob das Foamyvirus (FV) Hüllprotein (Env) in der Lage ist, lentivirale Partikel zu pseudotypisieren und welche Bereiche des Hüllproteins für die Pseudotypisierung notwendig sind. Es wurde festgestellt, dass HIV-Kapside mit dem Hüllprotein des Felinen Foamyvirus (FFV) mit sehr hoher Effizienz pseudotypisiert werden

können. Das Hüllprotein der Primaten Foamyviren konnte die Pseudotypisierung von lentiviralen Partikel nicht unterstützen. Mit Hilfe verschiedener Mutanten wurde gezeigt, dass bei der Pseudotypisierung das Signalpeptid (SP) eine wichtige Rolle spielt. Die Unterschiede in der Effizienz der Pseudotypisierung zwischen Hüllproteinen von FV verschiedener Spezies wurden primär durch das jeweilige SP bedingt.

Aufgrund seines breiten Wirtsspektrum und der Konzentrierbarkeit bietet das FFV-Env eine attraktive Alternative zu herkömmlich verwendeten Hüllproteinen bei der Produktion und Anwendung von HIV-Vektoren.

## 6.2. Summary

Vectors based on lentiviruses are highly efficient vehicles for gene transfer approaches. The principle advantages of lentiviral vectors include the infection of nondividing cells, integration into the host cell genome, high level of gene expression and transmission to all the progeny of the infected cell. Within the last years many replication-defective lentiviral vectors have been developed. Replication-defective vectors infect cells, but can not replicate after infection.

In the course of these studies a self-inactivating replication-defective vector system derived from the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) with enhanced biosafety features was constructed. The vector system was used to develop a rapid and easy phenotypic drug resistance assay to detect and measure emerging resistance of HIV against antiviral drugs. The vector system contains a reporter gene for rapid quantification of transduced target cells. The vector proved highly efficient for transducing target cells. Reporter gene transduction could be inhibited with nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase (RT) inhibitors, integrase (IN) and protease (PR) inhibitors in a dose dependent manner. Protease (PR) and reverse transcriptase (RT) gene coding sequences derived either from proviral isolates or from HIV-infected patients could be inserted into this vector system. Both sensitivity and resistance against currently used antiviral drugs could be detected. Due to the biosafety features of the vector system this novel drug resistance assay represents a rapid and easy method without the need for propagation of infectious virus.

In the course of these studies was also studied whether capsids of the HIV-1 can be pseudotyped with wild-type and chimeric foamy virus (FV) envelope proteins from virus isolates derived from different species. Further, it was analysed which domains of the FV envelope play a role in pseudotyping HIV capsids.

HIV capsids could be efficiently pseudotyped with feline foamy virus (FFV) envelope protein. The primate foamy virus envelope was not able to support the export of lentiviral capsids. The experiments with the chimeric mutants revealed that the signal peptid plays a key role in pseudotyping.

Due to the unique properties of the FFV envelope, including the broad host range and the ability to tolerate concentration of viral particles by ultracentrifugation, pseudotyping of HIV capsids with this envelope might provide a useful tool for future gene transfer approaches.

### **6.3. Erklärungen**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Herstellung und Anwendungen eines replikationsinkompetenten lentiviralen Vektorsystems“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre zudem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

(Gergely Jármy)



## 6.4. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

**Gergely Jármy**

Geboren am:  
Familienstand:

3. Juni 1975 in Budapest  
ledig

### Schulausbildung:

09/1981 - 06/1989  
09/1989 - 06/1993  
06/1993

Grundschule, Székesfehérvár  
Benediktiner Gymnasium, Pannonhalma  
Abitur

### Studium:

09/1993 - 06/1998  
06/1998

Janus Pannonius Universität, Pécs  
Diplom

### Dissertation:

08/1998 - 09/2001  
Thema:

Institut für Virologie der Universität Würzburg  
Herstellung und Anwendungen eines replikations-  
inkompetenten lentiviralen Vektorsystems

## 6.5. Publikationsliste

Heinkelein, M., Pietschmann, T., **Jármy, G.**, Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenröder, O. und Rethwilm, A. (2000). Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retronvirus genome. EMBO 19:3436-3445.

**Jármy, G.**, Heinkelein, M., Weissbrich, B., Jassoy, C. und Rethwilm, A. (2001). Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease and integrase using a self-inactivating virus vector system. J. Med. Virol. 64:223-231.

Heinkelein, M., Dressler, M., **Jármy, G.**, Rammling, M, Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D. und Rethwilm, A. (2001). Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. J. Virol. Zur Publikation eingereicht.