

**Entwicklung hepatotroper Gentransfer-Systeme auf
Basis des Felinen Immundefizienz Virus (FIV) und des
Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV)
pseudotypisiert mit dem Fusionshüllglykoprotein des
Sendai Virus (SeV)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

vorgelegt von

Kai Hauschulz

Januar 2006

Erstgutachter: Prof. Dr. Ursula Eichenlaub-Ritter
Zweitgutachter: PD Dr. Ulrich M. Lauer

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Gentransfer-Systeme	6
2.1.1	Nicht-virale und virale Gentransfer-Systeme	6
2.1.2	Adenovirus (Ad)	6
2.1.3	Adeno-assoziiertes Virus (AAV)	7
2.1.4	Retrovirus	8
2.1.4.1	Replikationskompetente Retroviren (RCR)	10
2.1.5	Felines Immundefizienz Virus (FIV)	12
2.1.5.1	Lentiviraler Kernimportmechanismus.....	15
2.1.6	Der ideale Gentherapie-Vektor	16
2.2	Pseudotypisierung	18
2.3	Gewebespezifischer Gentransfer	19
2.4	Leberspezifischer Gentransfer	20
2.5	Suizidgentherapie	22
2.6	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	24
3	Material & Methoden	25
3.1	Allgemeines	25
3.2	Molekularbiologische Materialien und Methoden	25
3.2.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	25
3.2.2	Anlegen von Glycerolkulturen	27
3.2.3	Plasmidpräparationen	27
3.2.3.1	Mini-Präparationen zur Charakterisierung transformierter Bakterien.....	28
3.2.3.2	Maxi- und Mega-Präparationen zur Plasmidgewinnung	29
3.2.4	Spektrometrische Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen	30
3.2.5	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	31
3.2.6	Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA	31
3.2.7	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.8	Reinigung von DNA aus präparativen Agarosegelen	33
3.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	34
3.2.10	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	36
3.2.10.1	Primer-Design	36
3.2.10.2	PCR-Reaktion	37
3.2.11	Ortsgerichtete Mutagenese	38
3.2.12	Titerbestimmung retroviraler Vektoren.....	42
3.2.12.1	Isolierung viraler RNA	43
3.2.12.2	DNase-Verdau	43
3.2.12.3	Reverse Transkription	44
3.2.12.4	RTQ-PCR.....	45
3.3	Zellbiologische Materialien und Methoden	50
3.3.1	Verwendete Zelllinien.....	50
3.3.2	Zellkultur.....	52
3.3.2.1	Allgemeines	52
3.3.2.2	Auftauen von Zellen.....	52
3.3.2.3	Zellpassage.....	53

3.3.2.4	Kryokonservierung von Zellen.....	53
3.3.2.5	Zellzählung mit dem Hämozytometer nach Neubauer	54
3.3.3	Transfektion	55
3.3.3.1	Calcium-Phosphat-Transfektion.....	55
3.3.3.2	Transfektion mit Lipofectamine™ 2000	56
3.3.4	Membranimmunfluoreszenz-Färbung	56
3.4	Virologische Materialien und Methoden.....	58
3.4.1	Generierung transienter Virus-Produzentenzellen und Transduktion adhärenter Zellen mit rekombinanten Retro- bzw. Lentiviren	58
3.4.2	Ankonzentration rekombinanter Virus-Partikel	59
3.4.2.1	Ankonzentration mittels Ultrazentrifugation.....	59
3.4.2.2	Ankonzentration mittels Ultrafiltration	60
3.4.3	Titerbestimmung mittels Expressionsnachweis der Reportergene <i>lacZ</i> , <i>egfp</i> und <i>dsred2</i>	61
3.4.3.1	Titerbestimmung mittels Nachweis der Expression von β -Galactosidase.....	61
3.4.3.2	Titerbestimmung mittels Nachweis der Expression von EGFP und DSRed2	63
3.4.4	Titerbestimmung retroviraler Vektoren mittels Immunperoxidase-Assay	63
3.4.5	Test der Funktionalität der RCR-Vektoren durch SRB-Cytotoxizitätsassays	64
3.4.6	Hämagglutinations (HA)-Test als Nachweissystem für das SeV-HN Protein	65
3.5	Proteinchemische Materialien und Methoden.....	66
3.5.1	Zellaufschluß.....	66
3.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	67
3.5.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	67
3.5.4	Western Blotting	70
3.5.4.1	<i>Wet</i> -Blotting	70
3.5.4.2	ECL-Detektionssystem	71
4	Ergebnisse	73
4.1	Etablierung eines lentiviralen Gentransfersystems auf Basis des Felinen Immundefizienz Virus (FIV)	73
4.1.1	Initiale Virusproduktion	73
4.1.2	Optimierung des lentiviralen Gentransfersystems.....	75
4.1.3	EGFP & DSRed2 <i>in sense</i>	76
4.1.4	<i>Central Polypurine Tract & Central Termination Site</i> (cppt/cts)	78
4.1.4.1	PacI und FseI Mutagenese für cppt/cts Insertion	78
4.1.4.2	cppt/cts-Insertion in den FIV Transfervektor	79
4.1.5	Titeroptimierung	81
4.2	Targeting ASGP-R exprimierender Zellen mittels SeV-F Pseudotypen	84
4.2.1	Expressionsnachweis des ASGP-R in potentiellen Zielzellen von FIV SeV-F Pseudotypen.....	84
4.2.2	Präsentation des ASGP-R auf der Zelloberfläche von HepG2 und M12 Zielzellen.....	85
4.2.3	Generierung von FIV-SeV-F Pseudotypen mittels transienter Transfektion der SeV-F Hüllglykoproteine in 293T Verpackungszellen.....	86
4.2.3.1	SeV-F Hüllglykoprotein	87
4.2.3.2	SeV-F _{mut} Hüllglykoprotein.....	87
4.2.3.3	SeV-F _{del} Hüllglykoprotein.....	88
4.2.3.4	Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie für die SeV-F Pseudotypisierung von FIV.....	89
4.2.3.5	Expressionsnachweis der SeV-F Hüllproteine	90
4.2.3.6	Rescue-Versuch der FIV SeV-F Pseudotypen	92
4.3	Generierung chimärer SeV-F Hüllproteine für eine effizientere Inkorporation in die FIV Virushülle.....	94
4.3.1	Einbauproblematik heterologer Hüllproteine in die FIV-Virushülle.....	94
4.3.2	Expressionsnachweis der chimären SeV-F Hüllglykoproteine	96
4.3.3	Nachweis des Einbaus der nativen SeV-F Hüllglykoproteine und chimären SeV-F bzw. SeV-F _{mut} Hüllglykoproteine in die FIV Virushülle	99

4.3.4	Funktioneller Nachweis der chimären SeV-F bzw. SeV-F _{mut} Hüllglykoproteine im Rescue.....	100
4.4	SeV-F und SeV-HN pseudotypisiertes FIV mit pantropen Transduktionseigenschaften.....	103
4.4.1	Einbaunachweis von SeV-HN in virale Partikel durch einen Hämagglutinations (HA)-Test.....	104
4.5	Ecotropes Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) pseudotypisiert mit SeV-F.....	105
4.6	SeV-F kodierende replikationskompetente Retroviren (RCRs).....	107
4.6.1	Generierung neuer SeV-F pseudotypisierter replikationskompetenter Retroviren (RCR) auf Basis von MoMLV	107
4.6.2	Expressionsnachweis des SeV-F und SeV-F _{mut} in 293T Verpackungszellen.....	108
4.6.3	Western Blot-Nachweis für den SeV-F Einbau in RCRs.....	108
4.6.4	Funktioneller Nachweis von SeV-F und SeV-F _{mut} pseudotypisierten RCRs	110
4.7	Suizidgen kodierende RCRs.....	111
4.7.1	Generation und Evaluation eines neuen Replikationskompetenten Retroviralen (RCR) Vektors, kodierend für das SuperCD Suizid-Gen.....	111
4.7.1.1	Generierung transienter Retrovirus-Produzentenzellen.....	112
4.7.2	Etablierung eines RTQ-PCR Standards	113
4.7.3	Optimierung der RNA-Isolierung	113
4.7.4	Titerbestimmung von RCR-Vektoren	114
4.7.5	Analyse funktioneller viraler Titer durch Immun-Peroxidase-Assay.....	117
4.7.6	“Killing Potential” von RCR-YCD und -SuperCD.....	117
4.7.7	Untersuchung der Replikationskinetik.....	123
5	Diskussion.....	125
5.1	Herstellung von rekombinanten FIV-Vektoren der 1. Generation.....	125
5.2	Hepatozyten restringierter lentiviraler Gentransfer.....	128
5.3	Zusammenfassung: Retro- und Lentivirale Pseudotypisierung mit dem SeV-F Hüllglykoprotein	132
5.4	SeV-F kodierende RCRs.....	134
5.5	Suizidgen kodierende RCRs.....	135
5.6	Ausblick	138
6	Literaturverzeichnis	140
7	Anhang	155
7.1	Sequenzen	155
7.2	Firmenverzeichnis.....	166

Abbildung 2-1: Genomischer Aufbau eines Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV)	9
Abbildung 2-2: Genomischer Aufbau funktioneller RCR-Vektoren	11
Abbildung 2-3: Genomischer und struktureller Aufbau eines Wildtyp Felinen Immundefizienz Virus (FIV).....	13
Abbildung 2-4: FIV-Vektorsystem	15
Abbildung 2-5: Lokalisation des cppts (<i>central polypurine tract</i>) und der cts (<i>central termination sequence</i>) im <i>pol</i> -Gen von FIV	16
Abbildung 2-6: Prinzip der Interaktion von Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R) und Sendai Virus F-Protein (SeV-F)	21
Abbildung 2-7: „Prodrug“-Toxifizierung durch das Suizidgenprodukt von CD bzw. YCD	23
Abbildung 3-1: Ablauf der ortsgerichteten Mutagenese.	40
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung einer typischen Amplifikationskurve bei der RTQ-PCR.....	45
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Quantifizierung von RCRs mit Überlänge genom	49
Abbildung 3-4: Ermittlung der Zahl retroviraler Genome im Kulturüberstand Virus-produzierender Zellen durch RTQ-PCR.....	50
Abbildung 3-5: Prinzip der ECL-Detektion.	71
Abbildung 4-1: Ausgangsplasmide für die Generierung rekombinanter FIV-Partikel pseudotypisiert mit dem Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G)	74
Abbildung 4-2: Erzielte Virustiter in Abhängigkeit von der eingesetzten Natriumbutyrat-Konzentration.....	74
Abbildung 4-3: Mutagenese des CTRZLb-Plasmides zur Generierung jeweils flankierender Schnittstellen (AgeI und AscI) stromauf- und stromabwärts vom Reportergen <i>lacZ</i>	76
Abbildung 4-4: PCR-Klonierung von <i>egfp</i> und <i>dsred2</i> in den lentiviralen Basisvektor CTRZLb.....	77
Abbildung 4-5: Funktionalität der neu generierten lentiviralen Transfervektoren CTLacZ, CTEGFP und CTDSRed2	78
Abbildung 4-6: Mutagenese des CTLacZ-Plasmides zur Generierung einer PacI- und einer FseI-Restriktionsschnittstelle stromaufwärts vom CMV-Promotor	79
Abbildung 4-7: PCR-Amplifizierung der <i>central polypurine tract</i> / <i>central termination sequence</i> aus dem Genom des WT-FIV Plasmides CT5b.....	80
Abbildung 4-8: Funktionalität der FIV-Vektoren nach der Insertion der cppt/cts Sequenz.....	81
Abbildung 4-9: Aufkonzentration viralen Überstandes mittels Ultrafiltration.....	83
Abbildung 4-10: Western Blot-Nachweis der Expression des ASGP-R in verschiedenen Zelllinien.....	84
Abbildung 4-11: Immunfluoreszenznachweis der ASGP-R Expression in Rezipientenzellen für SeV-F pseudotypisierte FIV-Partikel	86
Abbildung 4-12: Aufbau des SeV-F Expressionsplasmides pUC29-IF-zeo	87
Abbildung 4-13: Mutagenese der Spaltstelle des SeV-F im Expressionsplasmid pUC29-IF-zeo.....	88
Abbildung 4-14: Aufbau der SeV-F _{del} Transkriptionseinheit des Expressionsplasmides pCMV-F _{del}	89
Abbildung 4-15: Western Blot-Nachweis der Expression des SeV-F Proteins in SeV-F exprimierenden 293T Verpackungszellen.....	90
Abbildung 4-16: Immunfluoreszenznachweis der Expression des nativen SeV-F Proteins und seiner Derivate in 293T Verpackungszellen sowie der HeLa-F-Zelllinie.....	91
Abbildung 4-17: Kein Transduktionsnachweis auf ASGP-R exprimierenden Zellen.....	93
Abbildung 4-18: Schematische Darstellung nativer, chimärer viraler Hüllproteine	96
Abbildung 4-19: Immunfluoreszenznachweis der in 293T Verpackungszellen exprimierten 1. bis 3. chimären SeV-F und SeV-F _{mut} Hüllglykoproteine	97
Abbildung 4-20: Immunfluoreszenznachweis der in 293T Verpackungszellen exprimierten 4. bis 6. chimären SeV-F und SeV-F _{mut} Hüllglykoproteine	98
Abbildung 4-21: Einbaunachweis der nativen SeV-F und chimären SeV-F bzw. SeV-F _{mut} Hüllglykoproteine in die FIV Virushülle	100
Abbildung 4-22: Kein Transduktionsnachweis ASGP-R exprimierender Zellen	102
Abbildung 4-23: Kein Transduktionsnachweis ASGP-R exprimierender Zellen.	103
Abbildung 4-24: Pantrope Transduktionseigenschaften von FIV, pseudotypisiert mit SeV-F und SeV-HN	104
Abbildung 4-25: Einbaunachweis des SeV-HN Hüllglykoproteins in SeV-F/HN pseudotypisierte FIV-Partikel durch einen HA-Test.....	105
Abbildung 4-26: Ecotropes MoMLV pseudotypisiert mit SeV-F zeigt pantrope Transduktionseigenschaften im Vergleich zu rein ecotropen MoMLV	106
Abbildung 4-27: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zum Austausch des endogenen amphotropen Hüllglykoproteingenes mit den SeV-F und -Fmut Varianten.....	107

Abbildung 4-28: Immunfluoreszenznachweis nach Transfektion der RCR Transfervektoren in 293T Verpackungszellen, die für SeV-F und SeV-F _{mut} kodieren.	108
Abbildung 4-29: Western Blot-Nachweis der SeV-F und SeV-F _{mut} Inkorporation in die generierten RCR-Partikel (nach Ankonzentration der im Überstand enthaltenen Partikel mittels Ultrazentrifugation).....	109
Abbildung 4-30: Immunperoxidase-Assay als Transduktionsnachweis für verschiedene Rezipientenzelllinien sowohl durch den RCR-Ausgangsvektor pEA (Positiv-Kontrolle) als auch durch die mit den SeV-F und SeV-F _{mut} pseudotypisierten RCRs	111
Abbildung 4-31: Schematische Darstellung der Herstellung von RCRs mit Überlänge genom	112
Abbildung 4-32: Produktion von <i>egfp</i> kodierenden RCR-Vektoren durch transiente Transfektion der provirale DNA tragenden Ausgangsplasmide in 293T-Virus-Produzentenzellen.....	112
Abbildung 4-33: Notwendigkeit des DNase-Verdau im Rahmen der Titerbestimmung viraler Vektoren durch RTQ-PCR.....	114
Abbildung 4-34: Titerbestimmung retroviraler Vektoren im Überstand Virus-produzierender 293T Zellen.....	115
Abbildung 4-35: Lineare Beziehung zwischen viralen Gesamtpartikeln in verdünnten Überstand und der Verdünnung des Überstandes.....	116
Abbildung 4-36: Quantifizierung der Suizidgen-vermittelten Abtötung RCR-infizierter HepG2-Hepatomzellen fünf Tage nach Beginn der 5-FC-Applikation mittels SRB-Vitalitätsassays	119
Abbildung 4-37: <i>In vitro</i> Sensitivität MoMLV-transduzierter Zellen gegenüber der „ <i>prodrug</i> “ 5-FC.....	120
Abbildung 4-38: <i>In vitro</i> Sensitivität MoMLV-transduzierter Zellen gegenüber der „ <i>prodrug</i> “ 5-FC.....	122
Abbildung 4-39: <i>In vitro</i> Sensitivität MoMLV-behandelter BHK-Zellen gegenüber 5-FC.....	123
Abbildung 4-40: Untersuchung der Synthese viraler Vektoren durch Rezipientenzellen (HepG2).....	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Zusammensetzung einer Standard-PCR-Reaktion	38
Tabelle 3-2: Ablauf des Standard-PCR-Programms	38
Tabelle 3-3: PCR-Parameter für die ortsgerichtete Mutagenese	42
Tabelle 3-4: Zusammensetzung einer RTQ-PCR-Reaktion	47
Tabelle 3-5: Ablauf des verwendeten PCR-Programms	47
Tabelle 3-6: Erstellung einer Verdünnungsreihe einer pACE-YCD-Plasmidlösung.....	48
Tabelle 3-7: Ablauf des Programms zur Cryokonservierung von Zellen.....	54
Tabelle 3-8: Mit der Proteinbestimmung nach Bradford interferierende Substanzen	67
Tabelle 4-1: Virale Titer vor bzw. nach Ultrafiltration	82
Tabelle 4-2: Kein Transduktionsnachweis ASGP-R exprimierender Zellen mit den bisherigen FIV-SeV-F Pseudotypen	93
Tabelle 4-3: Vergleichende Darstellung der Transmembrandomänen und zytoplasmatischen Domänen der jeweiligen Hüllglykoproteine von FIV, VSV und SeV	94
Tabelle 4-4: Kein Transduktionsnachweis von ASGP-R exprimierenden Rezipientenzellen.....	101
Tabelle 4-5: Berechnung retroviraler Titer im Überstand Virus-produzierender Zellen.....	116
Tabelle 5-1: Vergleichende Darstellung der Transduktionseigenschaften von FIV- und MoMLV- Pseudotypen	134

1 Zusammenfassung

Für zukünftige lebergentherapeutische Anwendungen im Patienten, wie etwa der Therapie monogenetischer Erbkrankheiten oder des Hepatozellulären Karzinoms (HCC), werden effiziente und vor allem gewebespezifische, hepatotrope Vektorsysteme benötigt, die bei einer *in vivo* Applikation gezielt die Leberzellen bzw. Hepatomzellen ansteuern.

Die derzeit in der Entwicklung befindlichen retro- und lentiviralen Vektoren sind zwar in der Lage Hepatozyten zu transduzieren, haben aber einen breiten Tropismus und steuern diese daher nicht spezifisch an. Aufgrund dessen war das Ziel dieser Dissertation die Machbarkeit der Generierung eines lentiviralen Vektorsystems auf Basis des Felinen Immundefizienz Virus (FIV) für den kurativen Einsatz monogenetisch bedingter Erbkrankheiten mit Spezifität für die teilungsinaktiven Hepatozyten zu überprüfen.

Voraussetzung dafür war die initiale Etablierung des FIV-Vektorsystems mit leicht zu detektierenden zytoplasmatischen Reportern (wie EGFP oder DsRed2^a). Des Weiteren war die Insertion regulatorischer Sequenzen in das Vektorgenom nötig, um einen Kernimport der proviralen DNA nach Transduktion und die damit verbundene Expression des jeweiligen Reporters effizienter zu gestalten.

Erste funktionelle Untersuchungen der FIV-Vektoren, die mit den heterologen Hüllglykoproteinen des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) oder des *Ross River Virus* (RRV) ausgestattet waren, zeigten deren effiziente pantrope Transduktionseigenschaften in verschiedenen Zelllinien.

In Anlehnung an vorangegangene Pseudotypisierungsversuche von retroviralen Vektoren mit dem heterologen Sendai-viralen Fusionshüllglykoprotein (SeV-F) wurde das etablierte FIV-Vektorsystem mit folgenden Fusionshüllglykoproteinen pseudotypisiert:

- dem Wildtyp SeV-F,
- dem SeV-F_{mut}, einer konstitutiv fusionsaktiven Form des Wildtyp SeV-F, die nicht mehr durch Inkubation mit Trypsin aktiviert werden muss,
- dem SeV-F_{del}, einer trunkierten Variante mit verkürzter zytoplasmatischer Domäne für eine bis dato postulierte verbesserte Inkorporation in die Virushülle.

SeV-F wurde als heterologes Hüllglykoprotein eingesetzt, da für dieses eine Interaktion mit dem ausschließlich von Leberzellen exprimierten Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R) bereits nachgewiesen wurde. Funktionelle FIV-SeV-F Pseudotypen wurden wider erwarten nicht detektiert.

^a Bei DsRed2 handelt es sich um ein autofluoreszentes Protein aus der Seeanemone *Discosoma Coral*, das bei einer Anregung von $\lambda = 558$ nm rot fluoresziert (Emission $\lambda = 583$ nm).

Ausgehend von einer mangelnden bzw. ineffizienten Inkorporation der SeV-F Varianten aufgrund einer möglichen Inkompatibilität von SeV-F mit dem FIV-Nukleokapsid und der dadurch ausbleibenden Bindung des FIV-Vektors an den ASGP-R wurden chimäre SeV-F Hüllglykoproteine hergestellt. Diese besaßen sowohl Transmembrandomänen als auch zytoplasmatische Domänen heterologer Virushüllglykoproteine, die nachweislich mit den FIV-Nukleokapsid interagierten. Dadurch sollte ein effizienter Einbau der chimären SeV-F Hüllglykoproteine in die FIV-Vektorhülle erreicht werden. Auch mit diesen chimären SeV-F Varianten waren keine funktionellen Pseudotypen über eine spezifische Transduktion ASGP-R exprimierender Zielzellen detektierbar. Wurde dagegen zusätzlich für die Pseudotypisierung neben dem SeV-F auch das Hämagglutinin-Neuraminidase Hüllglykoprotein (SeV-HN) eingesetzt, das die Bindung an ubiquitär vorkommende Rezeptoren (Sialinsäure-haltige Ganglioside) auf der Oberfläche von Säugerzellen vermittelt, konnten neben ASGP-R exprimierenden Zellen auch verschiedenste Zelllinien transduziert werden, die den ASGP-R nicht exprimieren. Diese Doppelpseudotypen zeigten somit das gleiche pantrope Transduktionsspektrum wie das Wildtyp SeV. Daher ist anzunehmen, dass das SeV-F Protein einen Co-Faktor in Form eines zweiten viralen Hüllglykoproteins, beispielsweise das SeV-HN, benötigt, der die SeV-F Fusionseigenschaften triggert. Eine Spezifität der FIV-Vektoren für Hepatozyten ist durch eine „einfach“-Pseudotypisierung mit dem SeV-F auf diesem Wege daher nicht zu realisieren.

Diese These wird zusätzlich durch Beobachtungen bei der SeV-F-Pseudotypisierung von replikationskompetenten retroviralen Vektoren (RCR-Vektoren) basierend auf dem Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV) gestützt. Deren Entwicklung zielt auf die gegenwärtig gravierende klinische Limitation der primären Transduktionsineffizienz replikationsdefizienter Vektoren bei der Gentherapie solider Tumoren wie z.B. dem Hepatozellulären Karzinom (HCC). Durch den Austausch des endogenen Hüllglykoproteingenes von MoMLV mit dem SeV-F bzw. dem SeV-F_{mut} auf Vektorgenomebene, entstanden SeV-F bzw. F_{mut} kodierende RCR-Vektoren, deren Replikation auf ASGP-R exprimierenden sowie fortlaufend proliferierenden Hepatomzellen begrenzt bleiben sollte. *In vitro* Infektionsassays mit den neu generierten SeV-F- und SeV-F_{mut}-RCRs im Vergleich zu den parentalen amphotropen RCRs zeigten das bereits für die FIV-Vektoren beobachtete Phänomen, dass nur amphotrope, nicht aber die neu generierten SeV-F/F_{mut}-RCRs in der Lage waren, Rezipientenzellen, einschließlich ASGP-R exprimierender Zellen, zu infizieren sowie in ihnen zu replizieren. Infizierte Rezipientenzellen, die dadurch auch zu Virusproduzenten avancierten, konnten in einem Immunperoxidase Assay durch den Nachweis des zytoplasmatisch in großen Mengen vorliegenden viralen p30 Nukleokapsidproteins nachgewiesen werden. Im Hinblick auf eine Suizidgentherapie des HCC mit hepatotropen RCR-Vektoren wurde im letzten Teil dieser Dissertationsarbeit ein RCR-Vektor hergestellt, der für das sogenannte

SuperCD-Gen, ein bifunktionales Fusionssuizidgen bestehend aus der Cytosin Desaminase (YCD) und der Uracilphosphoribosyltransferase (YUPRT) der Hefe, kodiert. Dieser neuartige SuperCD-RCR-Vektor wurde mit einem Cytosin Desaminase kodierenden RCR-Vektor *in vitro* in Bezug auf deren Toxifizierungspotential in Hepatomzellen bei Gabe der „*prodrug*“ 5-Fluorcytosin verglichen. Beide RCR-Vektoren zeigten eine sehr effiziente Abtötung von Hepatomzellen, zum einen aufgrund des postulierten „*bystander*“-Effektes, und zum anderen aufgrund ihrer replizierenden Natur, da mit jeder Neuinfektion der Hepatomzellen eine neue Genkopie eingebracht wird und dadurch für eine rasche Katalysierung der ungiftigen „*prodrug*“ in das toxische Basenanalogen 5-Fluoruracil gesorgt wird. Ein signifikanter Unterschied in der Toxifizierung zwischen YCD-RCR und SuperCD-RCR Vektor war jedoch nicht nachzuweisen. Trotzdem stellen beide Vektoren neue und vor allem sehr potente Kandidaten für die Suizidgentherapie des HCC dar.

2 Einleitung

Die Gentherapie ist ein Bereich der heutigen molekularen Medizin, der innovative Ansätze für die Therapie bisher nur unzureichend behandelbarer Krankheiten bietet. Theoretisch ist das Grundprinzip denkbar einfach: ein therapeutisches Gen wird in Körperzellen eingebracht und führt dann zur Linderung oder gar Heilung einer genetisch-basierten Erkrankung. In der Praxis aber ist die Entwicklung und Herstellung von sicheren und effizienten Vektoren, mit denen die genetische Information gezielt in spezifische Zellen eines Patienten eingeschleust und exprimiert werden kann, ein noch nicht gelöstes Problem. Daher ist die klinische Praxis von einer routinemäßigen Anwendung gentherapeutischer Techniken noch weit entfernt.

Das Prinzip der Gentherapie geht zurück auf Edward Tatum, der 1966 diese Idee erstmals formulierte¹⁷⁵. Erst knappe 25 Jahre später (1990) wurde der erste Gentherapieversuch mit Patienten, die an einer, durch Adenosindeaminase (ADA)-Defizienz verursachten schweren Immundefizienz (SCID) litten, durchgeführt¹⁸. Dabei kam ein retroviraler Vektor auf Basis des Maus Leukämie Virus (MLV) für den ADA-Genstransfer zum Einsatz, das als Resultat das meist genutzte Transfersystem für therapeutische Gen-Sequenzen wurde. Weltweit wurden und werden seitdem über 1000 klinische Gentherapie-Studien initiiert unter Einbeziehung von bislang mehreren tausend Patienten. Bei dem überwiegenden Anteil dieser klinischen Studien handelt es sich um klinischen Phase I und II Studien, wohingegen sich weniger als 1% in Phase III befindet. Daher existiert bis heute keine Zulassung für eine in der klinischen Routine einsetzbare gentherapeutische Behandlungsmethode¹⁸³. Der mit über 70% überwiegende Anteil dieser Gentherapie-Ansätze dient der Behandlung von Krebs¹⁸³, wohingegen sich die verbleibenden Anteile auf die Behandlung von Infektionskrankheiten, Herz-Kreislaufkrankheiten und den klassischen monogenetischen Erbkrankheiten, wie beispielsweise der bereits genannten ADA-Defizienz, der familiären Hypercholesterinämie (FH), der Hämophilie und der schweren Immundefizienz (SCID-XI) beschränken.

Die Behandlung von Hämophilie B Patienten, die eine Defizienz für den Blutgerinnungsfaktor IX aufweisen, mit Adeno-assoziierten Viren (AAV), ist bisher eine der wenigen gentherapeutischen Applikationen, für die im Studienkontext ein überzeugender Vorteil zu anderen Behandlungsmethoden gezeigt werden konnte. So zeigte sich hier nach der Injektion der rekombinanten AAV in den Skelettmuskel der Patienten, eine anschließende Linderung des Krankheitsverlaufes⁷⁸. Weiterhin konnten in einer im Jahr 2000 gestarteten französischen Studie von Alain Fischer inzwischen 14 von 15 Kindern, die an der schweren X-Chromosom gekoppelten Immundefizienz (SCID-XI) litten, durch eine *ex vivo* Transduktion autologer Stamm- und Progenitorzellen mit einem retroviralen Vektor, der für die γ -Kette des Interleukin-2 Rezeptors (γ_c)

kodierte, geheilt werden. Dieser Rezeptor war bei den erkrankten Kindern defekt und führte dadurch zu der schweren Immundefizienz²⁹, die für die betroffenen Kinder in der Regel nach wenigen Jahren tödlich verläuft. Allerdings ist der Erfolg der französischen Studie durchaus zwiespältig, da bei inzwischen drei der behandelten Kinder anschließend eine T-Zell Leukämie festgestellt wurde. Die Leukämie wurde bei allen drei Kindern durch eine Insertion des retroviralen Vektors in die Nähe eines Proto-Onkogenes mit verursacht.

Im Jahr 1999 geriet die Anwendung der Gentherapie - ausgelöst durch den Tod des 18 jährigen Patienten Jesse Gelsinger - das erste Mal unter starke Kritik. Dieser hatte sich freiwillig der von James Wilson geleiteten Phase I Studie einer Gentherapie zur Behandlung der leberspezifischen Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz (OTC) mittels Adenoviren unterzogen. Er erhielt die in dieser Studie vorgesehene höchste Vektordosis von $3,8 \times 10^{13}$ viralen Partikeln und erlitt 4 h nach der Vektorgabe eine akute Immunreaktion mit späterem Multiorganversagen. Trotz regionalisierter Applikation dieser hohen Vektordosis (via der Leber-eigenen *Arteria hepatica*), konnte lediglich ein geringer Teil der Leberzellen (ca. 1%) transduziert werden. Der substantielle Anteil der Vektoren verteilte sich über die Blutbahn in weitere Organe, wie Niere, Lymphknoten und Knochenmark, in denen sich das Virus letztendlich akkumulierte und eine schwere Immunreaktion auslöste^{107,158}. Die hier genannten Beispiele für eine Gentherapie zeigen, dass eine gentherapeutische Behandlung zwar prinzipiell machbar ist, aber die Anwendungssicherheit für einen routinemäßigen klinischen Einsatz noch nicht gegeben ist. So ist die Gewebespezifität der Vektorsysteme bei weitem noch nicht ausreichend determiniert, weshalb der therapeutische Gentransfer teilweise *ex vivo* durchgeführt wurde. Hierzu werden die zu manipulierenden Zellen dem Patienten entnommen und der Gentransfer anschließend *in vitro* durchgeführt, wodurch die genetisch korrigierten bzw. modifizierten Zellen wieder in den Patienten eingebracht werden. Dies geht mit einem hohen Aufwand und erhöhten Risiken für den Patienten einher und schränkt daher die Anwendungsmöglichkeiten der *ex vivo* Gentherapie ein.

Sollen bestimmte Zelltypen mit Gentransfervektoren *in vivo* adressiert werden, muss eine größtmögliche Gewebespezifität vorhanden sein. Primär geht es darum, Zellen der Keimbahn vor einem unbeabsichtigten Gentransfer zu bewahren. Zur Geweberestriktion gentherapeutischer Vektoren existieren unterschiedliche Ansätze. Einerseits kann für die gezielte Behandlung eines bestimmten Zelltyps eine spezifische Ansteuerung zelleigener Oberflächenrezeptoren erfolgen, das sogenannte „*Cell-Targeting*“. Andererseits werden gewebe- bzw. organspezifische genregulatorische Elemente eingesetzt, die nur in dem jeweiligen Zielgewebe aktiv werden, außerhalb des Zielgewebes aber für eine Limitierung der Genexpression sorgen. Eine Kombination aus diesen beiden Möglichkeiten der Gewebespezifisierung der Vektorsysteme wäre optimal und würde den Übergang zur gezielten geweberestringierten *in vivo* Gentherapie mit all ihren Möglichkeiten erlauben.

2.1 Gentransfer-Systeme

2.1.1 Nicht-virale und virale Gentransfer-Systeme

Gentherapie-Vektoren untergliedern sich prinzipiell in zwei Kategorien, die nicht-viralen und die viralen Vektoren. Zu den nicht-viralen Vektoren zählen beispielsweise nackte DNA, die mittels Injektion appliziert und von den Zellen selbstständig aufgenommen wird⁵⁹; aber auch Liposomen, die aus kationischen Lipiden und Nukleinsäuren bestehen und bei Applikation mit der Zellmembran der Zielzelle fusionieren und so ihre genetische Information in die Zelle einbringen³³. Auch Nanopartikel, wie z.B. magnetische Partikel, auf die Nukleinsäuren präzipitiert und die mit Hilfe eines starken Magnetfeldes in die zu transfizierenden Zellen geschleust werden, fallen unter den Oberbegriff nicht-virale Gentransfer-Systeme^{138,139}. Obwohl nicht-virale Vektoren leicht in relativ großen Mengen hergestellt werden können und in der Regel wenig toxische bzw. immunologische Probleme verursachen, ist deren Potential, therapeutische Nukleinsäuren zu übertragen, eher gering. Hinzu kommt, dass die Expression fremder Gene nur von transienter Dauer ist und damit deren Anwendung bei Krankheiten, bei denen ein kontinuierliches Expressionsniveau über einen längeren Zeitraum erforderlich ist, nicht realisierbar ist.

Bei viralen Vektoren macht man sich die Fähigkeit von Viren zunutze, ihre genetische Information sehr effizient in Zellen einzubringen. Vergleichbar mit den zugrundeliegenden Viren, besitzen die viralen Vektorsysteme ein RNA- oder DNA-Genom und haben Genom-integrierende und nicht-integrierende Eigenschaften. Integriert der virale Vektor in das Genom, eignet sich dieser besonders für den gentherapeutischen Einsatz bei genetischen Defekten, die eine lebenslange Expression des defizienten Gen-Produktes erfordern. Die dauerhafte Transduktion von therapeutischen Genen kann in teilungsinaktiven Zellen auch durch nicht-integrierende, episomal vorliegende virale Vektoren stattfinden. Die am häufigsten eingesetzten episomalen Vektoren stellen rekombinante Adenoviren dar, als integrierende Vektoren finden beispielsweise Adeno-assoziierte Viren, vor allem aber Retro- bzw. Lentiviren Verwendung. Letzere haben gegenüber den Retroviren den Vorteil, dass sie auch in das Genom teilungsinaktiver Zellen integrieren können.

2.1.2 Adenovirus (Ad)

Die Adenoviren (Ad) sind eine Familie von DNA-Tumor-Viren, die benigne Infektionen des humanen respiratorischen Traktes verursachen¹⁵⁴. Sie besitzen ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von 36 kb und sind in der Lage, ihr genetisches Material in sich teilende und

nicht-teilende Zellen effizient zu transduzieren. Der adenovirale Rezeptor wird ubiquitär exprimiert, wodurch eine große Anzahl an Zelltypen durch diesen Vektor transduziert werden kann¹⁰.

Umfangreiche Anstrengungen bei der Entwicklung von adenoviralen Vektoren wurden insbesondere unternommen, um ihr potentes immunogenes Potential weitestgehend zu reduzieren. In der 1. Generation der adenoviralen Vektoren wurden ein bzw. zwei der sogenannten frühen Gene (E1 und E3) deletiert. Zellen, die mit diesen Vektoren transduziert wurden exprimierten weitere adenovirale Proteine auf niedrigem Level und lösten dadurch starke cytotoxische T-Zell Antworten aus, die sehr schnell die Expression der Transgene eliminierten. Die 2. und 3. Vektor-Generation enthielt zusätzliche Deletionen der frühen Gene (E2 und/oder E4) und zeigte damit eine reduzierte Toxizität im Tiermodell^{3,101,126}. Der bisher größte Fortschritt bezüglich der Verringerung der potenten Immunogenität war die Entwicklung von Helferviren-abhängigen adenoviralen Vektoren (HD-Ads), den sogenannten adenoviralen *gutless* Vektoren^{86,133}, bei denen alle viralen Gene deletiert sind und *in trans* zur Verfügung gestellt werden. Dadurch konnte die Dauer der Transgenexpression verlängert werden, und die Vektoren waren besser für eine Langzeit-Gentherapie geeignet¹¹⁹.

2.1.3 Adeno-assoziiertes Virus (AAV)

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV), ein humanes Parvovirus, ist ein nicht pathogenes Einzelstrang DNA-Virus, das sich als eine sehr effiziente Genfähre herausgestellt hat²⁸. AAV benötigt für seine Replikation ein Helfervirus, das weitere notwendige Gene *in trans* zur Verfügung stellt. In der Regel ist dieses Helfervirus ein Adenovirus. Der AAV-Wildtyp (AAV-wt) ist aufgrund der noch vorhandenen Funktion des Rep-Proteins in der Lage, spezifisch an einem bestimmten Locus auf dem Chromosom 19 zu integrieren; bei rekombinanten AAVs ist diese wünschenswerte Eigenschaft durch die Deletion des Rep-Proteins abhanden gekommen⁸⁸. Allerdings konnte gezeigt werden, dass AAV Vektoren nach der Transduktion entweder episomal oder integriert in der Zielzelle vorliegen^{45,102,112}. Der Zelltropismus von AAV ist relativ breit, daher sind auch die meisten Zellen für einen Gentransfer empfänglich. Fortschritte wurden inzwischen bei der Identifizierung des Rezeptors und der Capsid-Protein-Interaktion gemacht. Durch das Design von neuen Capsid-Proteinen ist ein restringierter oder aber gezielter Tropismus des AAV möglich^{56,170}. Das Hauptproblem bei der Herstellung rekombinanter AAV-Vektoren (rAAV) ist die Zytotoxizität des Rep-Gens für die Produzentenzelllinie. Dadurch wurde bisher keine Verpackungszelllinie beschrieben, die hochtitrige AAV-Transgen-Vektoren produzieren kann, sodass deren Herstellung bisher auf transientem Wege geschehen muss. Ein weiterer Nachteil von AAV ist dessen maximale Verpackungskapazität für therapeutische Sequenzen von ca. 4,5 kb. Inzwischen wird aber die beobachtete *in vivo*

Konkatemerisierung^b der rAAV Genome ausgenutzt, um dieses Kapazitätsproblem zu adressieren^{44,122}. Durch ein Aufteilen einer Expressionskassette auf zwei AAV Vektoren kann nach der Konkatemerisierung im Zellkern der Zielzelle eine funktionelle Kassette wieder hergestellt werden⁴⁶.

2.1.4 Retrovirus

Die am häufigsten verwendeten RNA-Virus-Vektoren leiten sich von den Retroviren ab. Gleichzeitig wurden Retroviren auch als eines der ersten viralen Gentransfersysteme für die Gentherapie entwickelt. Retroviren bilden eine große Familie von behüllten Plus-Strang-RNA-Viren, die in allen Vertebraten vorkommen. Sie werden klassifiziert in Onkoretroviren (z.B. Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV)), Lentiviren (z.B. Feline Immundefizienz Virus (FIV)) und Spumaviren (z.B. *Human Foamy Virus* (HFV)).

Behüllte Retroviruspartikel beinhalten zwei Kopien des viralen RNA-Genoms (Abbildung 2-1), umgeben von einem konusförmigen Kapsid. Die virale RNA beinhaltet mindestens drei essentielle Gene, *gag*, *pol* und *env*, die durch die sogenannten *long terminal repeats* (LTR) flankiert sind. Das *gag*-Gen kodiert für die Kapsid-, Matrix- und Nukleokapsidproteine, die durch proteolytische Spaltung des *gag* Vorläuferproteins generiert werden. Das *pol*-Gen kodiert für die virale Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase. Das *env*-Gen schließlich kodiert für das virale Oberflächenprotein, über das die Interaktion zwischen Virus und Zelloberfläche stattfindet. Onkoretroviren sind von der genomischen Struktur her relativ einfache Viren, die lediglich für die Strukturgene kodieren, wohingegen die Lentiviren und Spumaviren eine deutlich komplexere Organisation des Genoms aufweisen und für zusätzliche virale Proteine kodieren.

Nach der Bindung des Virus an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche wird das Virus-Kapsid, das die RNA-Genome enthält, durch die Fusion beider Membranen in die Zielzelle geschleust. Das virale RNA-Genom wird direkt, mittels der viruseigenen Reversen Transkriptase, in doppelsträngige Provirus-DNA umgeschrieben. Die provirale DNA ist nach der Umschreibung mit weiteren viralen Proteinen assoziiert, einschließlich der Nukleokapsid-Proteine, Reversen Transkriptase und Integrase, bildet damit einen Präintegrationskomplex und wird schließlich in den Zellkern transferiert. Hier sorgt die Integrase für die Integration des Provirus in das Genom der Rezipientenzelle. Transkriptionsfaktoren der Rezipientenzelle initiieren die Transkription des viralen Genoms ausgehend vom LTR als Promotor; neue virale Partikel setzen sich aus den neugebildeten

^b Aneinanderreihung mehrerer Kopien einer DNA-Sequenz zu einer Serie

einzelnen Bestandteilen an der Zellmembran zusammen. *Gag-pol* und *gag* Vorläuferproteine verbinden sich dabei mit zwei Kopien der viralen RNA, während die viralen Hüllproteine in die Virusmembran bei dem Ausknospungsprozess inkorporiert werden. In den neu gebildeten Viren unterliegen die *gag* und *gag-pol* Vorläuferproteine einer weiteren Prozessierung durch die virale Protease, was als Reifung des Virus bezeichnet wird.



Abbildung 2-1: Genomischer Aufbau eines Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV)

Retrovirale Vektoren wurden von einer Reihe unterschiedlichster Onkoretroviren abgeleitet, insbesondere des Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV). Die replikationsdefekten MoMLV-Vektoren wurden durch den Austausch der für die viralen Proteine kodierenden Sequenzen generiert und durch das zu übertragende Transgen, einschließlich exogener Promotor-Sequenzen, ersetzt. Zusätzlich zum Verpackungssignal verblieben in den neu generierten Vektoren auch die LTRs und benachbarte Sequenzen, die essentiell für deren Reversen Transkription und Integration sind. Die RNA-Produktion dieser Vektoren wird durch die U3-Region des LTR oder durch CMV/LTR Hybride, letztere mit deutlich höherer transkriptioneller Aktivität, gesteuert. Dies führt zur Integration des Vektors sowie der nachfolgenden LTR-gesteuerten Transgen-Expression in den transduzierten Zellen. Die Verpackung der retroviralen Vektoren wird durch die Bereitstellung der Strukturproteine *in trans* in den Verpackungszellen erreicht. Die erste Generation von Verpackungszelllinien exprimierte *gag*, *pol* und *env* von einer kompletten proviralen DNA, der nur das Verpackungssignal fehlte¹⁰⁴. Die Sequenzhomologie zwischen Vektor und Verpackungskonstrukt beinhaltet jedoch das Restrisiko, dass über Rekombination wieder replikationskompetente retrovirale Vektoren generiert werden. Um die Rekombinationswahrscheinlichkeit auf ein Minimum zu reduzieren, wurden anschließend Verpackungszelllinien entwickelt, die *gag*, *pol* und *env* von unterschiedlichen Konstrukten ohne virales Verpackungssignal exprimieren. Zudem wird die Expression nicht mehr vom retroviralen LTR, sondern von konstitutiven Promotoren gesteuert, die einen entsprechend hohen Level der Virusproduktion erlauben^{35,104}. Neben der Herstellung der retroviralen Vektoren über stabile Verpackungszelllinien lassen sich auch hochtitrige Vektorüberstände durch eine transiente Transfektion von Vektor-, Verpackungs- und Hüllglykoprotein-Expressionsplasmid in die Verpackungszellen generieren. Aufgrund der Besorgnis unerwünschter Vektormobilisierung durch eine eventuelle Rekombination mit endogenen Retroviren in den Zielzellen wurden darüber hinaus SIN-Vektoren, sogenannte selbstinaktivierende Vektoren,

entwickelt¹⁹⁷. Die Besonderheit dieser Vektoren beruht darauf, dass die Expression des Transgenes in transduzierten Zellen aufgrund einer Deletion in der U3 Region nicht mehr via LTR vermittelt ist. Stattdessen wird diese Funktion von einem internen Promotor übernommen, was die Möglichkeit der Verwendung von gewebespezifischen Promotoren eröffnet.

2.1.4.1 Replikationskompetente Retroviren (RCR)

In den Anfängen der retroviralen Vektorentwicklung wurden die eingesetzten Vektoren ausschließlich in replikationsdefizienter Form (als RDR - replikationsdefiziente Retroviren) hergestellt. Diese bewußt erzeugte Vermehrungsunfähigkeit wirkt sich allerdings in bestimmten klinischen Situationen nachteilig auf die erzielbare Transduktionseffizienz aus und resultiert in einer deutlichen Reduktion des Anteiles an Tumorzellen, der gentherapeutisch manipuliert werden kann.

Diese primäre Transduktions-Ineffizienz stellt gegenwärtig eine gravierende klinische Limitation bei der Gentherapie solider Tumoren wie z.B. dem Hepatozellulären Karzinom (HCC - *hepatocellular carcinoma*) dar^{12,16}.

Daher wurden in den letzten Jahren zunehmend replikationskompetente Vektoren entwickelt und verbessert, wobei ein Schwerpunkt auf die Entwicklung replikationskompetenter Retroviren (RCR) gesetzt wurde, die in der Lage sind, definierte Rezeptoren in spezifischer Weise zu adressieren^{24,187}.

Der Vorteil solcher RCR-Vektoren speziell für die Gentherapie solider Tumoren liegt darin, dass jede erfolgreich transduzierte Tumorzelle aufgrund der Replikationskompetenz der eingesetzten RCR-Retroviren zu einer neuen Virus-produzierenden Zelle wird. Die von dieser Tumorzelle dann kontinuierlich neu abgegebenen RCR-Viruspartikel können in bislang nicht infizierte benachbarte Tumorzellen eindringen und auf diese Weise nach und nach eine nahezu komplette Durchinfektion solider Tumorknoten bewerkstelligen, selbst wenn die initiale Transduktionseffizienz des Ziel-Tumorgewebes unter einem Prozent lag.

Gegenüber anderen replikationskompetenten viralen Vektoren zeichnen sich MoMLV-basierte RCR-Vektoren dadurch aus, dass sie (i) keine eigenständige Lyse der von ihnen befallenen Wirtszellen initiieren und sich dadurch zunächst ungehindert von Tumorzelle zu Tumorzelle ausbreiten können und dass (ii) deren viralen Proteine keine starke Immunantwort induzieren, welche eine zu rasche Elimination von Virusproduzentenzellen zur Folge haben könnte, was der angestrebten effizienten Weitergabe beispielsweise eines Suizid-Transgenes innerhalb der Tumormasse entgegen stehen würde.

Von besonderer Bedeutung für die HCC-Gentherapie ist die Möglichkeit, dass in RCR-Vektoren zusätzlich Suizidgene eingebaut werden können, sodass eine gezielte Tumorlyse durch eine nach erfolgtem Suizidgen-Transfer sich anschließende systemische Applikation einer sog. „*prodrug*“

ausgelöst werden kann. Dies geschieht idealerweise erst zu einem Zeitpunkt, zu dem eine bereits möglichst vollständige RCR-vermittelte Durchinfektion der Tumormasse erzielt worden ist.

Die zusätzliche Kodierung von Suizidgenen im RCR-Vektorgenom stellt gleichzeitig einen besonderen Sicherheitsmechanismus dar, da im Rahmen der „*prodrug*“-getriggerten Tumorlyse gleichzeitig auch alle RCR-Produzentenzellen eliminiert werden.

Die bei der Behandlung des HCC erforderliche Selektivität von RCR-Vektoren kann prinzipiell dadurch erzielt werden, dass (i) RCR-Vektoren *in vivo* zum einen nur proliferierende (Hepatom)zellen¹¹⁵, aber nicht zellteilungsinaktive Hepatozyten transduzieren, und zum anderen (ii) durch eine mögliche sog. Pseudotypisierung mit dem F-Hüllprotein von Sendai Virus (SeV). Letzteres sollte sicherstellen, dass ausschließlich Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R)-exprimierende Zielzellen (Hepatozyten und Hepatomzellen) adressiert werden können¹⁶².

Alle bis vor kurzem beschriebenen RCR-Vektoren enthielten Transgene mit einer Länge von maximal 1200 bp in der U3 Region des 3' LTR^{41,57,143,169}. Problematisch war dabei die Tatsache, dass sich die rekombinanten Genome dieser auf diese Weise konstruierten Vektoren als überaus instabil erwiesen, was zu einem sehr raschen Transgenverlust, zum Teil schon nach dem ersten Infektionszyklus, führte^{41,169}. Diese Eigenschaft verhinderte über viele Jahre hinweg den therapeutischen Einsatz von RCR-Vektoren.

Im Jahr 2001 gelang es allerdings erstmals, genetisch stabile, funktionell aktive RCR-Vektoren zu entwickeln, die eine sogenannte *internal ribosomal entry site* (IRES)-Transgen Expressionskassette besitzen, die präzise an das 3' Ende des Envelope-Gens anschließt^{97,99} (Abbildung 2-2). Bei diesem neuartigen Vektor-Design kommt es auch nach mehreren Infektionszyklen nicht zu Deletionen des Transgens. Zudem konnte *in vivo* ein hocheffizienter Gentransfer in solide Tumoren beobachtet werden^{97,99}.

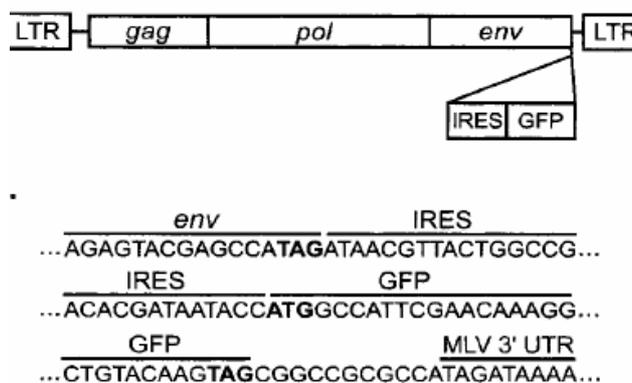


Abbildung 2-2: Genomischer Aufbau funktioneller RCR-Vektoren

Oben: Schematische Darstellung der Struktur eines RCR-Vektorgenoms mit Kennzeichnung der Transgen-Insertionsstelle (hier IRES-GFP Kassette). **Unten:** Darstellung der Nukleotidsequenzen der Übergänge zwischen retroviralem Hüllprotein-Gen (*env*-Gen) und IRES, IRES und GFP sowie GFP und 3'LTR (*aus Logg et al., 2001*).

Der Nachweis der Funktionalität dieser genetisch stabilen RCR-Vektoren konnte bereits im Tiermodell bei der Behandlung von Glioblastomen im Vergleich zu herkömmlichen RDR-Vektoren erbracht werden. Hierzu wurden Glioblastom-Zellen in Ratten subcutan inokuliert und nachfolgend sowohl mit RDR- als auch RCR-Vektoren mit einer Dosis von jeweils 1×10^5 transduzierenden Einheiten injiziert. Erwartungsgemäss waren 6 Wochen nach der Injektion lediglich 0,2 % des Tumors durch RDR-Vektoren, dagegen aber 97,2 % durch RCR-Vektoren transduziert¹⁸⁷. Die ergänzende Untersuchung der Organe der Versuchstiere auf eine etwaige systemische Verbreitung der RCR-Vektoren außerhalb des Subkutan-Tumors (mittels genomischer PCR-Analyse) erbrachte ein negatives Ergebnis¹⁸⁷.

Für das HCC ist ein derartiger gentherapeutischer Ansatz unter Verwendung von RCR-Vektoren bislang noch nicht beschrieben worden, ebensowenig wie eine Pseudotypisierung von RCR-Vektoren mit einem heterologen Hüllprotein, wie dem Fusionsprotein aus dem SeV, für das bereits die Vermittlung eines ASGP-R spezifischen Gentransfers auf der Basis von RDR-Vektoren nachweisbar war¹⁶².

2.1.5 Felines Immundefizienz Virus (FIV)

Vorraussetzung für eine effektive Gentherapie vieler Krankheiten ist die stabile, genetische Modifizierung terminal differenzierter Zellen oder Vorläuferzellen, die sich nur gelegentlich teilen. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten retroviralen Vektoren sind nur die lentiviralen Vektoren in der Lage, sich zuverlässig in die Chromosomen von teilungsinaktiven Zellen zu integrieren (siehe auch 2.1.5.1). Für die parentalen Viren ist die Fähigkeit, teilungsinaktive Zellen zu infizieren, essentiell für den Aufbau eines Makrophagen-abhängigen Reservoirs, eine Kernstrategie aller Lentiviren. Diese lentivirale Eigenschaft nutzbar zu machen, war der Anreiz für die Entwicklung viraler Vektoren aus diesen pathogenen komplexen Retroviren. Nachdem HIV-1-Vektoren als erstes lentivirales Vektorsystem beschrieben wurden, folgten auch replikationsdefiziente Systeme von nicht-Primaten- bzw. Primaten-spezifischen Lentiviren, beispielsweise FIV und das Affenimmundefizienz-Virus (SIV)^{34,74,110,116,129,131,140}. Zusätzlich zur Verwendung in der vorklinischen Gentherapie-Forschung, finden lentivirale Vektoren auch Anwendung in der Grundlagenforschung^{61,80,95,100,151}.

HIV-basierte lentivirale Vektoren transduzieren zwar effizient teilungsinaktive Zellen, werfen aber auch Sicherheitsbedenken in Bezug auf klinische Anwendungen auf. Aus diesem Grund sind zunehmend nicht-Primaten Lentiviren, wie beispielsweise FIV (Untergruppe: nicht-primaten Lentiviren; Gattung: Lentiviren; Familie: Retroviren) in den Fokus der Vektorentwicklung gerückt. FIV ist phylogenetisch nur entfernt mit Primaten-Lentiviren verwandt^{6,128,172} und trotz wiederholter Exposition sind bisher keine Fälle humaner Infektionen mit FIV bekannt geworden^{43,125,194}. FIV infiziert bisher

ausschließlich Felidae (Katzen), einschließlich der domestizierten Katzen, bei denen der Krankheitsverlauf der induzierten Immundefizienz von HIV beim Menschen ähnelt. Aus diesem Grund stellen FIV und damit infizierte Katzen ein ideales Modell für die antivirale und AIDS-Vakzinforschung dar.

FIV Genomstruktur

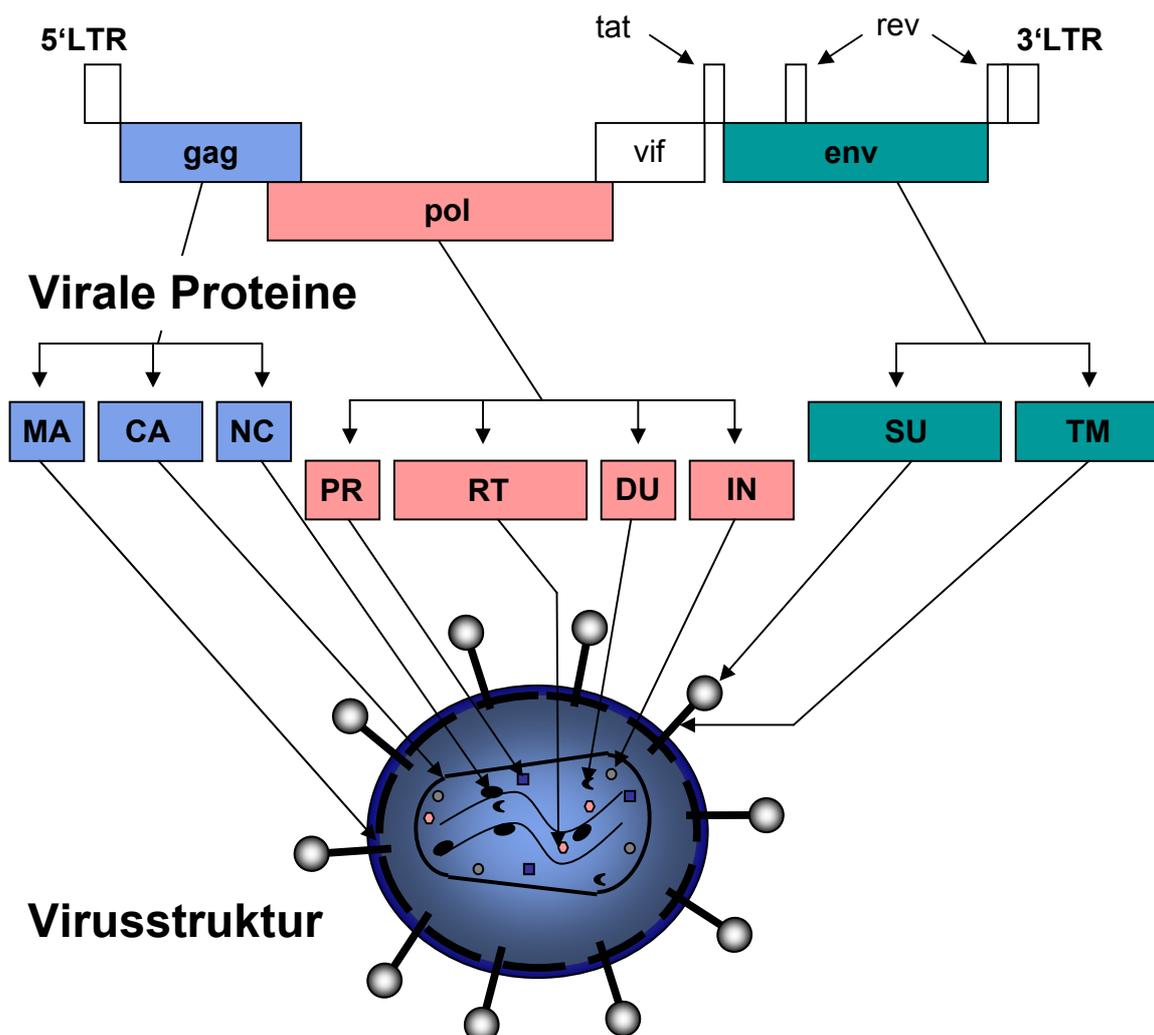


Abbildung 2-3: Genomischer und struktureller Aufbau eines Wildtyp Felines Immundefizienz Virus (FIV)
 Gezeigt ist hier die genomische Struktur eines FIV, dessen Strukturproteine und Enzyme, sowie die generelle Struktur des Virus. Abbildung nach Yamamoto (1999).

Das Genom von FIV ist relativ einfach organisiert (Abbildung 2-3) und erleichtert damit dessen Einsatz zur Vektorentwicklung (Abbildung 2-4) und Analyse. Zusätzlich zu den Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* und deren Genprodukten, die allen Retroviren gemeinsam sind, besitzt FIV zusätzlich eine Deoxyuridin-Triphosphatase, ebenfalls kodiert vom *pol*-Gen sowie drei weitere akzessorische bzw.

regulatorische Genprodukte, Vif (*viral infectivity factor*), Tat (Synonyme: OrfA, Orf2) und Rev. Die Genprodukte der FIV-Strukturgene haben weitgehend die gleiche Funktion wie bei den Onko-Retroviren. Die Deoxyuridin-Triphosphatase ist ein Charakteristikum der nicht-Primaten Lentiviren, denn HIV und SIV besitzen dieses Enzym nicht. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von dUTP zu dUMP und beugt damit einem Falscheinbau von Desoxyuridin während der DNA-Synthese vor. Die Funktion des akzessorischen Vif-Proteins, das bei allen Lentiviren außer dem *Equine Infectious Anemia Virus* (EIAV) vorkommt¹²⁷, ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Es wird aber vermutet, dass Vif einen positiven Einfluss bei der zellfreien Virusinfektion ausübt. Anhand Vif-defizienter Viren konnte gezeigt werden, dass diese nicht mehr in der Lage sind, feline T-Zellen zu infizieren¹⁷⁸. Mit dem Tat-Protein kodiert FIV seinen eigenen, auf die LTR-gesteuerte Transkription wirkenden, transaktivierenden Faktor. Dieser scheint zudem vorhandene Transkriptionsfaktorbindungsstellen (AP1, C/EBP *tandem repeat*, ATF) im FIV-Promotor/Enhancer zu nutzen³⁶. Des Weiteren ist Tat essentiell für eine effiziente Replikation von FIV in feline T-Zelllinien und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)¹⁷⁷. Das rev-Gen als drittes akzessorisches Gen kommt ebenfalls bei allen Lentiviren vor und kodiert für das gleichnamige Rev-Protein, einem Schlüsselfaktor in der Replikation der Lentiviren. Einmal zu einer gewissen Menge im Zellkern akkumuliert, verursacht das Rev-Protein die Umschaltung auf die Expression der späten Gene im viralen Lebenszyklus. Rev fördert dann den Kernexport von nicht gespleisster und einfach gespleisster mRNA, z.B. virale genomische RNA, die auch für *gag-pol*-, *vif*- und *env*-RNAs kodiert und initiiert damit deren Translation. Die Funktion von Rev wird durch dessen Interaktion mit einer hochstrukturierten Sequenz vermittelt, dem so genannten *rev response element* (RRE), das auf der Ziel-RNA vorhanden ist. RRE ist innerhalb der kodierenden Region des *env*-Genes in der Nähe dessen 3' Endes lokalisiert¹³⁶.

Das Ziel bei der Herstellung eines FIV-Vektorsystems, analog zu den bisher etablierten MoMLV- und HIV-Vektorsystemen, liegt in der Reduzierung der homologen Rekombinationswahrscheinlichkeit durch möglichst minimale Sequenzüberlappungen bei den einzelnen FIV-Konstrukten, ohne dadurch einen Titerverlust bei der Vektorproduktion zu riskieren. Für die Umsetzung dieser Sicherheitsmaßnahmen bei der FIV-Vektorentwicklung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das generelle Vektordesign für lentivirale Vektoren angewendet; eine Trennung der in *cis*-wirkenden Sequenzen, die für einen Transfer des viralen Genoms in die Zielzelle sorgen, von den Sequenzen, die für die *in trans* wirkenden viralen Proteine kodieren (siehe Abbildung 2-4). Diese Maßnahmen bewirken gleichzeitig, dass die maximale Verpackungskapazität eines FIV-Vektors bis zu 8 kb beträgt, die somit der Übertragung therapeutischer Gene zur Verfügung steht.

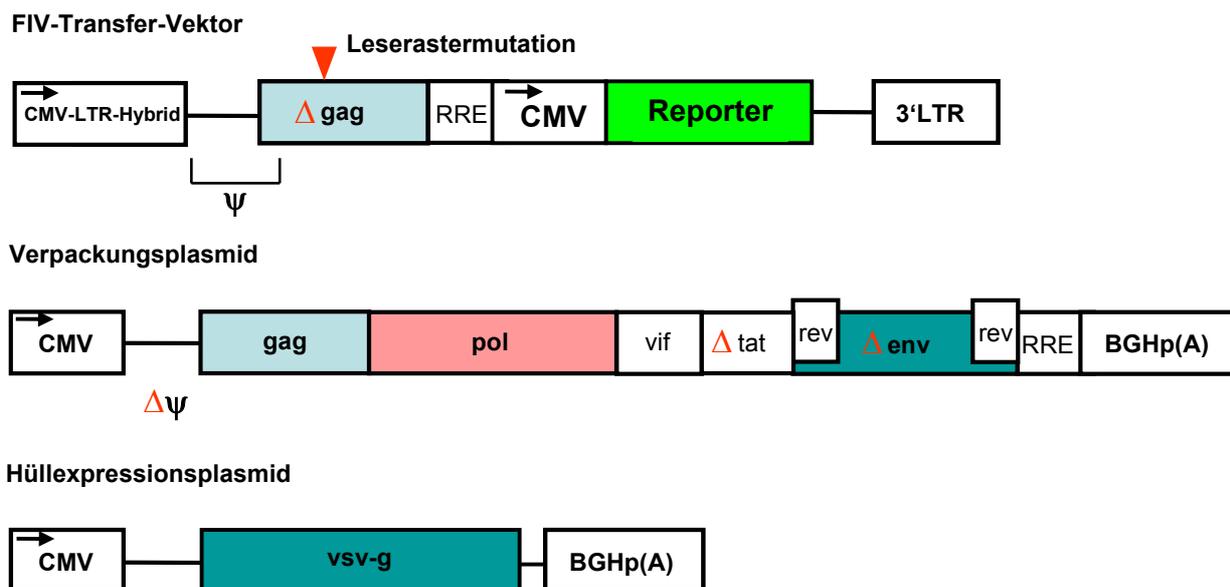


Abbildung 2-4: FIV-Vektorsystem

Das hier abgebildete FIV-Vektorsystem besteht aus dem FIV-Transfer-Vektor, der für ein Reportergen oder für ein therapeutisches Gen kodieren kann, sowie dem Verpackungs- und dem Hüllexpressionsplasmid, die beide für die *in trans* komplementierenden Proteine kodieren, welche für den Zusammenbau eines funktionellen Vektorpartikels notwendigen sind.

2.1.5.1 Lentiviraler Kernimportmechanismus

Eine besondere Fähigkeit, durch die sich alle Lentiviren auszeichnen, ist die Verwendung eines Zellkernimport-Mechanismus, der es der proviralen DNA erlaubt, die Membran des Zellkerns der Wirtszelle zu passieren, während diese sich in einem zellteilungsinaktiven Zustand befindet. Während der reversen Transkription von HIV-1¹⁹⁹ und auch FIV¹⁹¹ findet ein zentrales Strang-Austausch-Ereignis statt, dem eine zentrale Initiation und Termination der Synthese des Plus-Stranges folgt. Dies führt zu einer Plus-Strang-Überlappung, dem sogenannten *Central DNA-Flap* (Abbildung 2-5). Der *Central DNA-Flap* agiert hier als Cis-Determinante für den HIV-1 DNA Kernimport. Wildtyp virale lineare DNA wird fast vollständig in den Kern importiert, wo sie entweder integriert oder zirkularisiert. Im Gegensatz dazu akkumuliert in infizierten Zellen mutierte virale DNA, der der *Central DNA-Flap* fehlt, als nichtintegrierte lineare DNA in der Nähe der Kernmembran. Konsequenterweise zeigen HIV-1-Vektoren, denen der *Central DNA-Flap* fehlt, einen starken Defekt des Kernimportes, der durch die Reinsertion der *Central DNA-Flap* Sequenz wieder auf wt-Level korrigiert werden kann.

Aus bereits erwähnten sicherheitsrelevanten Aspekten bei der Vektorentwicklung (2.1.4) mit speziellen Ausnahmen (2.1.4.1) gültig für Retroviren und Lentiviren sowie zur Erhöhung der Vektorverpackungs-Kapazität fehlte den bislang verwendeten rekombinanten FIV-Transfervektoren

die *central polypurine tract / central termination sequence* (cppt/cts Sequenz, siehe Abbildung 2-5), da bislang durch die Entfernung der pol-Sequenz auch der kodierende Abschnitt für die enzymatische Integraseaktivität, die wiederum die cppt/cts Sequenz enthält, entfernt wurde. Inzwischen weisen aber lentivirale Vektoren der neueren Generation diese cppt/cts Sequenz auf.

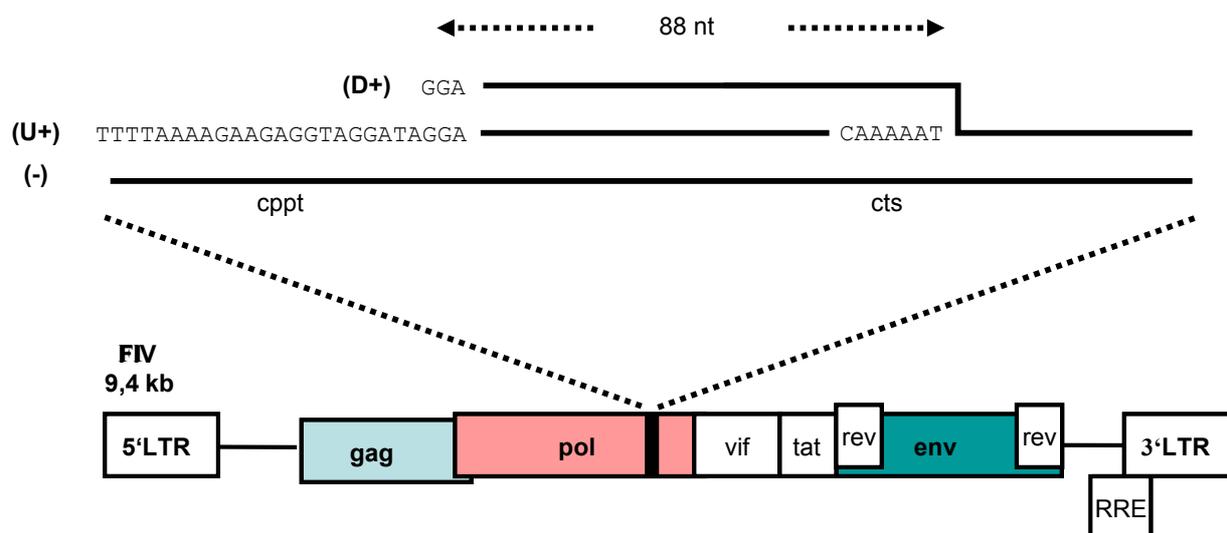


Abbildung 2-5: Lokalisation des cppts (*central polypurine tract*) und der cts (*central termination sequence*) im *pol*-Gen von FIV
 Durch die Reverse Transkription in mit FIV infizierten Zellen entsteht ein Präintegrationskomplex, der einen sogenannten *Central DNA-Flap* beinhaltet, bei dem es über eine Länge von 88 Nucleotiden zu einer dreifach-Überlappung des Minus, U+ und D+ DNA-Stranges kommt. Dieser *Central DNA-Flap* stellt ein Kernimportsignal dar und sorgt dafür, dass das virale Genom in den Zellkern der Wirtszelle importiert wird. Abbildung nach Whitwam (2001).

2.1.6 Der ideale Gentherapie-Vektor

Aufgrund des Spektrums der verschiedenen Einsatzmöglichkeiten viraler Vektoren in der humanen viralen *in vivo*-Gentherapie kann es „den einen“ idealen Vektor für alle Anforderungen nicht geben. So wäre im Falle einer Tumor-Therapie mit toxischen Genprodukten (Suizidgentherapie) nur eine kurzzeitige Expression des Transgens notwendig, wofür z.B. adenovirale Vektoren gut geeignet wären. Für eine dauerhafte Expression zur Korrektur genetischer Krankheiten wäre ein integrierender Vektor ohne immunogenes Potential zu bevorzugen.

Die alternativen Systeme für die verschiedenen Anwendungen haben jedoch eine Reihe gemeinsamer Ansprüche, die es für einen sicheren späteren Einsatz zu erfüllen gilt. Ein hypothetischer idealer Vektor sollte Eigenschaften viraler und synthetischer Systeme besitzen (Somia & Verma 2000):

1. Einfache, effiziente und reproduzierbare Herstellung:

Der Vektor sollte reproduzierbar und stabil in hohen Titern ($>10^8$ Partikel pro ml Vektorsuspension) herzustellen sein, um eine unkomplizierte klinische Applikation zu ermöglichen. Dies setzt auch die Möglichkeit der Aufkonzentrierung und Lager- bzw. Transportfähigkeit voraus.

2. Dauerhafte oder regulierbare Transkription zur Kontrolle der Transgen-Expression:

Die Expression der viral applizierten Gene sollte möglichst lange andauern oder aber exakt regulierbar sein, da unterschiedliche Krankheiten auch unterschiedliche Anforderungen an den Vektor stellen. Beispielsweise bedarf es bei der Therapie des Diabetes mellitus einer regulierbaren Expression, im Gegensatz zur Notwendigkeit einer konstanten lebenslangen Expression bei der Therapie der Hämophilie A oder B.

3. Immunologisch inert:

Käme es bei der Transduktion zu einer humoralen Immun-Antwort, würde sich dies nachteilig auf die Effizienz nachfolgender Transduktionen auswirken. Eine zelluläre Immunantwort hätte die Zerstörung der mit dem therapeutischen Gen transduzierten Zellen und somit des therapeutischen Erfolges zur Folge.

4. Gewebe- bzw. Zell-spezifischer Gentransfer:

Die zu transduzierenden Zellen sind teilweise innerhalb eines Gewebes oder im gesamten Körper verteilt, wie z.B. in heterogenen Geweben wie etwa dem Gehirn, oder dem hämatopoietischen System. Hier ist eine gezielte Transduktion der Zielzellen von besonderer Bedeutung, da man vermeiden sollte, dass durch die Transduktion von z.B. den Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, eine unerwünschte Immunantwort ausgelöst wird.

5. Hohe Verpackungskapazität des Vektors:

Der Vektor sollte ein uneingeschränktes Potenzial („ohne Limit“) für die Größe des therapeutischen Gens haben, welches von 350 Basenpaaren, z.B. für Insulin, bis hin zu mehr als 12.000 Basenpaaren, z.B. für Dystrophin, reichen kann.

6. Fähigkeit der zielgerichteten Integration ins Wirtsgenom bzw. stabiles episomales Stadium:

Der Vektor sollte in der Lage sein, Sequenz-spezifisch und gerichtet in das Genom der Zielzellen zu integrieren. Dadurch könnte der Expressions-Level des therapeutischen Gens durch die endogenen regulatorischen Regionen übernommen werden und die Expression unter physiologischen Bedingungen erfolgen. Bei Applikationen, bei denen eine von der Zelltyp-spezifischen Regulation

unabhängige stabile konstitutive Expression des Transgens gewünscht ist, wäre die episomale Etablierung des Vektors von Vorteil. Hier würde der Vektor bei der Zellteilung ebenfalls dupliziert und gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt.

7. Infektion mitotischer und ruhender Zellen:

Da eine große Anzahl an Zelltypen im adulten System sich nicht mehr teilen, wie z.B. Neuronen, Leber- und Muskelzellen, sind Vektoren mit der Fähigkeit, auch nicht-teilungsaktive Zellen effizient zu infizieren, wünschenswert.

Derzeit besitzt kein gentherapeutischer Vektor alle diese Eigenschaften, jedoch ist jede Anforderung einzeln in den verschiedenen Gentransfersystemen erfüllt.

2.2 Pseudotypisierung

Die Inkorporation von Oberflächenglykoproteinen beim Zusammenbau behüllter Viren an der Zelloberfläche scheint sowohl spezifisch als auch unspezifisch abzulaufen. Nicht-spezifisch dahingehend, dass bei einer Doppelinfektion einer Zelle durch zwei nicht verwandte Viren, Nachkommenviren entstehen können, die nicht das artspezifisch-eigene, stattdessen aber das fremde Hüllglykoprotein inkorporiert haben. Dieses Phänomen wird auch als Pseudotypisierung bezeichnet. Bei der spezifischen Inkorporation werden Zelloberflächenproteine der Wirtszelle als fremd erkannt und von der Inkorporation in das ausknospende Virus ausgeschlossen^{22,198}. Durch den natürlichen Prozess der Pseudotypisierung können nun Viren entstehen, die aufgrund ihrer veränderten Hülle, einen neuen Tropismus aufweisen. Durch Zuhilfenahme gentechnischer Methoden kann dieses Prinzip nun zur gezielten Veränderung des Tropismus von retro- als auch lentiviralen Gentransfer-Systemen eingesetzt werden, da die unterschiedlichen Hüllglykoproteine der einzelnen Virusfamilien auch unterschiedliche Tropismus-Eigenschaften aufweisen.

So wird insbesondere bei retroviralen Systemen, die auf MoMLV basieren, in der Regel das originale Hüllglykoprotein ersetzt, da es von einem Rezeptor (Rec-1, einem Transporter für basische Aminosäuren) erkannt wird, der nur bei Mäuse- und Rattenzellen vorkommt^{2,82,186}. Aber auch bei lentiviralen Systemen, basierend z.B. auf FIV und HIV, werden die endogenen Hüllglykoproteine ersetzt, denn diese Systeme zeigen einen natürlichen starken Tropismus für die T-Zellen ihres jeweiligen Wirtes^{23,134,189}. Hierbei wird zum einen auf Hüllproteine anderer Retroviren, beispielsweise das amphotrope Hüllprotein des endogenen Maus-Retrovirus 4070A^{144,149}, das Hüllprotein des Gibbon Ape Leukemia Virus (nur in modifizierter Form und nur bei HIV)¹⁶⁵ oder aber auch auf Hüllproteine nicht-verwandter Viren zurückgegriffen. Hier ist in erster Linie das Hüllglykoprotein (G) des Vesi-

kulären Stomatitis Virus (VSV) zu nennen, das pantrope Eigenschaften hat^{26,75,140}. Die Gemeinsamkeit dieser Hüllproteine besteht darin, dass die zugehörigen Rezeptoren unter anderem auch bei humanen Zellen vorkommen und somit eine retroviral-vermittelte Transduktion dieser Zellen ermöglichen.

2.3 Gewebespezifischer Gentransfer

Retro- und lentivirale Vektorsysteme, bei denen Hüllproteine wie VSV-G eingesetzt werden, eignen sich aufgrund der fehlenden Zelltypspezifität lediglich für einen *ex vivo* Gentransfer, bei dem die zu transduzierenden Zellen zunächst aus dem Zielgewebe isoliert werden müssen bevor die Transduktion stattfinden kann. Bei einem *in vivo* Gentransfer mit solchen Vektoren kann eine Transduktion von Zelltypen, die nicht den Zielzellen entsprechen, zum einen zu schädlichen Effekten führen (z.B. starken Immunreaktionen) und zum anderen die therapeutische Wirkung des Vektors sowie dessen Dosisseffekt verändern. Daher würde ein gewebespezifischer Gentransfer für einen entsprechenden Zelltyp bzw. das entsprechende Gewebe diese möglichen Risiken reduzieren und gleichzeitig eine niedrigere zu applizierende Vektordosis erlauben. Aus diesem Grund wurde mit unterschiedlichen Vektorsystemen experimentiert, um deren Tropismus zu modifizieren^{124,135}. Hierfür wurden verschiedenste Möglichkeiten in Betracht gezogen, wie etwa eine nachträgliche Modifizierung der aufgereinigten Vektoren mittels Verknüpfung von Liganden¹²³, die so dem Vektor seine neue Spezifität vermitteln sollen. Zwar kann damit eine gewisse Zellspezifität *in vitro* erreicht werden, aber die Stabilität eines solchen Komplexes wird nicht für *in vivo* Versuche ausreichen. Eine weitere Möglichkeit, den viralen Hüllglykoproteinen einen spezifischen Tropismus zu verleihen, kann durch das gezielte Einbringen von Liganden mittels gentechnischer Methoden in das jeweilige Hüllglykoprotein selbst geschehen, sodass alternative zelluläre Rezeptoren angesteuert werden können. Zusätzlich zu den bisher genannten Möglichkeiten wurden auch Fusionsproteine aus viralen Hüllglykoproteinen und gewebespezifischen Antikörpern^{108,159} eingesetzt. Zwar zeigten diese modifizierten Vektoren einen veränderten Tropismus, wiesen aber auch zu niedrige Titer im Vergleich zu den Ausgangsvektoren auf.

Eine alternative Strategie, viralen Vektoren einen entsprechenden Gewebetropismus zu verleihen, kann auf transkriptioneller Ebene durch den Einsatz gewebespezifischer Promotoren erfolgen. Die Kombination beider Strategien trägt zur Sicherheit eines *in vivo* Gentransfers^{71,185}.

2.4 Leberspezifischer Gentransfer

Als Zielrezeptor für einen leberspezifischen Gentransfer eignet sich der ausschließlich von Hepatozyten exprimierte Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R)¹⁶³. Dieser Rezeptor, ein Typ II Membranprotein, ist ein Hauptbestandteil der Hepatozytenmembran und besteht aus einer H1 und der H2 Untereinheit, wobei zwei H1 Untereinheiten und eine H2 Untereinheit ein funktionelles Trimer, den ASGP-Rezeptor, bilden¹⁴. Der ASGP-R vermittelt die Endozytose von Serumglykoproteinen, deren terminaler Sialinsäurerest der komplexen Zuckerseitenketten aufgrund von Alterungsprozessen entfernt wurde. Der Rezeptor erkennt terminale Galactose und N-Acetylgalactosaminreste und nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor wird der gesamte Komplex internalisiert. Einmal internalisiert wird der Komplex zu einem sortierenden Zellorganell wie dem Golgi-Apparat transportiert, wo Rezeptor und Ligand voneinander dissoziieren und der Rezeptor von dort aus wieder zur Zellmembran zurücktransportiert wird. In der Abbildung 2-6 ist die Wechselwirkung des ASGP-R mit desialysierten Glykoproteinen schematisch für das Sendai Virus Fusionsglykoprotein (SeV-F) gezeigt. Neben Sendai Virus¹⁰⁵ wurde eine Interaktion des ASGP-R auch mit einigen Hüllglykoproteinen von anderen Viren beschrieben, wie beispielsweise dem Marburg Virus (MBG)⁹ und dem Hepatitis B Virus (HBV)¹⁸⁰. Die entsprechenden Zuckerseitenketten der Hüllglykoproteine von SeV und MBG, über die eine postulierte Interaktion mit dem ASGP-R stattfindet, konnten charakterisiert werden^{55,196}, für das große Hüllglykoprotein von HBV (LHBs) werden analoge Strukturen postuliert¹⁸⁰. Diese Interaktion zwischen den Zuckerseitenketten und dem ASGP-R könnte die Basis für den postulierten Hepatotropismus der drei Viren darstellen.

seiner eigentlichen Funktion als Fusionsprotein offensichtlich auch als Ligand für den Hepatozyten-spezifischen ASGP-R fungiert, ergibt sich daraus die Fragestellung, ob SeV-F für einen lenti- bzw. retroviralen leberspezifischen Gentransfer genutzt werden kann.

2.5 Suizidgentherapie

Das Wirkungsprinzip der durch sogenannte Suizidgene kodierten Enzyme besteht in der Metabolisierung eines systemisch gegebenen ungiftigen Substrates, der sogenannten „*prodrug*“, in toxische Metabolite^{91,118}. Diese toxischen Metaboliten entstehen lokal in den Zellen, in die das Suizidgen eingeschleust wurde und töten diese nach Erreichen der letalen Dosis ab. Suizidgene stammen oft aus Viren, Bakterien und Pilzen, bei denen Stoffwechselwege vorkommen, die bei Säugetieren nicht vorhanden sind³⁹. Die am besten untersuchten Suizidgene für die Tumorthherapie sind die Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidin Kinase (HSV-1 TK) sowie die Cytosin Desaminasen aus Bakterien (*Escherichia coli*) (CD) und Bäcker-Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (*yeast-CD*, *YCD*). Verschiedene Aspekte der Suizidgentherapie werden derzeit untersucht, darunter zählen die Auswahl der geeigneten Suizidgene, der Gentransfervektoren sowie die Möglichkeiten einer gewebespezifischen Expression und wie im Rahmen dieser Arbeit die zielgerichtete Transduktion mit viralen Vektoren.

Das Substrat der HSV-1 TK ist die „*prodrug*“ Ganciclovir, ein Guanosinanalogon, das von zellulären Kinasen nicht metabolisiert und damit auch nicht phosphoryliert werden kann. Erst nach der Entstehung von Ganciclovir-Monophosphat können zelluläre Kinasen dieses zu Ganciclovir-Triphosphat weiter umwandeln. Dieses stellt ein Nukleotid-Analogon dar, das zur Hemmung der DNA-Synthese führt.

Das Wirkungsprinzip der Cytosin Deaminase ist in der Abbildung 2-7 gezeigt. Das von der Cytosin Deaminase aus 5-Fluorcytosin (5-FC) produzierte 5-Fluoruracil (5-FU) muss zur Ausübung eines cytotoxischen Effekts von zellulären Enzymen über mehrere Zwischenschritte in die aktiven Metaboliten 5-Fluoruridintriphosphat (5-FUTP) und 5-Fluor-Desoxyuridintriphosphat (5-FdUTP) konvertiert werden. 5-FUTP kann in die RNA und 5-FdUTP in die DNA inkorporiert werden und dadurch einen Abbruch der jeweiligen Synthese bewirken.

Die antitumorale Wirkung der Suizidgene kann durch den sogenannten „*Bystander*“-Effekt noch verstärkt werden. Darunter versteht man im Fall von CD die Diffusion der toxischen Metabolite aus der „*prodrug*“- exprimierenden Zelle in deren Nachbarzellen⁴², wo es ebenfalls zu einer Toxifizierung kommt^{70,93,120,181}. Bei der Verwendung von HSV-1 TK als Suizidgen treten phosphorylierte Zwischenprodukte auf, die nicht frei diffundieren können und stattdessen über Zell-Zell-Kanäle, den sogenannten „*gap-junctions*“, in die Nachbarzellen transportiert werden¹¹. Da diese

„gap-junctions“ in einigen Tumorarten herunterreguliert sind, ist der Einsatz der HSV-1 TK im Gegensatz zu der Verwendung von CD abhängig von der Biologie des jeweils vorliegenden Tumors

181

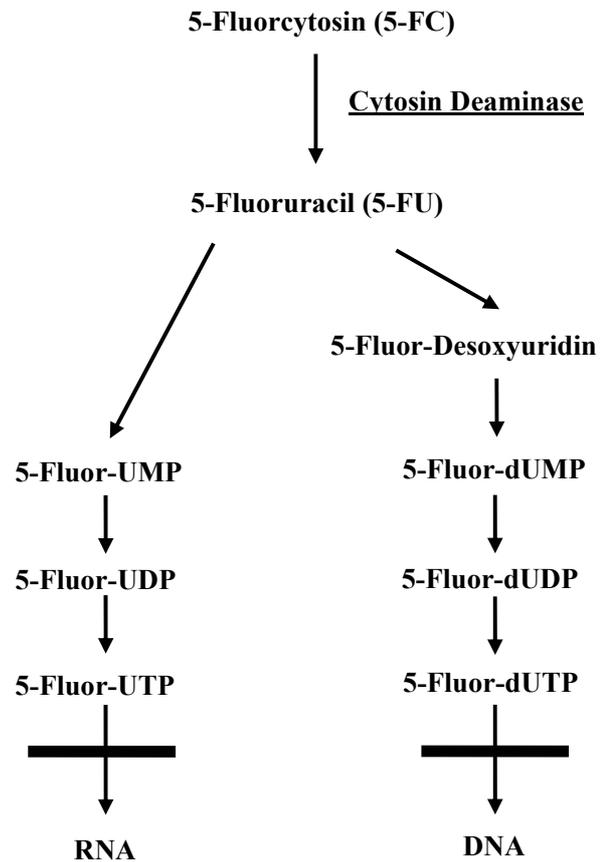


Abbildung 2-7: „Prodrug“-Toxifizierung durch das Suizidgenprodukt von CD bzw. YCD

2.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Mangelnde Transduktionseffizienz und Gewebespezifität gentherapeutischer Vektoren erweisen sich als größtes Hindernis für die gentherapeutische Behandlung von monogenetischen Lebererkrankungen. Daher ist eine Steigerung der Transduktionseffizienzen von teilungsinaktiven Hepatozyten unter Verwendung lentiviraler Vektoren das Ziel vieler Bemühungen. In dieser Arbeit sollte in Analogie zu den SeV-F-Pseudotypisierungsversuchen mit retroviralen MoMLV Vektoren ¹⁶¹ untersucht werden, inwieweit ein Einbau des Sendai-viralen Hüllglykoproteines SeV-HN und des teilweise modifizierten SeV-F in die Virushülle eines lentiviralen Vektors auf Basis von FIV zu realisieren ist. Hierbei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Modifikation von SeV-F gelegt. Des Weiteren sollte im Falle eines SeV-F Einbaus sowie dessen modifizierter Varianten überprüft werden, ob ein Gewebetropismus mit Spezifität für ASGP-R exprimierende Zellen, z.B. Hepatozyten, nachweisbar ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Generierung und Evaluation neuartiger MoMLV-basierter RCR-Vektoren zur Verbesserung der Effizienz der HCC-Suizidgentherapie. Die Zielstellung bestanden dabei darin,

1. den RCR-Vektoren nach Möglichkeit einen ASGP-R restringierten Tropismus zu verleihen (durch den Austausch des viralen amphotropen Hüllglykoproteingenes mit dem SeV-F Gen auf Vektor-genomebene), sowie
2. RCR-Vektoren zu erzeugen und hinsichtlich ihrer Toxifizierungseigenschaften zu evaluieren, die jeweils für das Suizidgen YCD oder einem chimären bifunktionalen Fusionsprotein aus YCD und der sogenannten Hefe-Uracilphosphoribosyltransferase (YUPRT), dem sogenannten SuperCD, kodieren.

3 Material & Methoden

3.1 Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben, stammen die verwendeten Chemikalien von E. Merck, Darmstadt. Alle Chemikalien besitzen mindestens den Reinheitsgrad „zur Analyse, ACS“; sofern erhältlich, wird der Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“ bzw. „für die Zellkultur“ verwendet.

Der Begriff „bidest. Wasser“ wird im folgenden für deionisiertes Wasser verwendet, dass zusätzlich über eine Milli-Q-Plus Filtrieranlage (Millipore) gereinigt wird. Als „steril“ oder „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien werden für 20 min bei 120 °C und 2 bar Überdruck autoklaviert (Stand-Autoklav FVD 3, Fedegari). Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen werden durch ein 0,22 µm Filter (Millex-GS, Millipore oder Falcon Bottle Top Filter, Becton Dickinson) filtriert.

3.2 Molekularbiologische Materialien und Methoden

Grundlage für die folgenden Arbeitsvorschriften stellen die entsprechenden Abschnitte aus den Referenzen ¹⁴⁶ bzw. ⁵ dar, gegebenenfalls modifiziert durch Hersteller-spezifische Empfehlungen.

3.2.1 Transformation von *Escherichia coli*

Im Gegensatz zu anderen Bakterien (z. B. *Bacillus subtilis*) nimmt *E. coli* spontan keine Fremd-DNA auf. Es existieren jedoch verschiedene Methoden, um *E. coli*-Zellen für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen. Im Rahmen dieser Arbeit werden für Transformationen entweder *E. coli* DH5α (Invitrogen) oder XL1-Blue (Stratagene) verwendet, die bereits kompetent vom Hersteller bezogen wurden, oder aber *E. coli* XL1-Blue, die mit Hilfe der FSB-Methode nach ⁶² kompetent gemacht werden.

Materialien:

- Bakterien: *E. coli* XL1-Blue (Stratagene)
- FSB-Transformationspuffer, bestehend aus:
 - 10 mM CH₃COOK,
 - 100 mM KCl,
 - 45 mM MnCl₂·4H₂O,
 - 10 mM CaCl₂·2H₂O,
 - 3 mM Co(NH₃)₆Cl₃;
 der pH-Wert der Lösung wird auf 6,4 mit 0,1 M HCl eingestellt. Anschließend wird die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.
- DMSO (Sigma)
- SOB-Medium:
 - 10 g Select-Pepton (Invitrogen),
 - 2,5 g Hefe-Extrakt (Invitrogen),
 - 295 mg NaCl,
 - 95 mg KCl,
 werden in bidest. Wasser gelöst und der pH mit 1 M HCl auf 6,8–7,0 eingestellt und das Volumen auf 490 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C werden noch 10 ml 1 M MgSO₄-Lösung (s. u.) zugesetzt.

- 1 M MgSO₄-Lösung, steril:
250 g MgSO₄·6H₂O werden unter Erwärmen in bidest. Wasser gelöst, das Volumen auf 125 ml eingestellt und sterilfiltriert.
- SOC-Medium:
2 g Select-Pepton,
500 mg Hefe-Extrakt,
59 mg NaCl,
19 mg KCl,
werden in bidest. Wasser gelöst und der pH mit 1 M HCl auf 6,8–7,0 eingestellt und das Volumen auf 97 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C werden noch 2 ml MgSO₄-Lösung (s. o.) und 1 ml Glucose-Lösung (s. u.) zugesetzt.
- 2 M Glucose:
36 g Glucose werden in bidest. Wasser gelöst, das Volumen auf 100 ml eingestellt, abschließend wird die Lösung sterilfiltriert.
- Ampicillin-Lösung, 25 mg/ml zur Selektion:
10 g Ampicillin Natriumsalz (Sigma) werden in 400 ml bidest. Wasser gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C (Vorratslösung) bzw. bei 4 °C (Gebrauchslösung) aufbewahrt.
- LB-Platten mit Antibiotikum zur Selektion:
10 g Select-Pepton,
5 g Hefe-Extrakt,
10 g NaCl,
werden in bidest. Wasser gelöst und der pH mit 5 M NaOH auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wird mit 15 g Bacto Agar versetzt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C werden 4 ml Ampicillin-Lösung zugesetzt, sodass die Konzentration an Antibiotikum 100 µg Ampicillin/ml Medium beträgt.

Protokoll zur Herstellung kompetenter Bakterien:

- Einen Tag vor der eigentlichen Durchführung werden 50 µl einer *E. coli* XL1-Blue Glycerolkultur auf eine LB-Platte so ausgestrichen, dass Einzelkolonien erhalten werden.
- Mit einer Einzelkolonie werden 10 ml SOB-Medium angeimpft.
- Mit dieser Kultur werden 100 ml SOB-Medium beimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 0,5 angezogen. Die Kultur wird aliquotiert, in vorgekühlte 50 ml Falcon-Polypropylenröhrchen (Falcon-Röhrchen) überführt und für 10 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend werden die Bakterien für 10 min mit 3400×g (Heraeus Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor 8250) bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt.
- Dann werden die Bakterien in 20 ml eiskalter FSB-Lösung (je Falcon-Röhrchen) resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien werden für 10 min auf Eis inkubiert.
- Die Bakterien werden erneut zentrifugiert (s. o.), der Überstand vollständig entfernt und in 4 ml eiskalter FSB-Lösung (je Falcon-Röhrchen) resuspendiert.
- Die resuspendierten Zellen werden mit je 140 µl DMSO vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Ansätze nochmals mit je 140 µl DMSO vorsichtig gemischt, auf Eis zurückgestellt und sofort in vorgekühlte, sterile 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert (je 200 µl) und bei -80 °C gelagert.

Protokoll für die Transformation:

- Die bei -80 °C gelagerten, kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut. Sobald die Bakterien aufgetaut sind, werden je Transformationsansatz 50 µl Bakteriensuspension in vorgekühlte Falcon-Röhrchen aliquotiert.
- Die Transformationsansätze werden mit der gewünschten DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert.
- Dann erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec (Wasserbad).
- Die Ansätze werden 2 min im Eisbad abgekühlt.
- Alle Ansätze werden mit 950 µl SOC-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C mit 250 Upm im Bakterienrüttler (New Brunswick Scientific) inkubiert.
- Je 100 µl der Transformationsansätze werden auf LB-Agarplatten, die das geeignete Selektionsantibiotikum enthalten, ausgestrichen.
- Die verbleibenden 900 µl der Ansätze werden für 5 min mit 3400×g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterien-Sediment in je 100 µl frischem SOC-Medium resuspendiert und ebenfalls auf LB-Agarplatten ausgestrichen.
- Die LB-Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert (Heraeus-Inkubator VT5042).

3.2.2 Anlegen von Glycerolkulturen

Zur Aufbewahrung von Bakterienkulturen über längere Zeiträume müssen Dauerkulturen angelegt werden. In Glycerol-haltigem Medium lassen sich Bakterien bei tiefen Temperaturen praktisch unbegrenzt lagern, ohne dass ihre Vitalität verlorengeht.

Durchführung:

- Je 850 µl der aufzubewahrenden Bakterienkulturen werden mit je 150 µl sterilem Glycerol gemischt und in sterilen 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C bzw. -80 °C aufbewahrt.
- Zum Animpfen wird mit einer Impföse ein kleiner Teil der gefrorenen Glycerolkultur abgenommen und in das gewünschte Medium überführt oder auf eine Agarplatte ausgestrichen.

3.2.3 Plasmidpräparationen

Beiden im folgenden beschriebenen Methoden liegt dasselbe Prinzip zugrunde: Nach Anzucht im geeigneten Selektionsmedium werden die Bakterien, die das gewünschte Plasmid replizieren, durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und einer alkalischen Lyse mit NaOH/SDS unterworfen¹³. Dies führt zum Platzen der Zellen und zur Denaturierung der bakteriellen Proteine. Sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA werden freigesetzt und ebenfalls denaturiert. Anschließend erfolgt die Neutralisierung des alkalischen Lysats unter Hochsalzbedingungen. Hierbei renaturiert die Plasmid-DNA, während alle anderen makromolekularen Komponenten als Präzipitat ausfallen.

Puffer für die alkalische Lyse (Qiagen):

- Resuspendierungspuffer P1:
50 mM Tris-HCl,

10 mM EDTA,
100 µg/ml RNase A; pH 8,0

- Lysepuffer P2:
200 mM NaOH,
1 % SDS
- Neutralisierungspuffer P3:
3 M Kaliumacetat; pH 5,5

3.2.3.1 Mini-Präparationen zur Charakterisierung transformierter Bakterien

Bei den Mini-Präparationen wird auf eine weitere Reinigung des Lysats verzichtet, da für Kontrollverdau-Ansätze mit Restriktionsenzymen die Reinheit der so gewonnenen Plasmid-DNA ausreicht.

Materialien:

- LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum:
10 g Select-Pepton,
5 g Hefe-Extrakt,
10 g NaCl
werden in 950 ml bidest.Wasser gelöst und der pH mit 5 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Dann wird auf 1 l aufgefüllt und die Lösung autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C werden 2 ml Ampicillin-Lösung zugesetzt, sodass die Konzentration an Antibiotikum 100 µg Ampicillin/ml Medium beträgt.
- Ethanol, 100 %
- Ethanol, 70% (w/v)

Durchführung:

- Je 7 ml LB-Medium, die das geeignete Selektions-Antibiotikum enthalten, werden mit einer Einzelkolonie angeimpft.
- Die Kulturen werden über Nacht bei 37 °C mit 250 Upm im Bakterenschüttler inkubiert.
- Je 1,5 ml der Übernacht-Kultur werden in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 5 min mit 1500×g bei 4 °C (Heraeus Biofuge 15 R mit Winkelrotor HFA 14.2) zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt und die Bakterien-Sedimente in je 200 µl P1 resuspendiert.
- Dann werden je 200 µl P2 zugegeben, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach Zugabe von 200 µl P3 wird für 20 min mit 18000×g bei 4 °C (Heraeus Biofuge 15 R mit Winkelrotor HFA 14.2) zentrifugiert.
- Die Überstände werden in frische 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zur DNA-Fällung mit je 1,5 ml kaltem Ethanol versetzt und für 30 min mit 18000×g bei 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt, je 500 µl kaltes Ethanol (70 %) zugegeben (Salzentfernung) und für 5 min mit 18000×g bei 4 °C zentrifugiert.

- Der Überstand wird abgesaugt, die gefällte DNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Ethanolreste verdunsten zu lassen; abschließend wird die DNA in je 20 µl sterilem bidest. Wasser gelöst.

3.2.3.2 Maxi- und Mega-Präparationen zur Plasmidgewinnung

Bei diesem Verfahren erfolgt die Reinigung der Plasmid-DNA mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule (Qiagen). Aufgrund der hohen Ladungsdichte des Säulenmaterials kann doppelsträngige Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen bei neutralem bis schwach alkalischem pH-Wert selektiv eluiert werden (Qiagen GmbH, Hilden).

Materialien:

- TB-Medium mit Selektions-Antibiotikum:
12 g Select-Pepton,
5 g Hefe-Extrakt,
4 ml Glycerol,
werden in bidest. Wasser gelöst, das Volumen auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums setzt man 100 ml sterile Kaliumphosphat-Lösung (s. u.) sowie 2 ml Ampicillin-Lösung zu.
- Kaliumphosphat-Lösung für TB-Medium:
125,4 g K_2HPO_4 ,
23,1 g KH_2PO_4 ,
werden in bidest. Wasser gelöst, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Die Lösung ist 0,72 M bezüglich K_2HPO_4 und 0,17 M bezüglich KH_2PO_4 .
- Anionenaustauscher-Säulen Qiagen-tip 500 und 2500
- Äquilibrationpuffer QBT:
750 mM NaCl,
50 mM MOPS,
15 % Ethanol,
0,15 % Triton X-100; pH 7,0
- Waschpuffer QC:
1 M NaCl,
50 mM MOPS,
15 % Ethanol; pH 7,0
- Elutionspuffer QF:
1,25 M NaCl,
50 mM Tris-HCl,
15 % Ethanol; pH 8,5
- Isopropanol
- Ethanol, 70 % (w/v).
Alle Puffer (QBT, QC und QF) sind Bestandteil des Qiagen Maxi/Mega Kits der Fa. Qiagen.

Durchführung:

Im folgenden bezieht sich der erste Zahlenwert immer auf Maxi-Präparationen, der zweite Zahlenwert auf Mega-Präparationen:

- 125 ml/250 ml TB-Medium, die das geeignete Selektionsantibiotikum enthalten, werden mit 125 µl/250 µl Übernacht-Kultur oder Glycerolkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 225 Upm im Bakterien-schüttler inkubiert.
- Die Übernacht-Kultur wird für 20 min mit 3400 ×g (Heraeus Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor) bei 4 °C zentrifugiert.
- Das Bakterien-Sediment wird in 10 ml/50 ml P1 resuspendiert.
- Es wird 10 ml/50 ml P2 zugesetzt, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Dann werden 10 ml/50 ml P3 zugesetzt, gemischt und für 20 min/30 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird für 30 min mit 28000 ×g (Heraeus Suprafuge 22 mit Ausschwingrotor HSA 13.94) bei 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird durch ein Stück Verbandsgaze auf eine mit 10 ml/35 ml QBT äquilibrierte Qiagen-tip 500/2500 Säule aufgetragen.
- Dann wird die Säule zweimal/viermal mit 30 ml/50 ml QC gewaschen.
- Die Elution erfolgt mit 15 ml/35 ml QF.
- Die Fällung der DNA erfolgt durch Zusatz von 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol. Der Ansatz wird zum Sedimentieren der DNA für 30 min mit 28000 ×g bei 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt, das Sediment mit 5 ml Ethanol (70 %) zur Salzentfernung versetzt und für 15 min mit 28000 ×g bei 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt, die gefällte DNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Ethanolreste verdunsten zu lassen, abschließend wird die DNA in 200 µl/1 ml sterilem bidest. Wasser gelöst.
- 1,5 µl der DNA-Lösung werden mit 148,5 µl bidest. Wasser versetzt und der DNA-Gehalt spektrometrisch bestimmt (siehe 3.2.4).

3.2.4 Spektrometrische Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption der Purin- und Pyrimidin-Basen im Bereich von 260 nm ausgenutzt. Hierbei ist zu beachten, dass Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA und Einzelstrang-Oligonucleotide infolge des unterschiedlichen Ausmaßes der Basenstapelung verschiedene Extinktionskoeffizienten besitzen. Eine Extinktion von 1 entspricht bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml, bei Einzelstrang-DNA ca. 40 µg/ml und bei Einzelstrang-Oligonucleotiden ca. 20 µg/ml. Zur Bestimmung sehr kleiner DNA-Mengen ist die Methode nicht geeignet; die Meßlösung muss mindestens 0,25 ng/µl DNA enthalten. Ein Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA-Lösung ist eine zweite Extinktionsmessung bei 280 nm, bei der die aromatischen Reste von

Proteinen stark absorbieren. Gereinigte DNA Lösungen sollten ein E_{260}/E_{280} -Verhältnis im Bereich von 1,8–2,0 aufweisen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung^c mit Proteinen oder Phenol hin.

Durchführung:

- Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit einem programmierbaren UV/VIS Spektrophotometer (Beckman DU-640) in einer Vierfach-Mikroküvette aus Quarzglas (Beckman).
- Leerwertbestimmung und Küvettenabgleich: Die Extinktionswerte von $4 \times 150 \mu\text{l}$ bidest. Wasser werden bei 260 nm und 280 nm gemessen, die Meßwerte der ersten Kammer als Nullpunkt gesetzt und die übrigen Werte zum Abgleich auf den Nullpunkt verwendet.
- Je $1,5 \mu\text{l}$ der zu bestimmenden DNA-Lösung werden mit bidest. Wasser auf $150 \mu\text{l}$ aufgefüllt und in die Kammern 2–4 der Küvette überführt. In der ersten Kammer verbleibt die Wasserprobe als Referenzwert.
- Dann erfolgt die Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm in allen vier Kammern. Das Meßergebnis wird vom Gerät sowohl als Absorption bzw. Absorptionsverhältnis, als auch als Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ausgegeben, wobei die $100\times$ -Verdünnung der Meßlösungen bereits berücksichtigt ist.

3.2.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Je nach Enzym variiert die Pufferzusammensetzung und Temperatur, bei der die Reaktion optimal (bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit) abläuft. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen, einschließlich der dazu passenden Reaktionspuffer, stammen von Boehringer Mannheim.

Materialien:

- Restriktionsendonukleasen, $10 \text{ U}/\mu\text{l}$
- SuRE/Cut Reaktionspuffer

Durchführung:

- Für einen analytischen Restriktionsverdau werden $0,2\text{--}1 \mu\text{g}$ DNA eingesetzt.
- Die DNA-Lösung wird mit $1 \mu\text{l}$ des für das jeweilige Restriktionsenzym notwendigen Reaktionspuffers ($10\times$) versetzt und mit sterilem bidest. Wasser auf $9,5 \mu\text{l}$ aufgefüllt.
- Dann erfolgt der Zusatz des Restriktionsenzym (0,5 μl , entspricht 5 U) und der Ansatz wird für 2 h bei 37°C inkubiert.

3.2.6 Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA

Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen linearer DNA wird Alkalische Phosphatase aus *Pandalus borealis*, einer Tiefseegarnelenart, verwendet (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP). Im Gegensatz zur häufig benutzten Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP) ist SAP (bei vergleichbarer Aktivität) leicht

^c Es ist weiterhin zu beachten, dass das E_{260}/E_{280} -Verhältnis auch pH-abhängig ist. Bei Resuspendierung gereinigter DNA in TE-Puffer (pH 7,5) erhält man in aller Regel die oben genannten Werte. Wird dagegen reines bidest. Wasser (pH < 7,0) verwendet, so erhält man etwas kleinere Werte, die zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

inaktivierbar (hierzu wird der Ansatz für 15 min auf 65 °C erhitzt), sodass die sonst üblichen Inaktivierungs- und Extraktionsschritte entfallen (USB/Amersham Life Science).

Materialien:

- SAP, 1 U/μl (USB) in:
25 mM Tris-HCl, pH 7,5,
1 mM MgCl₂,
0,1 mM ZnCl₂,
50 % Glycerol
- Dephosphorylierungspuffer, 10× (USB):
200 mM Tris-HCl,
100 mM MgCl₂
- SAP-Verdünnungspuffer (USB):
50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Durchführung:

- Der Reaktionsansatz wird mit 1/10 Volumen Dephosphorylierungspuffer und mit der erforderlichen Menge SAP versetzt. Hierbei werden für 1 pmol DNA-Enden folgende Mengen eingesetzt: 0,1 U für 5'-überhängende Enden, 0,2 U für glatte Enden, 0,5 U für 3'-überhängende Enden. Der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Inaktivierung: Der Reaktionsansatz wird 15 min bei 65 °C inkubiert. Der Ansatz kann direkt für weitere Reaktionen (z. B. Ligationen) eingesetzt werden.

3.2.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 0,5–10 kb eignen sich einprozentige Agarosegele, die sowohl für analytische als auch präparative Auftrennungen verwendet werden können.

Materialien:

- SeaKEM GTG Agarose (FMC BioProducts)
- Ethidiumbromid-Lösung, 10 mg/ml
- TAE-Puffer, 50×:
242 g Tris-Base,
57,1 ml Eisessig,
100 ml 0,5 M EDTA; pH 8.0
werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Zur Verwendung wird der Puffer 1:50 mit bidest. Wasser verdünnt. TAE, 1× kann mehrfach verwendet werden.
- Probenauftragungspuffer, 10×:
In 5 ml bidest. Wasser werden jeweils 20 mg (d. h. 0,4 % (w/v)) der folgenden Farbstoffe gelöst:

Bromphenolblau (Sigma),
Xylen-Cyanol FF (Sigma),
Orange-G (Sigma),
sowie 1 g (d. h. 20 %) Ficoll 400 (Pharmacia Biotech).

Die Aufbewahrung erfolgt bei 4 °C. Der Auftragspuffer hat drei Funktionen:

1. Er erhöht die Dichte der Probe und stellt damit sicher, dass die DNA in die Probentasche einsinkt.
 2. Er färbt die Probe und erleichtert damit die Beladung des Gels.
 3. Er enthält Farbstoffe, die mit reproduzierbarer Geschwindigkeit zur Anode wandern.
- Molekulargewichtsmarker X (Boehringer Mannheim) oder 1 kb-Leiter (Invitrogen):
200 µl Molekulargewichtsmarker (enthält 0,25 µg/µl DNA) werden mit dem gleichen Volumen Probenauftragspuffer versetzt. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4 °C. Zum Gebrauch werden 2 µl des Gemischs mit bidest. Wasser auf 10 µl aufgefüllt.

Durchführung:

- Gießen des Gels (1 % Agarose): 1 g Agarose wird mit 100 ml TAE-Puffer, 1× versetzt und im Mikrowellenherd erhitzt, bis eine klare Lösung entsteht. Die Lösung wird mit 5 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in eine Flachbettkammer (Owl Scientific bzw. Stratagene) der gewünschten Größe ausgegossen.
- Probenvorbereitung: Die aufzutragenden Proben werden mit je 1 µl Probenauftragspuffer versetzt und mit bidest. Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben und die Marker-Gebrauchslösung werden in die Taschen des Gels gegeben.
- Gel-Lauf: Die Auftrennung erfolgt bei konstanter Spannung (80 V für 90 min oder 20 V über Nacht) bei einer Stromstärke von maximal 350 mA (Power Pac 300, Bio-Rad). Zur Fotodokumentation (Polaroid-Sofortbildkamera MP4 oder Pharmacia Biotech Image Master) kann die Elektrophorese jederzeit unterbrochen werden. Die Fluoreszenz-Anregung der gefärbten DNA erfolgt mit langwelligem UV-Licht (312 nm, UV-Leuchttisch Bachofer). Bei präparativen Auftrennungen (s. u.) wird die DNA dem UV-Licht möglichst wenig ausgesetzt, um Schädigungen zu vermeiden.

3.2.8 Reinigung von DNA aus präparativen Agarosegelen

Die angewandte Methode zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen beruht auf der Fähigkeit von Silicagel (in wässriger Suspension, sog. „Glasmilch“), in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze, wie z. B. Natriumiodid, DNA zu adsorbieren. Zunächst wird das Agarosegelstück, welches die DNA enthält, ebenfalls mit Hilfe des chaotropen Salzes, das die Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckereinheiten des Agarosepolymers zerstört, solubilisiert. Die hohe Salzkonzentration führt weiterhin dazu, dass eventuell gebundene Proteine von der DNA abdissoziieren. Die Elution erfolgt durch Absenken der Ionenstärke und Erhöhung der Temperatur.

Materialien:

Folgende Materialien sind Bestandteil des „GeneClean II Kit“ (Bio 101 Inc.) zur Reinigung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von mehr als 500 bp:

- 6 M Natriumiodid-Lösung (NaI)
- NEW Waschlösung:

14 ml NEW Konzentrat werden mit 280 ml bidest. Wasser vermischt. 310 ml absoluter Ethanol werden hinzugefügt, die Lösung gut gemischt und bei -20 °C gelagert. Die NEW Waschlösung enthält Tris-HCl und Tris-Base, sodass der pH-Wert je nach Temperatur zwischen 7,0 und 8,5 liegt.

- Glasmilch:

Silica-Matrix, suspendiert in bidest. Wasser; Bindungskapazität: 1–2 µg DNA/µl Glasmilch.

Durchführung:

- Die DNA wird mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.7) aufgetrennt.
- Die gewünschte Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück gewogen.
- Nach Zugabe des dreifachen Gelvolumens (wobei 1 g Agarose als 1 ml gerechnet wird) an NaI-Lösung wird das Gemisch so lange bei 45 °C–55 °C inkubiert, bis sich das Gelstück vollständig aufgelöst hat.
- Vor Zugabe der Glasmilch, muss die Silica-Matrix vollständig resuspendiert werden. Zu Lösungen, die 5 µg DNA oder weniger enthalten, gibt man 5 µl Glasmilch. Für jedes weitere Mikrogramm DNA wird die zuzugebende Menge um 2 µl erhöht. Die Bindung der DNA an die Silica-Matrix benötigt auf Eis 15 min bis 1 h, wobei die Glasmilch zwischendurch immer wieder aufgeschüttelt werden sollte, um den Kontakt zwischen zu bindender DNA und den Partikeln zu gewährleisten.
- Anschließend wird die Glasmilch in einer Tischzentrifuge 2 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und zunächst aufgehoben.
- Die Glasmilch wird im 10–50× Volumen NEW Waschlösung vorsichtig (um Strangbrüche bei langen DNA-Molekülen zu vermeiden) resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert; dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.
- Nach dem letzten Waschschrift wird die Glasmilch 10 min unter Vakuum getrocknet, um Ethanolreste zu entfernen.
- Die Silica-Matrix wird schließlich in 1–2 Glasmilch-Volumen bidest. Wasser aufgenommen und zur Elution bei 45–55 °C für 5 min inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wird der Überstand, der die DNA enthält, abgenommen und die Elution wiederholt.

3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente, wobei sowohl kohäsive als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden. Ebenso werden offene Phosphodiesterbindungen in einem Strang der Doppelhelix geschlossen. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Plasmiden sind verschiedene Faktoren zu beachten:

- Die Konzentration der eingesetzten Plasmid-DNA:

Ist die Absolut-Konzentration zu gering, so ist die Religation des Plasmids (also der intramolekulare Ringschluß) die bevorzugte Reaktion (sofern kompatible, phosphorylierte Enden vorliegen). Ist die Konzentration zu hoch, so bilden sich bevorzugt lineare Oligomere (intermolekulare Reaktion).
- Das Verhältnis von Plasmid-DNA zur einzufügenden Fragment-DNA:

Im Ligationsansatz sollte die Anzahl der einzufügenden Fragment-DNA-Moleküle mindestens doppelt so groß sein wie die Anzahl der linearisierten Plasmid-DNA-Moleküle, damit eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Verknüpfung von Plasmid und Fragment gegeben ist.

- Aus den beiden genannten Faktoren ergibt sich für den Reaktionsansatz folgende optimale Zusammensetzung:

Die Absolut-Konzentration an Plasmid-DNA sollte so hoch sein, dass die intermolekulare Reaktion leicht bevorzugt ist. Dieser Wert ist abhängig von der Größe der Plasmid-DNA und liegt beispielsweise für ein 6 kb-Plasmid bei ca. 50–100 ng/μl. Die Absolut-Konzentration an einzufügender Fragment-DNA sollte mindestens so hoch gewählt werden, wie oben angegeben.

Je nachdem wie das Plasmid und das einzufügende Fragment vorliegen, müssen verschiedene Strategien angewandt werden:

- Das einzufügende Fragment besitzt identische kohäsive Enden:

Hierbei muss das Plasmid nur mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut werden. Daher besitzt der linearisierte Vektor phosphorylierte kompatible Enden und wird in der Ligationsreaktion sehr leicht wieder recircularisiert. Um die unerwünschte Religation möglichst gering zu halten, wird der geschnittene Vektor vor der Ligation dephosphoryliert (siehe 3.2.6). Bei der Ligation des Vektors mit dem einzufügenden Fragment werden daher nur zwei Phosphodiesterbindungen geknüpft (zwischen den phosphorylierten 5'-Enden des Fragments und den 3'-OH-Enden des Vektors) und es verbleiben zwei Lücken (zwischen den dephosphorylierten 5'-Enden des Vektors und den 3'-OH-Enden des Fragments) im rekombinanten Plasmid, die erst nach der Transformation von bakteriellen Enzymen aufgefüllt werden (Phosphorylierung und anschließende Ligation). Weiterhin gibt es aufgrund der identischen kohäsiven Enden zwei mögliche Orientierungen für das einzufügende Fragment, die mit gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten und durch geeignete Methoden (z. B. asymmetrischer Restriktionsverdau) voneinander unterschieden werden müssen.

- Das einzufügende Fragment besitzt unterschiedliche kohäsive Enden:

Hierbei muss das Plasmid mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut werden, damit kompatible Enden für das Einfügen des Fragments vorliegen. Da der linearisierte Vektor damit unterschiedliche kohäsive Enden besitzt, ist die Religationsrate sehr gering und eine Dephosphorylierung nicht notwendig. Bei der Ligation von Vektor und Fragment werden daher vier Phosphodiesterbindungen geknüpft (alle 5'-Enden sind phosphoryliert) und es verbleiben keine Bindungslücken im rekombinanten Plasmid. Aufgrund der unterschiedlichen kohäsiven Enden sollte das Fragment nur in der gewünschten Orientierung eingefügt werden.

- Das einzufügende Fragment sowie der linearisierte Vektor besitzen glatte Enden:

Um Selbstligationen des Vektors zu minimieren, kann dephosphoryliert werden. Das Fragment kann in beiden Richtungen eingefügt werden, daher muss durch geeignete Methoden (z. B. asymmetrischer Restriktionsverdau) die Orientierung ermittelt werden. Im Vergleich zu den beiden erstgenannten Fällen verläuft die *blunt-end* Ligation mit geringer Effizienz. Da sich aber sowohl 5'-überhängende Enden als auch 3'-überhängende Enden in glatte Enden umwandeln lassen, erlaubt die *blunt-end* Ligation die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit ursprünglich inkompatiblen Enden.

Materialien:

- Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim), bestehend aus:

T4-DNA-Ligase, 5 U/μl,
Ligationspuffer, 2×: keine Zusammensetzung angegeben,
DNA-Verdünnungspuffer, 5×: keine Zusammensetzung angegeben

Durchführung^d:

- Linearisierter Vektor (in der Regel dephosphoryliert) und einzufügendes Fragment werden im gewünschten Verhältnis (1:3 bis 1:5) zusammengegeben, mit 2 µl DNA-Verdünnungspuffer versetzt und mit sterilem bidest. Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Gesamtmenge an eingesetzter DNA sollte 200 ng nicht übersteigen.
- Der Ansatz wird mit 10 µl Ligationspuffer 2× versetzt.
- Dann wird 1 µl T4-DNA-Ligase zugesetzt und der Reaktionsansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Maximal 2 µl des Ansatzes werden zur Transformation eines geeigneten *E. coli*-Stammes verwendet.

3.2.10 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine effiziente Methode, um ein spezifisches DNA-Segment selektiv zu amplifizieren. Eine thermostabile Polymerase (*Taq*-Polymerase) katalysiert nach dem Denaturierungs-Schritt und dem Hybridisieren der Primer an die DNA-Matrize (*Annealing*) die Verlängerung der Primer (*Extension*: DNA-Synthese). Durch die zyklische Anwendung von Denaturierung, *Annealing* und *Extension* gelingt die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments.

3.2.10.1 Primer-Design

Primer werden mit Hilfe des Programms PRIMER (Bestandteil der Sequenzanalyse-Software HUSAR, European Molecular Biology Laboratories, EMBL, Heidelberg) ausgewählt. Aufgrund der gewählten Programm-Parameter ist gewährleistet, daß:

- eine Dimer-Bildung der beiden Primer und die Sekundärstruktur-Bildung innerhalb eines Primers durch Selbst-Komplementarität unwahrscheinlich ist.
- der GC-Gehalt zwischen 40 % und 70 % liegt und dem GC-Gehalt der zu amplifizierenden Sequenz ähnlich ist.
- wenn möglich, die Sequenz so gewählt wird, daß die Stabilität des Primers am 5'-Ende größer ist als am 3'-Ende.
- die Schmelztemperatur (T_m , berechnet nach der „Nearest-Neighborhood“-Methode) der beiden Primer ähnlich ist (maximaler Unterschied: 1 °C) und bei ca. 60 °C liegt.
- die Länge der Primer 18–24 bp beträgt. Um nur ein einziges, spezifisches DNA-Fragment zu amplifizieren, sollte die Primer-Sequenz in der Probe nicht wiederholt vorhanden sein oder große Ähnlichkeit zu anderen Sequenzen besitzen.

Deshalb werden mit Hilfe der Algorithmen BLASTN und FASTA die Datenbanken des EMBL nach der Primer-Sequenz ähnlichen Sequenzen durchsucht. Nur bei negativem Suchergebnis wird der Primer tatsächlich in der PCR eingesetzt. Die Primer-Synthese erfolgt durch die Firmen Eurogentec oder Sigma ARK.

^d Die Vorschrift eignet sich sowohl für die Ligation kohäsiver Enden als auch für die Ligation glatter Enden (*blunt-end* Ligation).

3.2.10.2 PCR-Reaktion

Auf Grund des exponentiellen Charakters der PCR müssen selbst kleinste Verunreinigung von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes findet räumlich getrennt von dem Ort statt, an dem das PCR-Produkt analysiert wird, wobei ein hierfür reservierter Pipetten-Satz verwendet wird. Alle für die PCR bestimmten Reagenzien werden in Aliquots gelagert. Steriles ddH₂O wird ebenfalls nur einfach verwendet. Vermutlich mit PCR-Produkt verunreinigte Reagenzien werden ausgetauscht, verunreinigte Gegenstände werden mit UV-Licht bestrahlt oder mit 1 M HCl behandelt. Alle PCR Reaktionen, die nicht einer Klonierung dienen, werden mit herkömmlicher *Taq*-Polymerase durchgeführt. Präparative Amplifikationen zum Zweck einer Klonierung wurden dagegen mit dem Expand High Fidelity Polymerasen-Mix (Roche Diagnostics) angesetzt. Neben der herkömmlichen *Taq*-Polymerase zur DNASynthese ist *Pwo*-Polymerase enthalten, die mit ihrer 3' → 5'-Exonuclease-Aktivität fehlgepaarte Basen wieder entfernen kann und somit eine erheblich verbesserte Fehlerquote der PCR-Reaktion bewirkt.

Materialien:

- *Taq*-Polymerase, 5 U/μl (Qiagen), oder:
- Expand High Fidelity *Taq*-Polymerase PCR System, 3,5 U/μl (Roche Diagnostics)
- 10x PCR-Puffer (Qiagen):
enthält 15 mM MgCl₂, pH 8,7; keine genaue Angabe der Zusammensetzung
- 5x Q-Lösung (Qiagen):
enthält Betain, keine genaue Angabe der Zusammensetzung
- 25 mM MgCl₂ (Qiagen)
- 10 mM dNTP-Mix:
je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Biozym)
- spezifische Primer:
10 μM forward-Primer; 10 μM reverse-Primer
- steriles ddH₂O
- Filter-Pipettenspitzen (AGS bzw. Biozym)
- dünnwandige 0,2 ml-Reagenzgefäße (Biozym bzw. Roth)
- PCR-Gerät „Thermo-Cycler“: Gene-Amp 9700 (Perkin Elmer)

Komponenten	Reaktion im Ansatz	Volumen pro Endkonzentration
PCR-Mix:	10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl 1x
	5x Lösung Q (Qiagen)	10 µl 1x
	25 mM MgCl ₂	3 µl 1,5 mM
	10 mM dNTP-Mix	1 µl 200 µM
	10 µM forward-Primer	1 µl 0,2 µM
	10 µM reverse-Primer	1 µl 0,2 µM
	ddH ₂ O	29,5 µl - x µl -
DNA:	Plasmid bzw. genomische DNA	x µl Endvolumen: 50 µl
Enzym:	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Qiagen)	0,5 µl 2-5 U/50 µl

Tabelle 3-1: Zusammensetzung einer Standard-PCR-Reaktion

Programmschritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung der DNA:	1 min	94°C
3-Schritt PCR (Zahl der Zyklen: 22-40):	Denaturieren	30 sec 94°C
	<i>Annealing</i> ^e	30 sec 54-70°C
	<i>Extension</i>	0,5-3 min ^f 72°C
finale Elongation:	2-5 min	72°C

Tabelle 3-2: Ablauf des Standard-PCR-Programms

Nach Beendigung des PCR-Programms können die Proben über Nacht bei 4°C oder für längere Zeit bei -20°C gelagert werden.

Durchführung:

Für eine Standard-PCR-Reaktion werden die in Tabelle 3-1 angegebenen Komponenten in einem auf Eis vorgekühlten, dünnwandigen 0,2 ml-Reagenzgefäß in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Der PCR-Mix wird für alle Reaktionen, die unter den gleichen Bedingungen ablaufen sollen, gemeinsam in einem 1,5 ml-Reagenzgefäß angesetzt, gemischt und anschließend auf die einzelnen Reagenzgefäße verteilt. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionen wird durch Variation der MgCl₂-Konzentration (1,5-5,0 mM), den Einsatz verschiedener Puffer und die Zugabe optionaler Zusätze wie DMSO, Formamid, Triton X-100 oder Glycerol optimiert. Als Negativkontrolle dient eine Reaktion ohne DNA-Zusatz. Sofort nach der Zugabe der *Taq*-Polymerase werden die Proben in den „Thermo-Cycler“ gesetzt. Da der Deckel des Geräts beheizt ist und so ein Verdunsten der Proben verhindert, ist das Übersichten der Proben mit Mineralöl nicht nötig. Ein Standard-Programm für den „Thermo-Cycler“ ist in Tabelle 3-2 dargestellt. Ein Aliquot jedes PCR-Ansatzes wird zur Auswertung auf einem analytischen Agarose-Gel aufgetrennt.

3.2.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur zielgerichteten Einführung von Mutationen in die DNA-Sequenz eines Plasmids existieren verschiedene Methoden, wobei sich grob auf PCR-basierende und konventionelle Methoden unterscheiden lassen. Letztere sind mit dem Nachteil eines größeren Zeitaufwands und geringerer Effizienz behaftet, erlauben aber die Mutagenese größerer Plasmide im Vergleich zu PCR-Methoden. Bei der verwendeten Methode der „*QuikChange*[®] *Site-Directed Mutagenesis*“¹³², erhältlich als Kit der Firma Stratagene, entfällt zudem die Notwendigkeit, einzelsträngige DNA durch Subklonierung in M13-abgeleitete Vektoren zu erzeugen. Das doppelsträngige Plasmid, das die zu mutierende Sequenz enthält, wird zunächst denaturiert, um dann zwei zueinander komplementäre Oligonukleotid-Primer, die die

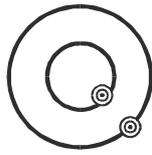
^e Für jedes Primer-Paar muss die optimale *Annealing*-Temperatur ermittelt werden.

^f Je nach Länge des PCR-Produktes; Faustregel: pro 1 kb Länge 1,5 min „Elongation“.

Material & Methoden

gewünschte Mutation tragen, an den jeweiligen Plasmideinzelsträngen binden zu lassen. Die Oligonukleotid-Primer werden im Rahmen der PCR-Zyklen durch die verwendete *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene) verlängert und damit gleichzeitig in den neu entstehenden DNA-Einzelstrang eingebaut, sodass ein mutiertes Plasmid entsteht mit einem parentalen und dem neu synthetisierten, offenen Einzelstrang. Im Anschluß an die PCR wird das Produkt mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I behandelt, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA (Zielsequenz: 5'-Gm6ATC-3') und damit die parentale nicht mutierte DNA verdaut. Plasmid-DNA, die aus beinahe allen *E. coli* Stämmen isoliert wurde, ist methyliert und somit zugänglich für den *Dpn* I Verdau. Die mutierte Vektor DNA wird im Anschluss an den Verdau in XL1-Blue superkompetente Zellen transformiert. Die erhaltenen Klone werden hinsichtlich der erhaltenen Plasmid-DNA charakterisiert. In Abbildung 3-1 ist der Ablauf der Mutagenese noch einmal schematisch zusammengefaßt.

Schritt 1
Plasmid-Präparation



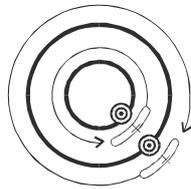
⊗ Ort der Mutagenese innerhalb eines Gens im Plasmid

Schritt 2
PCR-Mutagenese



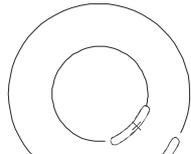
Mutagenese-Primer

Denaturierung und Anlagerung der Mutagenese-Primer (✂) mit der gewünschten Mutation (x)



Erweiterung und Einbau der Mutagenese-Primer unter Verwendung der *PfuTurbo* DNA Polymerase resultiert in offenen zirkulären Plasmid-DNA-Strängen

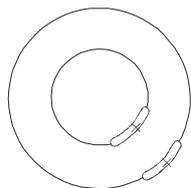
Schritt 3
Restriktionsverdau



mutiertes Plasmid (besitzt noch offene zirkuläre Stränge)

Verdau der methylierten, nicht mutierten parentalen DNA-Einzelstränge mit *Dpn I*

Schritt 4
Transformation



Transformation der *Dpn I* verdauten DNA in XL1-Blue superkompetente Zellen

XL1-Blue superkompetente Zellen reparieren die noch offenen Strangbrüche der mutierten Plasmid-DNA nach der Transformation



Abbildung 3-1: Ablauf der ortsgerichteten Mutagenese.

Materialien:

- QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), bestehend aus:

PfuTurbo DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)
10 \times Reaktionspuffer
Dpn I Restriktionsenzym (10 U/ μ l)
Oligonukleotide Kontrollprimer #1 [34-mer (100 ng/ μ l)]
5' CCA TGA TTA CGC CAA GCG CGC AAT TAA CCC TCA C 3'
Oligonukleotide Kontrollprimer #2 [34-mer (100 ng/ μ l)]
5' GTG AGG GTT AAT TGC GCG CTT GGC GTA ATC ATG G 3'
pWhitescript[™] 4.5-kb Kontrollplasmid (5 ng/ μ l)
dNTP Mix
XL1-Blue superkompetente Zellen (blaue Reaktionsgefäße)
pUC18 Kontrollplasmid (0.1 ng/ μ l in TE Puffer)

- NZY⁺-Medium:
5 g NaCl,
5 g Hefe-Extrakt,
10 g Casein,
werden in bidest. Wasser gelöst, auf 1000 ml aufgefüllt, sowie mit 10 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Die Lösung wird autoklaviert und nach dem Abkühlen werden die folgenden Mengen filtersterilisierter Zusätze zugefügt.

12.5 ml einer 1 M MgCl₂-Lösung
12.5 ml einer 1 M MgSO₄-Lösung
20 ml einer 20 % (w/v) Glukose-Lösung (oder 10 ml einer 2 M Glukose-Lösung)

- LB-Amp Agarplatten
- X-Gal (80 μ g/ml)
- IPTG (20 mM)

Durchführung:

- Die für die Mutagenese einzusetzende *Template*-DNA sollte aus einem DNA methylierenden *E. coli* Stamm zuvor isoliert werden.
- Zwei zueinander komplementäre Mutagenese-Primer, die die gewünschte Mutation tragen werden zur Synthese und Page-Aufreinigung (Firma: Eurogentec bzw. Sigma ARK) in Auftrag gegeben.
- Die Mutagenese-Reaktion sowie eine Kontrollreaktion[§] unter Verwendung des mitgelieferten Plasmids pWhitescript[™] und der Kontrollprimer #1 und #2 werden angesetzt:

Kontrollreaktion:

5 μ l 10 \times Reaktionspuffer
2 μ l (10 ng) pWhitescript 4.5-kb Kontrollplasmid (5 ng/ μ l)
1.25 μ l Oligonukleotide Kontrollprimer #1 [34-mer (100 ng/ μ l)]
1.25 μ l Oligonukleotide Kontrollprimer #2 [34-mer (100 ng/ μ l)]
1 μ l dNTP Mix

[§] Rückmutation eines Stop-Codons (TAA) innerhalb des *lacZ*-Genes in ein Glutamin-Codon (CAA) zur Ermöglichung einer Blau-Weiss-Selektion als Test für die Effizienz der Mutagenesereaktion.

mit ddH₂O auf 50 µl auffüllen
 1 µl *PfuTurbo* DNA Polymerase (2.5 U/µl)

Mutagenese-Reaktion:

5 µl 10× Reaktionspuffer
 X µl (5–50 ng) dsDNA (Template)
 X µl (125 ng) Mutagenese-Primer #1
 X µl (125 ng) Mutagenese-Primer #2
 1 µl dNTP Mix
 mit ddH₂O auf 50 µl auffüllen
 1 µl *PfuTurbo* DNA Polymerase (2.5 U/µl)

PCR-Parameter für die ortsgerechte Mutagenese, dargestellt in Tabelle 3-3:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	30 s
2	12-18	95 °C	30 s
		55 °C	1 min
		68 °C	1 min/kb Plasmidlänge

Tabelle 3-3: PCR-Parameter für die ortsgerechte Mutagenese

Für die Mutagenesereaktion wird die Extensionszeit der Größe des Plasmides entsprechend (1 min pro kb Plasmidlänge) angepasst (siehe Tabelle 3-3). Für die Kontrollreaktion wird eine Extensionszeit von 5 min gewählt. Maximal 20 Zyklen sind insgesamt für die Mutagenese ausreichend.

Nach der Mutagenesereaktion werden die Ansätze für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend kann ein Aliquot von 10µl auf einem 1 % Agarose-Gel aufgetragen werden, um die Effizienz der Reaktion zu überprüfen. Hierbei ist es nicht zwingend erforderlich, dass eine Amplifikatbande zu sehen ist, um mit dem *Dpn I* Restriktionsverdau und der Transformation der mutierten Plasmid-DNA fortzufahren.

Dpn I Restriktionsverdau und Transformation:

1 µl *Dpn I* Restriktionsenzym (10 U/µl) wird direkt zur Mutagenesereaktion zupipettiert. Der Ansatz wird gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert, um die parentale, nicht-mutierte DNA zu verdauen. Anschließend wird 1 µl der *Dpn I* behandelten DNA der Mutagenese- und der Mutagenese-Kontrollreaktion (pWhitescript) in XL1-Blue superkompetente Bakterienzellen transformiert (siehe 3.2.1) und auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Der pWhitescript-Kontrollansatz dagegen wird zur Blau-Weiß-Selektion auf LB-Xgal/IPTG-Amp-Platten ausgestrichen. Die erhaltenen Klone werden hinsichtlich der mutierten Plasmid-DNA charakterisiert sowie sequenziert.

3.2.12 Titerbestimmung retroviraler Vektoren

Die Titerbestimmung retroviraler Vektoren kann über die Methode der *real-time* quantitativen PCR (RTQ-PCR) durchgeführt werden. Ziel ist die Zählung viraler Genome pro definiertem Volumen Zellüberstand Virus-produzierender Zellen. Die virale RNA wird aus dem Kulturüberstand isoliert und revers transkribiert. Die hierbei gewonnene cDNA wird schließlich in die RTQ-PCR-Reaktion eingesetzt und quantifiziert. Diese Methode der Vektor-Titrierung ist geeignet, um „reporterlose“ RCR-Vektoren zu titrieren¹⁴⁸.

Die Primer werden so ausgewählt, dass eine bestimmte cDNA-Region amplifiziert wird. Eine thermostabile Polymerase (AmpliTaQ Gold, Applied Biosystems) katalysiert nach dem Denaturierungsschritt und dem Hybridisieren der Primer an die cDNA-Matrize („*Annealing*“) die Verlängerung der Primer („*Extension*“). Durch die zyklische Anwendung von Denaturieren, „*Annealing*“ und „*Extension*“ gelingt die Amplifikation des gewünschten cDNA-Fragments und damit die Titerung retroviraler Vektoren.

3.2.12.1 Isolierung viraler RNA

Die Isolierung viraler RNA erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit des starken RNase-Hemmers Guanidiniumisothiocyanat. Die RNA wird chromatographisch an Anionenaustauschersäulchen auf Kieselgelbasis aufgereinigt. Dabei wird der Sachverhalt ausgenutzt, dass Silicagel in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze RNA adsorbiert. Durch Waschen mit chaotrope Salze enthaltenden Puffern können Proteinverunreinigungen abgetrennt werden.

Da es sich um kleinste Mengen zu isolierender RNA handelt, aber aufgrund der Quantifizierung eine maximale Ausbeute an isolierter RNA (möglichst 100 %) erhalten werden soll, wird der Lysepuffer mit sogenannter *carrier* RNA versetzt.

Folgende Materialien sind Bestandteil des QiaAmp Viral RNA-Mini-Kits (Qiagen).

Material:

- Viral. Lysepuffer AVL:
Puffer AVL wird *carrier* RNA in einer Konzentration von 10 µg/ml zugefügt.
- Ethanol, 100 %
- Waschpuffer AW1
- Waschpuffer AW2
- Elutionspuffer AVE
- Filterpipettenspitzen (Biozym)

Zur Titerung der retroviralen RNA-Genome wird die virale RNA aus je 150 µl Kulturüberstand Virus-produzierender Zellen bzw. aus seriellen 1:10-Verdünnungen desselben isoliert.

Je 600 µl Lysepuffer werden in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, 150 µl viraler Überstand zugesetzt und gemischt. Die Lyse der Virenpartikel erfolgt über einen Zeitraum von 10 min. Das Lysat wird mit 600 µl 100 % Ethanol versetzt und durch Mischen eine homogene Lösung hergestellt. Dadurch werden geeignete Bindungskonditionen für die folgende chromatographische Aufreinigung geschaffen. Die mit Ethanol versetzten Lysate werden schließlich auf die Anionenaustauschersäulchen appliziert. Es wird jeweils eine Minute bei 5000 xg zentrifugiert und der Säulendurchlauf verworfen. Durch Waschen der Säulchen mit chaotropes Salz enthaltenden Puffern werden Proteinverunreinigungen eliminiert. Die Elution der gebundenen viralen RNA erfolgt durch Applikation von 2x 40 ml Elutionspuffer AVE und Zentrifugation bei 5000 xg.

Die isolierte RNA wird bei -80 °C gelagert.

3.2.12.2 DNase-Verdau

Während der Isolierung und Aufreinigung der viralen RNA kann vom Transfektionsvorgang her verschleppte Plasmid-DNA, die sich neben Viren ebenfalls noch im Kulturüberstand der Virus-produzierenden Zellen befindet, nicht eliminiert werden. Die gewonnenen RNA-Lösungen müssen aus diesem Grund einem DNase-Verdau unterzogen werden, da verschleppte Plasmid-DNA bei der Quantifizierung durch die RTQ-PCR ebenfalls amplifiziert würde und so das von viraler cDNA herrührende Signal überlagern würde. Die Plasmidverschleppung ist derartig hoch, dass eine aussagekräftige Titerung dadurch zunichte gemacht würde¹⁴⁸.

Materialien:

- DNase (2 U/ml, Ambion)
- 10x DNase-Puffer
- DNase-Inaktivierungsreagenz

34 µl mit verschleppter Plasmid-DNA verunreinigte RNA-Lösung werden mit 4 µl 10x DNase-Puffer und 2 µl (4 U) DNase versetzt, die Lösung gemischt und 1 h bei 37 °C verdaut.

Der Verdau wird durch Zugabe von 5 µl DNase-Inaktivierungsreagenz abgestoppt. Dieses Reagenz stellt eine Suspension aus makromolekularen *Beads* (bestehend aus 60 % Flüssigkeit und 40 % Trockensubstanz) dar, die die DNase immobilisieren. Die *Beads* müssen während der 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mehrmals aufgewirbelt werden. Durch 1-minütige Zentrifugation bei 10000 xg sedimentieren die *Beads* und die nun DNase-verdauten RNA-haltigen Überstände können abgenommen, in frische 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert bzw. direkt in die reverse Transkription eingesetzt werden.

3.2.12.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die aus dem Kulturüberstand isolierte virale RNA in cDNA umgeschrieben. Um bei der folgenden Titerung der cDNA durch die RTQ-PCR korrekte Titer zu ermitteln, werden jeweils Reaktionen mit bzw. ohne Reverse Transkriptase ausgeführt. Dadurch ist es möglich, restlichen Hintergrund durch während des DNase-Verdaus nicht eliminierte Plasmid-DNA zu berücksichtigen. Die viralen Titer können nach Durchführung der RTQ-PCR durch Subtraktion der in Ansätzen ohne Reverse Transkriptase ermittelten Plasmid-Kopiezahlen von den in Ansätzen mit Reverser Transkriptase ermittelten Gesamt-Kopiezahlen bestimmt werden¹⁴⁸.

Materialien:

- SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase, 200 U/µl (Invitrogen)
- RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 40 U/µl (Invitrogen)
- First Strand Buffer, 5x (Invitrogen)
250 mM Tris-HCl (pH 8,3)
375 mM KCl
15 mM MgCl₂
- 100 mM DTT (Invitrogen)
- 10 mM dNTP-Mix:
10 mM each dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Biozym)
- Random Primer, Natriumsalz 150 ng/µl (Amersham)

Die cDNA-Synthese wird in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Nach Vorlage von je 10 µl DNase-verdauter RNA-Lösung werden die Ansätze mit je 1 µl dNTP-Lösung (Endkonzentration: 0,5 mM) und je 1 µl Random Primer-Lösung versetzt, gemischt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Hitzeanwendung führt zu einem Aufschmelzen von ausgebildeten RNA-Sekundärstrukturen wie „*Hairpins*“. Um eine Rückbildung derartiger Sekundärstrukturen zu vermeiden, werden die Ansätze durch Inkubation auf Eis Schock-abgekühlt. Schließlich erfolgt

die Zugabe von je 4 µl 5x First-Strand Buffer, 2 µl 100 mM DTT (Endkonzentration: 10 mM) und 1 µl RNase-Inhibitor¹⁷. Es folgt eine 2-minütige Adaptation der Reaktionsgemische bei 42 °C, bevor 1 µl Reverse Transkriptase pro Ansatz zugefügt wird. Die cDNA-Synthese wird 50 min bei 42 °C durchgeführt. Abstoppen der Reaktion erfolgt durch 15-minütige Inkubation bei 70 °C.

Bei der reversen Transkription wird die virale RNA mit Hilfe sogenannter Random Primer, einer Mischung aus verschiedensten Primersequenzen, die mit sämtlichen Sequenzen der viralen RNA hybridisieren können, in cDNA umgeschrieben. Man erhält dabei Hybride aus viraler RNA und cDNA.

Die erhaltene cDNA kann unmittelbar in die RTQ-PCR-Reaktion eingesetzt und quantifiziert werden.

3.2.12.4 RTQ-PCR

Die RTQ-PCR, eine Kombination aus PCR und Fluoreszenzdetektion, ist die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Quantifizierung erfolgt durch den ABI Prism 7700 Sequence Detector (Taqman; PE Applied Biosystems). Bei der Taqman-Nachweismethode wird eine weitgehend unbeachtete Eigenschaft der Taq-Polymerase, die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität, genutzt⁶⁶. Der PCR-Reaktion wird ein zwischen *forward*- und *reverse*-Primern bindendes Oligonucleotid (*Probe*), das am 5'-Ende einen Fluorophor als Reporter und am 3'-Ende einen weiteren Fluorophor als sogenannten Quencher trägt, zugesetzt. Der Quencher absorbiert dabei das vom Reporter-Fluorophor emittierte Licht. Die spezifisch annealende *Probe* wird durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase degradiert. Dadurch befinden sich Reporter und Quencher nicht mehr in unmittelbarer Nachbarschaft, was in einer erhöhten detektierten Reporter-Fluoreszenz (Emissionswellenlänge: 518 nm) resultiert. Als Reporter-Fluorophor wird FAM (6-carboxyfluorescein), als Quencher-Fluorophor TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) verwendet⁶⁴.

Bei der RTQ-PCR werden keine absoluten Mengen an PCR-Produkt nach Reaktionsende gemessen. Statt dessen steht die Kinetik der PCR-Reaktion im Focus des Interesses, da sie die entscheidende Information im Sinne einer Quantifizierung von Proben unbekanntem DNA-Gehalts liefert.

Die typische Amplifikationskurve eines RTQ-PCR-Laufs (Abbildung 3-2) weist drei Segmente auf:

- Die *Threshold*-Phase,
- die exponentielle (oder bei logarithmischer Auftragung lineare) Phase und
- die Plateau-Phase

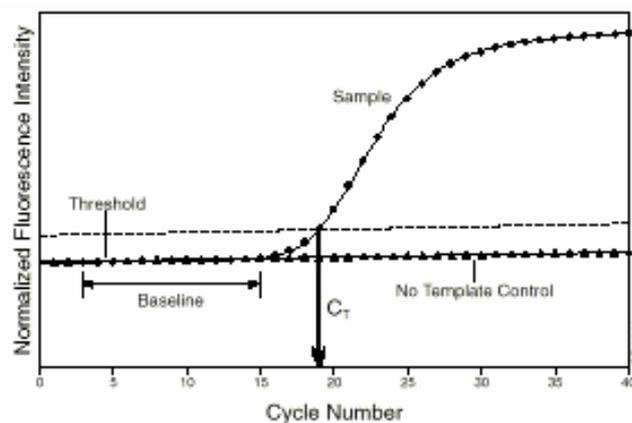


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung einer typischen Amplifikationskurve bei der RTQ-PCR

Die exponentielle Phase beginnt, wenn eine ausreichende Menge an Produkt akkumuliert ist. Auch Reaktionen mit geringer Start-Kopienzahl erreichen das gleiche Plateau wie Reaktionen mit höherer DNA-Ausgangskonzentration. Eine Endpunktanalyse ist deshalb nicht geeignet. Man nimmt daher als Richtschnur die Zykluszahl, bei der sich das

Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt (*thresholdcycle*, C_T -Wert), weil zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung noch exponentiell ist.

Theoretisch könnte man daraus bei bekannter Vermehrungsrate auf die ursprüngliche Templatmenge rückschließen. Da aber die Amplifikation eines bestimmten Fragments von so vielen Faktoren beeinflusst wird, ist es einfacher, wenn man parallel bekannte Templatmengen amplifiziert und vergleicht, welcher C_T -Wert für welche Templatmenge erhalten wird.

Aufgrund des exponentiellen Charakters der PCR müssen selbst kleinste Verunreinigungen von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes findet räumlich getrennt von dem Ort statt, an dem das PCR-Produkt analysiert wird, wobei jeweils auch ein hierfür reservierter Pipetten-Satz verwendet wird.

Materialien:

- 2x Universal-PCR-Master-Mix (Applied Biosystems)
- Primer: für die Amplifizierung werden Primer gewählt, die in der *gag*-Region des MoMLV-Genoms *annealen* (speziell im Bereich des viralen Verpackungssignals Ψ)
forward-Primer: 5'-TTTGACCTTAGGTCAGTGGAAAGAT-3'
reverse-Primer: 5'-AACCCAACGTCTCTTCTTGACATC-3'
- *Probe*: 5'-FAM-AGCGGATCGCTCACAACCAGTCG-TAM-3'

Primer und Probe werden mit dem Softwareprogramm Primer Express (Applied Biosystems) gestaltet. Dabei ist zu überprüfen, dass

- die Primer aus mindestens 18, die Probe aus max. 50 Nucleotiden besteht und die zu amplifizierende Sequenz kleiner als 150 bp ist.
- eine Dimer-Bildung der beiden Primer und die Sekundärstruktur-Bildung innerhalb eines Primers durch Selbst-Komplementarität unwahrscheinlich ist.
- die Distanz Primer-Probe weniger als 50 bp beträgt.
- die Schmelztemperatur T_m der Primer zwischen 58 °C und 60 °C und die der Probe zwischen 68 °C und 70 °C liegt.
- maximal drei gleiche Nucleotide (keine Gs) aufeinander folgen.
- bei den Primern wegen Instabilität max. 2 Gs/Cs in den 5 letzten 3' Basen vorkommen.
- die Probe wegen Auto-Quenching kein G am 5-Ende aufweist.
- die Probe aus mehr Cs als Gs besteht.
- PCR-Platten: 96-*well*-Platten, Polyethylen, geeignet für RTQ-PCR (Greiner)

- Abdeckfolien: ViewSeal (Greiner)
- RTQ-PCR-Gerät: ABI Prism 7700

Für die PCR-Reaktionsansätze (Gesamtvolumen: 20 µl; siehe Tabelle 3-4) werden zunächst je 10 µl PCR-Master-Mix, Primer und Probe kombiniert und auf 15 µl mit bidest. Wasser aufgefüllt. Der PCR-Mix wird für alle Reaktionen, die unter gleichen Bedingungen ablaufen sollen, gemeinsam in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt, gemischt und anschließend auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Als Template werden schließlich 5 µl der cDNA-Synthese-Ansätze zugesetzt. Ein Standardprogramm für die RTQ-PCR-Reaktion ist in Tabelle 3-5 dargestellt.

Komponenten		Volumen pro Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
PCR-Mix:	2x RTQ-PCR-Mastermix	10 µl	1x
	6 µM „forward“ Primer	1 µl	300 nM
	6 µM „reverse“ Primer	1 µl	300 nM
	2 µM Probe	2 µl	200 nM
	H ₂ O	1 µl	-
cDNA:		5 µl	
Gesamtvolumen:		20 µl	

Tabelle 3-4: Zusammensetzung einer RTQ-PCR-Reaktion

Programmschritt		Dauer	Temperatur
Denaturieren der cDNA-Matrize zu Beginn:		10 min	95°C
Zwei-Schritt-PCR (40 Zyklen)	Denaturieren	15 sec	95°C
	„Primer + Probe <i>Annealing</i> “	1 min	60°C
	„ <i>Extension</i> “		

Tabelle 3-5: Ablauf des verwendeten PCR-Programms

Der PCR-Mastermix enthält neben der thermostabilen DNA-Polymerase das Enzym Uracil-N-Glycosylase, welche den RNA-Strang des während der cDNA-Synthese erzeugten RNA/DNA-Hybrids abbaut. Die RNA muss abgebaut werden, da sie nach dem Aufschmelzen des Hybrids während der PCR-Reaktion mit dem komplementären DNA-Strang bereits bei einer Temperatur rehybridisieren würde, bei der ein *Annealing* der Primer noch nicht möglich ist.

Als Negativkontrolle wird Überstand nicht transfizierter Virusproduzenten zellen gewählt. Dieser wird analog dem Protokoll der Präparation viraler RNA bis zum Einsatz in der RTQ-PCR behandelt, d.h. er dient auch als Negativkontrolle der RNA-Isolierung, des DNase-Verdau und der reversen Transkription.

Die Endkonzentration von *forward*- und *reverse*-Primern beträgt 300 nM, die Probe liegt in einer finalen Konzentration von 200 nM vor^{147,148}.

Als externer Standard werden Proben mit bekannten Molekülzahlen als Template amplifiziert. Eine Verdünnungsreihe des für den RCR-Vektor MoMLV-YCD kodierenden Plasmidkonstruktes Abbildung 4-31 wird hierzu herangezogen. Zur Generierung der Standardkurve werden PCR-Reaktionen mit den Molekülzahlen 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ und 0 durchgeführt.

Da bei der RTQ-PCR jeweils 5 µl Lösungsvolumen als Templatmenge vorgesehen sind, müssen die für die Standardkurve gewünschten zu amplifizierenden Molekülzahlen in diesem Volumen eingestellt werden. Aufgrund der

bekanntem DNA-Konzentration der Plasmidlösung (0,577 µg/µl, photometrische Messung) und der molekularen Masse M_r des Plasmids ($M_r = 7396$ kDa) kann für die Einstellung gewünschter Molekülnzahlen eine Verdünnungsreihe berechnet werden (siehe Tabelle 3-6).

Molekülnzahl/5 µl	Moleküle/µl	Stoffmenge [mol/µl]	Masse [µg/µl]	Verdünnungsfaktor
10^{10}	$2 \cdot 10^9$	$3,32 \cdot 10^{-15}$	$2,45 \cdot 10^{-2}$	23,5
10^9	$2 \cdot 10^8$	$3,32 \cdot 10^{-16}$	$2,45 \cdot 10^{-3}$	235
10^8	$2 \cdot 10^7$	$3,32 \cdot 10^{-17}$	$2,45 \cdot 10^{-4}$	$2,35 \cdot 10^3$
10^7	$2 \cdot 10^6$	$3,32 \cdot 10^{-18}$	$2,45 \cdot 10^{-5}$	$2,35 \cdot 10^4$
10^6	$2 \cdot 10^5$	$3,32 \cdot 10^{-19}$	$2,45 \cdot 10^{-6}$	$2,35 \cdot 10^5$
10^5	$2 \cdot 10^4$	$3,32 \cdot 10^{-20}$	$2,45 \cdot 10^{-7}$	$2,35 \cdot 10^6$
10^4	$2 \cdot 10^3$	$3,32 \cdot 10^{-21}$	$2,45 \cdot 10^{-8}$	$2,35 \cdot 10^7$
10^3	$2 \cdot 10^2$	$3,32 \cdot 10^{-22}$	$2,45 \cdot 10^{-9}$	$2,35 \cdot 10^8$
10^2	$2 \cdot 10^1$	$3,32 \cdot 10^{-23}$	$2,45 \cdot 10^{-10}$	$2,35 \cdot 10^9$
10^1	2	$3,32 \cdot 10^{-24}$	$2,45 \cdot 10^{-11}$	$2,35 \cdot 10^{10}$

Tabelle 3-6: Erstellung einer Verdünnungsreihe einer pACE-YCD-Plasmidlösung.

Molekülnzahlen (Spalte 2) sind zunächst über die Avogadro-Konstante ($N=6,022 \cdot 10^{23}$ Moleküle/mol) in Stoffmengen (Spalte 3) umzurechnen. Über die molekulare Masse M_r des Plasmids pACE-YCD ($M_r = 7396$ kDa) ist schließlich die jeweils einzustellende Massenkonzentration (Spalte 4) zu errechnen. Die Lösung mit 10^{10} Molekülen/5 µl wird durch eine 1:23,5-Verdünnung (Spalte 5) der Ausgangsplasmidlösung hergestellt; alle weiteren Lösungen werden dann durch serielle 1:10 Verdünnungen erhalten.

Für die Methode der absoluten Quantifizierung mit Hilfe eines externen Standards wird vorausgesetzt, dass die „Plasmidstandards“ und die zu quantifizierenden viralen cDNA-Proben eine identische Amplifikationseffizienz zeigen.

Die quantitative Auswertung des PCR-Laufes erfolgt mit dem Programm *ABI Prism 7000 SDS Software*.

Die Zahl an viralen Gesamtpartikeln pro Milliliter Kulturüberstand Virus-produzierender Zellen kann unter Berücksichtigung sämtlicher Verdünnungsschritte während RNA-Isolierung, DNase-Verdau, reverser Transkription und RTQ-PCR ermittelt werden. Allerdings ist zu beachten, dass virale Genome quantifiziert werden und MoMLV-Viren aus zwei identischen RNA-Genomen aufgebaut sind. Die Zahl an viralen Gesamtpartikeln ist somit die Hälfte der gezählten Genome.

Bei der RTQ-PCR werden keine absoluten Mengen an PCR-Produkt nach Reaktionsende gemessen. Stattdessen steht die Kinetik der PCR-Reaktion im Focus des Interesses, da sie die entscheidende Information im Sinne einer Quantifizierung von Proben unbekanntem DNA-Gehalts liefert. Solange die Probe intakt ist, findet der sogenannte Fluoreszenzenergie-Transfer statt, indem das vom Reporter-Farbstoff emittierte Licht vom Quencher-Farbstoff absorbiert wird. Bei Spaltung des markierten Probe-Oligonukleotids im Zuge der PCR-Reaktion wird jedoch die Lichtemission des Reporter-Farbstoffs nicht mehr durch den Quencher-Farbstoff gelöscht, was in einer Zunahme des Emissionsspektrums des Reporter-Fluorophors resultiert. Änderungen bezüglich Fluoreszenzintensität wurden durch das Software-Programm *ABI Prism 7000 SDS Software* gemäß folgender Gleichung ausgedrückt:

$$\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$$

Rn^+ stellt hierbei den Quotienten aus der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffs und der des internen Referenzfarbstoffs ROX zu jedem gegebenen Zeitpunkt dar. Der passive Referenzfarbstoff ROX ist an der 5'-Exonuklease-Reaktion nicht beteiligt und fungiert zur Normalisierung des Reporterfarbstoffsignals als interne Referenz für die Hintergrund-Fluoreszenzemission.

Rn^- verkörpert den gleichen Quotienten, wobei in diesen die Emissionsintensität des Reporterfarbstoffs in dem gleichen Reaktionsansatz vor Start der PCR-Reaktion einget.

Die ΔRn -Mittelwerte wurden in einem Koordinatensystem als Funktion der Zeit, repräsentiert durch die Zyklus-Zahl, aufgetragen (Amplifikationsplot).

PCR-Reaktionen erfolgten mit jeder cDNA-Probe in dreifacher Ausführung. Diese wurden hinsichtlich einer Quantifizierung mit PCR-Reaktionen definierter Ausgangsmolekülnzahl in Beziehung gesetzt. Als externer Standard wurden Amplifikationen des pACE-YCD-Vektorplasmids mit unterschiedlichen initialen Molekülnzahlen (10^1 -

10^8 /Reaktion) als Template herangezogen. Auch hier wurde jeweils pro Molekülzahl eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Abbildung 3-3 zeigt die entsprechenden Amplifikationsplots.

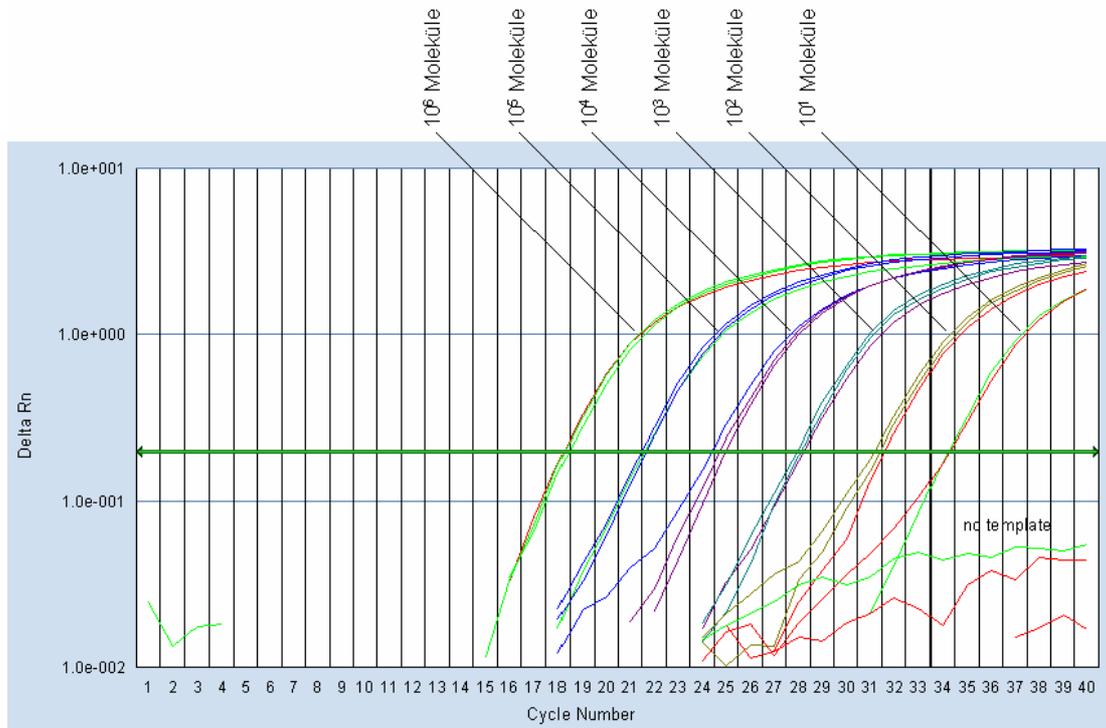


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Quantifizierung von RCRs mit Überlänge genom

Abschätzung der Zahl retroviraler Genome im Kulturüberstand Virus-produzierender Zellen durch RTQ-PCR. Serielle Verdünnungen des pACE-YCD-Vektorplasmids, die mit 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 Vektor-Molekülen korrespondierten, wurden mit Ψ -Probe und -Primern amplifiziert und dienen als externer Standard. Plasmid-DNA wurde entsprechend Punkt 3.2.12.4 verdünnt. Die dargestellten Amplifikationsplots zeigen die Fluoreszenzänderung (ΔRn) als eine Funktion der PCR-Zyklus-Zahl. Die RTQ-PCR war quantitativ über den dargestellten Bereich von 10^2 - 10^6 Molekülen/ Reaktion.

Bezüglich der dargestellten Amplifikationsplots zur Generierung einer Standardkurve ist Folgendes anzumerken:

Während der frühen Zyklen der PCR-Amplifikation verweilt der ΔRn -Wert auf der Basislinie. Je mehr mit dem DNA-Template hybridisierte Probe durch die Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase degradiert wurde, desto stärker nahm die Emissionsintensität des Reporter-Fluorophors zu. Die Auswertung der Amplifikationsplots erfolgte in der frühen Phase der PCR-Reaktion, in der die Produktakkumulation exponentiell verlief. Hierbei wurden ein Fluoreszenzschwellenwert (sogenannter Threshold) definiert und für jede individuelle Probe die Zykluszahl (C_T -Wert) bestimmt, bei welcher dieser Wert erreicht wurde. Der Threshold wurde bei einem ΔRn -Wert von 0,2 festgesetzt. Der C_T -Wert gibt Auskunft über die eingesetzte DNA-Menge.

Die Amplifikationsplots waren nach rechts (zu höheren C_T -Werten hin) verschoben, wenn die DNA-Menge verringert wurde. Dieser Sachverhalt ist darauf zurückzuführen, dass Reaktionsansätze mit weniger Startkopien auf eine größere Amplifikationsrate angewiesen sind, um genügend Probe zum Erreichen der Threshold-Fluoreszenz abzubauen.

Trägt man die ermittelten C_T -Werte gegen die Logarithmen der eingesetzten DNA-Mengen bzw. Kopienzahlen auf, erhält man eine Standardkurve (siehe Abbildung 3-4), die es erlaubt, aus den C_T -Werten von Versuchsansätzen unbekannter DNA-Menge die jeweils zugrunde liegende Kopienzahl zu errechnen. Die Standardkurve wurde schließlich zur Bestimmung der Zahl viraler Genome im Überstand der Virus-produzierenden 293T-Zellen benutzt.

Zur Optimierung der Reaktion wurden bei einer Primer-Konzentration von 300 nM Probe-Konzentrationen zwischen 100 nM und 300 nM ausgetestet. Die Reaktionskinetik war für alle Probe-Konzentrationen ähnlich. Eine Probe-Konzentration von 200 nM wurde schließlich für die Titerung ausgewählt.

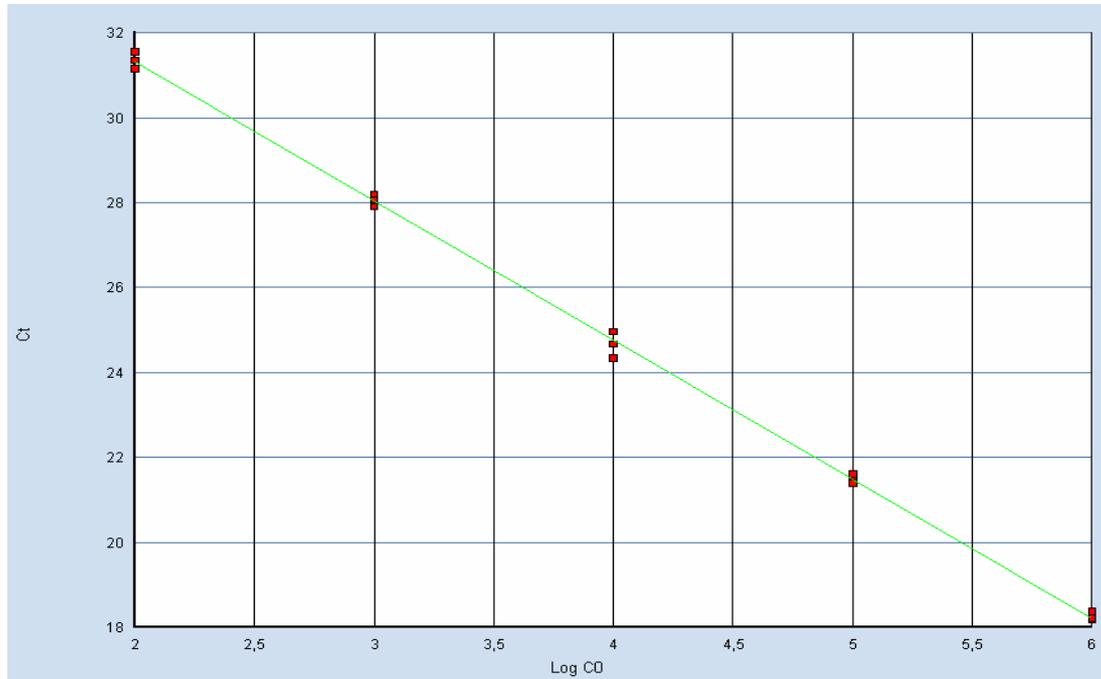


Abbildung 3-4: Ermittlung der Zahl retroviraler Genome im Kulturüberstand Virus-produzierender Zellen durch RTQ-PCR.

Standardkurve, generiert aus den Daten der bei Abbildung 3-3 gezeigten Amplifikationsplots, indem der Threshold-Zyklus (C_T) gegen den dekadischen Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen ist. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung ausgeführt. Der Korrelationskoeffizient, ein Maß dafür, ob die PCR in dem gewählten Bereich quantitative Aussagen zulässt, betrug 0,995. Die RNA-Titer der viralen Vektoren in den Überständen der Produzentenzellen wurden durch Amplifikation der in cDNA umgeschriebenen viralen RNA und Vergleich der erhaltenen C_T -Werte mit der Standardkurve ermittelt. Alle Testproben wurden in dreifacher Ausführung amplifiziert.

3.3 Zellbiologische Materialien und Methoden

3.3.1 Verwendete Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien werden mittels ELISA (Mycoplasma Detection Kit, Boehringer Mannheim) auf Mycoplasmen getestet. Es werden nur Mycoplasma-negative Linien verwendet; bei positivem Ergebnis wird die entsprechende Zelllinie komplett verworfen und durch eine Mycoplasmen-freie Kultur ersetzt.

- BHK-21 (Baby Hamster Kidney):
Diese Zelllinie mit Fibroblasten-artiger Morphologie leitet sich von einem Nierenzellisolat neugeborener Goldhamster ab ¹⁶⁶. Sie kann durch VSV, Serotyp Indiana und SeV, nicht aber durch MoMLV infiziert werden.
Empfohlenes Kulturmedium (ATCC): 80 % Modified Eagle's BME/10 % Difco tryptose phosphate broth + 10 % FCS. Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2mM Alanyl-Glutamin + 10 % FCS.

- **HepG2:**
Diese Zelllinie leitet sich von einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen Patienten ab ⁸⁴. Die Zellen exprimieren zahlreiche Hepatozyten-spezifische Proteine, u. a. den ASGP-R ¹⁵². Es gibt keine Anhaltspunkte für eine HBV-Infektion, d. h. in den Zellen sind weder HBVDNA- Integrate nachweisbar noch läßt sich HBsAg detektieren.
Empfohlenes Kulturmedium (ATCC): MEM mit EBSS + 10% FCS + NEAA + Natriumpyruvat.
Verwendetes Kulturmedium: MEM mit EBSS/DMEM (im Verhältnis 4:1) + 10 % FCS + NEAA + Natriumpyruvat + Biotin + 4,5 g/l Glucose. Der Biotin- und der Glucose-Zusatz dienen der Stimulierung der ASGP-R Expression ^{31,188}. Die Mischung aus MEM und DMEM wird verwendet, da die Zellen in diesem Gemisch besser wachsen als in reinem MEM.
- **HuH7:**
Diese Zelllinie leitet sich von einem hepatozellulären Carcinom eines 57-jährigen Patienten ab ¹²¹. Die Zelllinie ist HBsAg-negativ und exprimiert in FCS-freiem Medium zahlreiche Hepatozyten-spezifische Proteine. Empfohlenes Kulturmedium ¹²¹: RPMI 1640 + 20 % FCS + 0,4 % Lactalbumin-Hydrolysat.
Verwendetes Kulturmedium: M199 + 10 % FCS.
- **MDCK (Madin Darby Canine Kidney):**
MDCK-Zellen leiten sich von einem Nierenzellisolat eines gesunden Cockerspaniels ab ⁵⁴. Die Zellen zeigen in Kultur eine polaren Aufbau und eignen sich daher zum Studium der Sortierung von eigenen und fremden Membranproteinen ¹⁹⁰.
Empfohlenes Kulturmedium (ATCC): MEM mit EBSS +10 % FCS.
Verwendetes Kulturmedium: MEM mit EBSS + 10 % FCS.
- **M12:**
M12-Zellen, die den humanen ASGP-R stabil exprimieren, sind von MDCK-Zellen abgeleitet und wurden im Labor von M. Spiess im Biozentrum Basel etabliert ⁵³ (In dieser Veröffentlichung wird die Bezeichnung M(Y+f) für M12-Zellen verwendet.). Die ASGP-R H1 cDNA wurde mittels eines rekombinanten Retrovirus, also mittels Transduktion, die ASGP-R H2 cDNA mittels stabiler Transfektion in die Zellen eingebracht. Als Selektionsmarker dienten hierbei die Neomycin- bzw. die Histidinol-Resistenz.
Empfohlenes Kulturmedium (M. Spiess, pers. Mitteilung): MEM mit EBSS + 10% FCS + 2mg/ml Histidinol.
Verwendetes Kulturmedium: MEM mit EBSS +10% FCS + 2mg/ml Histidinol + 600 µg/ml G418.
- **NIH 3T3:**
Hierbei handelt es sich um eine embryonale Mäuse-Fibroblasten-Zelllinie ⁷³, deren Zellen ursprünglich eine starke Kontaktinhibition aufwiesen. Die Zelllinie ist Basis für viele retrovirale Verpackungszelllinien und kann durch ecotropes oder amphotropes MoMLV, VSV und SeV infiziert werden.
Empfohlenes Kulturmedium (ECACC): DMEM mit 2mM Glutamin + 10% NCS^h.
Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2mM Alanyl-Glutamin + 10% FCSⁱ.
- **PE501:**
Diese von 3T3tk--Zellen abgeleitete Zelllinie ¹¹³ enthält ein stabil integriertes, modifiziertes MoMLV-Genom, exprimiert alle retroviralen Strukturgene (*gag*, *pol*, *env*) und eignet sich daher als Verpackungszelllinie zur Generierung rekombinanter Retroviren ¹¹³. Mit Hilfe von PE501 erzeugte rekombinante Retroviren transduzieren nur Mäuse- und Rattenzellen (ecotropes Wirtsspektrum).
Empfohlenes Kulturmedium ¹¹⁴: DMEM mit 2mM Glutamin + 10% FCS.
Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2mM Alanyl-Glutamin + 10% FCS.

^h Um die Kontaktinhibition der Zellen aufrecht zu erhalten, sollte anstelle von fötalem Kälberserum (FCS) Serum neugeborener Kälber (NCS) verwendet werden.

ⁱ Da die Zellen des verwendeten NIH 3T3-Klons keine Kontaktinhibition mehr aufwiesen, wurde FCS anstelle von NCS verwendet.

3.3.2 Zellkultur

3.3.2.1 Allgemeines

Alle Arbeitsschritte, die steril ablaufen müssen, werden in einer Sicherheitswerkbank (Clean Air DLF/BSS 4) durchgeführt. Medien und Puffer werden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgt bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre in wasserummantelten Inkubatoren (Forma-Scientific).

Materialien:

- 100mM Natrium-Pyruvat-Lösung (Invitrogen)
- Fötale Kälberserum (FCS, Invitrogen)
- Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) bzw. Minimal Essential Medium (MEM) bzw. Medium 199 (M199) mit 2mM L-Alanyl-Glutamin + 10% FCS:
450 ml DMEM bzw. MEM bzw. M199/Glutamax (Invitrogen) werden mit 50 ml FCS versetzt. L-Alanyl-Glutamin kann von den meisten Zelllinien genauso gut wie L-Glutamin verwertet werden, ist aber in Lösung sehr viel stabiler als dieses. Das jeweilige Medium wird je nach Zelllinie noch mit weiteren Supplementen versehen. Im Falle von DMEM wird immer die Variante mit hohem Glucosegehalt (4,5 g/l), Natrium-Pyruvat und NaHCO₃ verwendet.
- PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺:
95,5 g Dulbecco's PBS-Pulver (Sigma) werden in 10 l bidest. Wasser gelöst, aliquotiert und autoklaviert. Die Lösung hat folgende Zusammensetzung:
8 g/l NaCl,
1,15 g/l Na₂HPO₄,
0,2 g/l KH₂PO₄,
0,2 g/l KCl.
Die Aufbewahrung erfolgt bei 4 °C.
- Trypsin/EDTA mit Phenolrot:
Fertiglösung (Invitrogen), die 0,25 g/l Trypsin enthält und bei -20 °C gelagert wird. Einmal aufgetaute Gebrauchslösung wird bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.2.2 Auftauen von Zellen

Folgendes Protokoll wird für alle benutzten Zelllinien verwendet:

Durchführung:

- Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden möglichst rasch ins 37 °C Wasserbad überführt und aufgetaut.
- Die Zellsuspension wird vorsichtig mit 10 ml FCS-haltigem Medium versetzt, für 5 min mit 200 ×g (Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor) zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Das Zellsediment wird in 5 ml oder 10 ml FCS-haltigem Medium resuspendiert und in eine 50 ml oder 260 ml Zellkulturflasche ausgesät.

3.3.2.3 Zellpassage

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit werden die in Kultur gehaltenen Zelllinien ein- bis dreimal pro Woche nach folgender Vorschrift passagiert. Die Passage erfolgt, wenn die Zellen 80 % Konfluenz erreicht haben.

Durchführung:

- Das alte Medium wird entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen (Trypsin wird durch FCS inaktiviert).
- 1 ml Trypsin/EDTA werden so zugegeben, daß der gesamte Zellrasen bedeckt ist.
- Wenn sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen, werden 4 ml DMEM+ 10 % FCS zugegeben, die gesamte Zellsuspension aufgenommen, die gewünschte Menge (1/2 bis 1/20) passagiert und mit 12 ml frischem Medium versetzt. Die Mengenangaben beziehen sich auf 260 ml-Kulturflaschen (Nunc) und können für 800 ml-Kulturflaschen einfach verdoppelt und für 50 ml-Kulturflaschen halbiert werden.

3.3.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Materialien:

- Einfriermedium:
70 % FCS-freies Medium, 20 % FCS, 10 % DMSO (Sigma)
- Cryoröhrchen, 2 ml (Nunc)
- Nicool Plus Einfriergerät (Air Liquide)

Durchführung:

- Die Zellen werden trypsiniert und in 10 ml FCS-haltigem Medium aufgenommen.
- Die Zellsuspension wird für 5 min mit 200 ×g zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Das Zellsediment wird in 2 ml (Zellen aus einer 260 ml-Kulturflasche) oder 4 ml (Zellen aus einer 800 ml-Kulturflasche) Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml in Cryoröhrchen überführt. Ein Cryoröhrchen wird nur mit 1 ml Einfriermedium befüllt; es dient beim Einfrieren als Referenzröhrchen.
- Die Cryoröhrchen werden in die Kühlkammer des Einfriergeräts überführt. Der Referenz-Temperaturfühler wird in das Medium des Referenzröhrchens getaucht, die Kühlkammer geschlossen und das Einfrierprogramm gestartet. Alle verwendeten Zelllinien werden mit demselben Programm, das sich aus den in Tabelle 3-7 dargestellten Schritten zusammensetzt, eingefroren.
- Die eingefrorenen Kulturen werden möglichst rasch in den Stickstofftank überführt.

Programmschritt	Parameter
Äquilibrieren:	Kammertemperatur und Medium im Referenzröhrchen werden auf 20 °C äquilibriert.
Abkühlen:	Die einzufrierenden Zellen werden mit 2,8 °C/min auf 0 °C abgekühlt.
Stickstoffpuls:	Es wird schlagartig soviel Stickstoff in die Kammer geleitet, daß die Kammer in möglichst kurzer Zeit auf -50 °C abkühlt.
Abkühlen (optional):	Erreicht die Temperatur des Mediums im Referenzröhrchen nach dem Stickstoffpuls nicht -30 °C, so wird mit 5 °C/min gekühlt, bis diese Temperatur erreicht ist.
Äquilibrieren:	Die Temperatur wird für 60 sec auf -30 °C gehalten.
Einfrieren:	Mit einer Rate von 4 °C/min wird bis auf -150 °C abgekühlt.

Tabelle 3-7: Ablauf des Programms zur Cryokonservierung von Zellen

3.3.2.5 Zellzählung mit dem Hämozytometer nach Neubauer

Materialien:

- 0,4 % (w/v) Trypanblau (Sigma)
- Hämozytometer nach Neubauer

Durchführung:

- Die Zellen werden trypsiniert und in 10 ml DMEM+ 10 % FCS aufgenommen.
- 90 µl Trypanblau werden mit 10 µl der Zellsuspension versetzt, gut gemischt und für 5–15 min inkubiert. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während durch die nicht mehr intakte Plasmamembran toter Zellen der Farbstoff eindringen kann. Die Färbung sollte nicht zu lange durchgeführt werden, da sonst auch lebende Zellen beginnen, den Farbstoff aufzunehmen.
- Auf das Hämozytometer wird ein Deckgläschen aufgelegt und die beiden Kammern mit dem Farbstoff-Zellgemisch befüllt. Die vier Eckquadrate jeder Kammer werden unter dem Mikroskop (Olympus IMT-2) ausgezählt. Lebende Zellen erscheinen weiß auf blauem Hintergrund.
- Bestimmung der Zellzahl: Ein Eckquadrat einer Kammer entspricht bei aufgelegtem Deckgläschen 10^{-4} cm³. Da die Zellsuspension 1 : 10 in Trypanblau verdünnt wird, ergibt sich somit die Zellzahl/ml nach folgender Formel: Zellzahl/ml = Durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadrat $\times 10^4 \times 10$.

3.3.3 Transfektion

Zum Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen, die in Zellkultur gehalten werden, existieren unterschiedliche Methoden. Die Calcium-Phosphat vermittelte Transfektion¹⁹² stellt eine einfache und effiziente Methode dar, bei der bis zu 20 % (in Einzelfällen mehr als 50 %) der Zellen einer Kultur Fremd-DNA aufnehmen. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme ist nicht geklärt, erfolgt aber vermutlich durch Endozytose, der der Transport der DNA zum Zellkern folgt. Bei der Lipofektion werden DNA-Liposomen-Gemische („Lipoplexe“) eingesetzt, wobei zumeist eine Mischung aus polykationischen Lipiden (zur Bindung der DNA) und neutralen Lipiden (für die Membranfusion) verwendet wird. Mit Hilfe von Lipofektionen lassen sich - im Vergleich zur Calcium-Phosphat vermittelten Transfektion - höhere Effizienzen erzielen. Allerdings ist eine Anpassung des Lipidgemischs an den zu transfizierenden Zelltyp notwendig: zum einen sind bei gegebener Lipidzusammensetzung die Transfektionseffizienzen sehr stark Zelltyp-abhängig, zum anderen können – ebenfalls Zelltyp-abhängig – zytotoxische Wirkungen bei der Lipofektion auftreten.

3.3.3.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Materialien:

- 2,5 M CaCl₂:
10,8 g CaCl₂·6H₂O werden in 20 ml bidest. Wasser gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.
- 2 x HBS:
8 g = 280 mM NaCl,
5 g = 50 mM HEPES,
1 g = 1 mM Glucose,
0,38 g = 10 mM KCl,
0,19 g = 1,5 mM Na₂HPO₄
Alle Komponenten werden in 480 ml sterilem bidest. Wasser gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt. Die Lösung wird sterilfiltriert und in 10 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Durchführung:

Die folgende Arbeitsvorschrift beschreibt exemplarisch die Transfektion in 6,0 cm Kulturschalen. Für andere Schalengrößen bzw. Kavitäten werden die benötigten Reagenzien bzw. Proben entsprechend angepasst.

- Einen Tag vor Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen trypsiniert, im Hämocytozometer ausgezählt und die gewünschte Zellzahl (in der Regel $0,5-1 \times 10^6$ Zellen) in 6 cm Kulturschalen ausgesät, mit 5 ml Medium versetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert.
- Ca. 3 h vor Transfektion wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS pro Kulturschale gewaschen und frisches Medium zugegeben.
- Die Plasmid-Lösung wird mit sterilem bidest. Wasser auf 225 µl aufgefüllt und mit 25 µl CaCl₂, 2,5 M versetzt.
- 2 x HBS wird tropfenweise zur Plasmid-Lösung gegeben und das Gemisch für 25 min bei Raumtemperatur zur Präzipitatbildung inkubiert.
- Je 500 µl Präzipitat werden pro Kulturschale auf die Zellen gegeben und diese für 24 h bei 37 °C inkubiert.

3.3.3.2 Transfektion mit Lipofectamine™ 2000

Materialien:

- Lipofectamine™ 2000
- DMEM
- DMEM+ 10 % FCS

Durchführung:

Die folgende Arbeitsvorschrift beschreibt exemplarisch die Transfektion in 6,0 cm Kulturschalen. Für andere Schalengrößen bzw. Kavitäten werden die benötigten Reagenzien bzw. Proben entsprechend der Produkthanleitung angepasst.

- Einen Tag vor Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen trypsinisiert, im Hämozytometer ausgezählt und die gewünschte Zellzahl ($0,5-1 \times 10^6$) in 6 cm Kulturschalen ausgesät, mit 5 ml Medium versetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert.
- Je Transfektionsansatz werden 8 µg zu transfizierende DNA in 500 µl FCS-freiem DMEM sowie 20 µl Lipofectamine™ 2000 in 500 µl FCS-freiem DMEM verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Lösungen werden vereinigt, vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur zur Ausbildung der DNA- Lipofectamine™ 2000-Komplexe inkubiert.
- Von den zu transfizierenden Zellen wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml FCS-freiem DMEM versetzt.
- Die 1 ml Transfektionslösung wird auf die zu transfizierenden Zellen gegeben.
- Die Zellen werden für 4-6 h bei 37 °C inkubiert, anschließend kann das Kulturmedium durch frisches Medium (z.B. DMEM + 10 % FCS) ersetzt werden.
- 24 - 48 h nach Beginn der Transfektion können die Zellen auf die Genexpression untersucht werden.

3.3.4 Membranimmunfluoreszenz-Färbung

Für den immunhistochemischen Nachweis von Membranproteinen bzw. viralen Hüllglykoproteinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Membranimmunfluoreszenz-Färbung an den entsprechenden Zellen in sogenannten Lab-Tek® II Kammerdeckgläsern, sterile Kulturkammern, der Firma Nunc durchzuführen, die zuvor mit Poly-L-Lysin (50µg/ml) über Nacht beschichtet werden, um ein Ablösen der Zellen während der Färbung zu vermeiden. Gegebenenfalls werden die Zellen zuvor mit einem Expressionsplasmid, das für das nachzuweisende Membranprotein kodiert, transfiziert.

Materialien:

- 2 % PFA (4 °C)
- PBS mit 10 % FCS (4 °C)
- Primärantikörper: 1) monoklonaler Maus anti-SeV-F Antikörper (mAk-48F)¹⁶¹ (1:400 verdünnt)

2) anti-ASGP-R Antikörper (Calbiochem: Cat. No.: 180120) (1:500 verdünnt)

- Sekundäntikörper: Ziege gegen Maus IgG Alexa 546 gekoppelt (1:1000 verdünnt)
- Lab-Tek®II Kammerdeckgläser (Nunc)
- Poly-L-Lysin (50 µg/ml)

Durchführung:

- Die einzelnen Kavitäten des Lab-Tek®II Kammerdeckglases werden zuvor mit Poly-L-Lysin (50 µg/ml) beschichtet und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.
- Die zu färbenden Zellen werden in den einzelnen Kammern (5×10^3 pro Kavität) des Lab-Tek®II Kammerdeckglases ausgesät.
- 24 h später können die Zellen transfiziert (siehe 3.3.3.2) und 48 h nach der Transfektion kann die Membranimmunfluoreszenz-Färbung durchgeführt werden. Findet eine Transfektion der zu färbenden Zellen nicht statt (Negativkontrolle) kann die Membranimmunfluoreszenzfärbung direkt 24 h nach dem Aussäen stattfinden.
- Für die Färbung werden die Zellen im Lab-Tek®II Kammerdeckglases auf Eis gekühlt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und für 30 min auf Eis in 2 % PFA fixiert. Es ist für das weitere Vorgehen darauf zu achten, dass die Zellen ständig auf Eis belassen werden und das alle Lösungen langsam pipettiert werden, um ein abschwimmen der Zellen zu verhindern.
- Die Fixierlösung wird abgesaugt und die Zellen werden zweimal 5 min mit 4 °C PBS gewaschen.
- Der Primäntikörper wird in der gewünschten Verdünnung in PBS mit 10 % FCS (4 °C) aufgenommen und für 1h auf die Zellen gegeben. Anschließend wird viermal für 5 min mit PBS (4 °C) gewaschen und der Sekundäntikörper, verdünnt in PBS mit 10 % FCS (4 °C), für 1h auf die Zellen gegeben.
- Die Zellen werden wieder viermal für 5 min in PBS mit 10 % FCS gewaschen und können abgedunkelt in PBS bei 4 °C kurzzeitig gelagert werden bis zur Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiovert 35).

3.4 Virologische Materialien und Methoden

3.4.1 Generierung transienter Virus-Produzentenzellen und Transduktion adhärenter Zellen mit rekombinanten Retro- bzw. Lentiviren

Virale Verpackungszellen sezernieren mehrere Tage nach Transfektion von Transfervektor, Verpackungsplasmid und Hüllexpressionsplasmid virale Partikel in den Kulturüberstand. Retro- bzw. Lentiviren besitzen auf Grund ihrer Lipidhülle eine negative Nettoladung auf ihrer Oberfläche, die zu Abstoßungsreaktionen zwischen den viralen Partikeln und den Zellen führt.

Der Zusatz von Polybrene (Hexadimethrin-Bromid), einem positiv geladenem quartären-Aminium-Polykation, führt zu einem Ladungsausgleich auf den Zelloberflächen und führt zu Steigerungen der Transduktionsraten um das 10 bis 100-fache, verglichen mit Transduktionen ohne Polybrene-Zusatz. Da die viralen Partikel nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden besitzen und nur durch Diffusion die Rezeptoren ihrer Zielzellen erreichen, muss die Diffusionsstrecke so gering wie möglich gehalten werden. Dies geschieht bei der Transduktion durch eine möglichst geringe Zugabe des Kulturüberstandes auf Zielzellen in der maximalen Wachstumsphase und bedarf der Austestung für die einzelnen Größen der Zellkulturschalen. Die standardmäßig verwendeten 6-well Platten werden in der Regel mit 1 ml Kulturüberstand überschichtet. Die Inkubation der Zielzellen im Zellkultur-Brutschrank für 3-4 h bzw. über Nacht wurde aus Praktikabilitäts-Gründen bei Standard-Bedingungen (37 °C) durchgeführt, obwohl gezeigt wurde, dass Bildung der Virus-Partikel und Transduktion bei niedrigeren Temperaturen (32 °C) effektiver verlaufen.

Materialien:

- Sterilfilter mit Durapore-Membran (Millipore), 0,45 µm Porenweite
- 100x Hexadimethrin-Bromid („Polybrene“) (Sigma-Aldrich):
8 g Polybrene in 10 ml ddH₂O lösen, sterilfiltrieren, Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern
- normales Kulturmedium mit 10 % FCS
- Acetyliertes Trypsin, 100× (0,1 mg/ml):
lyophilisiertes acetyliertes Trypsin (Sigma), FCS-freies DMEM.
1 mg acetyliertes Trypsin-Lyophilisat werden in 10 ml FCS-freiem DMEM gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Durchführung der Transfektion (vergleiche auch 3.3.3.1):

- 48 h vor der Transfektion 5-7,5 x 10⁶ 293T-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen aussäen und die Zellen gleichmäßig in der Schale verteilen.
- Ca. 3 h vor der Transfektion das Medium entfernen, die Zellen mit 10 ml PBS je Schale waschen, um tote Zellen zu entfernen und anschließend wieder 10 ml frisches Medium (DMEM + 10 % FCS (hitzeinaktiviert, 1 h bei 57 °C))dazugeben.
Optional: Für eine effizientere Transfektion sowie dadurch bedingte Virusproduktion kann dem Medium auch Natriumbutyrat in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt werden.
- Gewünschte Plasmidmenge^j mit ddH₂O steril auf 630 µl auffüllen und mit 70 µl 2,5 M CaCl₂ versetzen und gut mischen.

^j DNA-Menge pro Tripel-Transfektion: 24 µg Transfervektor; 18 µg Verpackungsplasmid; 6 µg Hüllexpressionsplasmid plus 6 µg für ein weiteres Hüllexpressionsplasmid im Fall einer Quadruple-Transfektion bei der SeV-F und SeV-HN Pseudotypisierung.

- 700 µl 2 x HBS (pH 7,0) unter leichtem Vortexen der DNA-haltigen Lösung per Hand tropfenweise zupipettieren und DNA-Lösung zur Präzipitatbildung für 25 min bei RT inkubieren.
- Präzipitat kurz vortexen und tropfenweise auf die Zellen pipettieren und gleichmäßig über den Zellrasen durch Schwenken der Zellkulturschale verteilen.
- Transfektionsansatz ü/N auf den Zellen lassen.
- Erneuter Mediumwechsel mit DMEM + 10 % FCS (hitzeinaktiviert) bzw. serumfreies UltraCulture-Medium (Firma: Cambrex) und für 48 h rekombinantes Virus sammeln.
- 48 h nach dem letzten Mediumwechsel das Medium, das die rekombinanten Viren enthält, abnehmen.
- Überstand 5 min mit 3000 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor) bei 4 °C zentrifugieren, und anschließend durch einen 0,45 µm Sterilfilter mit niedriger Proteinbindung (Millipore) filtrieren.
- Transfizierte Zellen entweder erneut mit frischem Medium überschichten, um nochmals Virus-haltiges Medium zu gewinnen oder verwerfen.
- Viralen Überstand sofort zur Transduktion von Zielzellen verwenden (s. u.) oder bei -80 °C lagern.

Durchführung der Transduktion:

- Frischer oder aufgetauter viraler Überstand mit den entsprechenden Volumina 100x Polybrene mischen.
- Kulturmedium von den Zielzellen entfernen und Zielzellen mit 1 ml (bei 6-well-Kulturgefäßen) viralem Überstand^k oder entsprechenden Verdünnungen überschichten.
- 3-4 h bei Standard-Bedingungen (37 °C) im Brutschrank inkubieren und anschließend 1 ml frisches Kulturmedium zugeben
- 48 h nach der Transduktion kann die Auswertung des Transduktionserfolges der entsprechenden Rezipientenzellen begonnen werden.

3.4.2 Ankonzentration rekombinanter Virus-Partikel

3.4.2.1 Ankonzentration mittels Ultrazentrifugation

Materialien:

- 15 ml Falcon-Röhrchen (BD Falcon)
- Sterilfilter 0,45 µm Filterporengröße (Millipore)
- Beckmann 50 Ultra-ClearTM Ultrazentrifugenröhrchen
- DMEM Medium, PBS

^k Viren pseudotypisiert mit dem SeV-F Protein aktivieren mit AcTrypsin (4µg/ml), nicht länger! als 30 min bei 37°C, dann mit hitzeinaktiviertem FCS abstoppen (Endkonz. 1%)

Durchführung:

- Der FIV-Überstand wird geerntet (siehe 3.4.1) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zur Entfernung von größeren Zelltrümmern für 5 min bei 3000 U/min (Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor) zentrifugiert und anschließend mit einem 0,45 µm Filter (Millipore) mit geringen Proteinbindungseigenschaften der Membran filtriert.
- Der filtrierte virushaltige Überstand wird auf Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann 50 Ultra-Clear™-Tubes) der Firma Beckmann mit einem maximalen Fassungsvermögen von 11,5 ml aufgeteilt, austariert und für 2 h bei 4 °C für 20000 U/min in einem SW41 Ti-Ausschwingrotor (Beckmann) zentrifugiert.
Optional: Werden die viralen Partikel im Westernblot auf die Inkorporation viraler Hüllglykoproteine in die Virushülle analysiert, wird der virushaltige Überstand 1-1,5 h bei 4 °C für 30000 U/min zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig mit einer 1000 µl Spitze abgezogen und verworfen. Das Viruspellet wird mit 150 µl frischem DMEM Medium versetzt, 2 h bei 4 °C inkubiert und anschließend 2 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln resuspendiert.

Otional: Wird dagegen das Viruspellet für die Westernblotanalyse eingesetzt, wird diesem lediglich 30-50 µl 4 °C kaltes PBS zugesetzt und die Suspension nach Zugabe von β-Mercaptoethanol-haltigem Ladepuffer und 5 minütigem Aufkochen bei 95 °C für die SDS-PAGE eingesetzt.

- Die resuspendierten Viren pellets werden gepoolt, mit der entsprechenden Menge einer Polybrene-Stammlösung versetzt, sodass eine Arbeitskonzentration des Polybrene in der Virensuspension von 8 µg/ml erreicht wird.
- Die Virensuspension kann nun für die Transduktion der Zielzellen eingesetzt werden.

3.4.2.2 Ankonzentration mittels Ultrafiltration

Mittels der Ultrafiltration lassen sich proteinhaltige bzw. virushaltige Lösungen auf schonende Weise einengen, um die Konzentration eines bestimmten Proteins, wie z.B. die eines Antikörpers oder auch der Titer von Viren erhöhen. Dies geschieht durch eine entsprechend gewählte Ausschlußgrenze der Filtermembran, sodass das jeweilige Protein bzw. Virus zurückgehalten wird, das Lösungsmittel wie Puffer oder Medium jedoch durch die Poren der Filtermembran während eines Zentrifugationsschrittes entweichen kann. Auf diese Weise können biologische Lösungen oder Suspensionen bis zu 200-fach konzentriert werden.

Materialien:

- Centricon® Plus 70 Zentrifugenfiltereinheit (Millipore) mit 100 kDa Ausschlussgrenze
- PBS

Durchführung:

- Die Centricon® Plus 70 Zentrifugenfiltereinheit wird vor der eigentlichen Beladung mit virushaltigem Überstand für 5 min mit PBS gespült, um die auf der Membran befindlichen Glycerolreste zu entfernen. Das Glycerol dient hier lediglich zur Befeuchtung der Filtermembran.
- Nach dem Waschschrift mit PBS kann die Centricon® Plus 70 Zentrifugenfiltereinheit mit bis zu 70 ml virushaltigem Überstand beladen werden.
- Für 1 - 1,5 h wird der virushaltige Überstand bei 3500 xg (Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor) bei 4 °C zentrifugiert bis die gewünschte Konzentration erreicht ist. Das Filtrat kann nun verworfen werden.

- Zur Entnahme des eingeeengten virushaltigen Überstandes in der Centricon® Plus 70 Zentrifugenfiltereinheit, wird diese vom Filtratauffangbehälter entfernt und nun zügig kopfüber auf einen neuen speziell dafür angepassten Auffangbehälter gesteckt, mit einem ähnlichen Gefäß austariert und für 2 min bei maximal 1000 xg zentrifugiert.
- Die nun aufgefangene, eingeeengte Probe kann nun aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder direkt für die Transduktion (3.4.1) eingesetzt werden.

3.4.3 Titerbestimmung mittels Expressionsnachweis der Reportergene *lacZ*, *egfp* und *dsred2*

Die Bestimmung des viralen Titers erfolgt in Abhängigkeit des Reportergens, das im viralen Vektor enthalten ist. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren enthalten zum einen das Gen der *E. coli* β -Galactosidase *lacZ*, das *egfp*-Gen für ein autofluoreszentes Protein aus der Qualle *Aequorea Victoria* und das *dsred2*-Gen, ebenfalls für ein autofluoreszentes Protein aus der Koralle *Discosoma coral*. Um das Ausmaß der Bildung von rekombinanten Viren zu quantifizieren, werden CrFK-Zellen als geeignete Zielzellen mit verschiedenen Verdünnungen des Zellkulturüberstandes der transienten Virusproduzenten zellen versetzt. Zellen, die erfolgreich transduziert werden, integrieren das Genom des rekombinanten FIV-Lentivirus und exprimieren dann das Reportergen. Erfolgt der Transduktionsnachweis mit Hilfe des *lacZ*-Gens, so werden die transduzierten Zellen mit Hilfe einer histochemischen Färbemethode (X-Gal) sichtbar gemacht.

3.4.3.1 Titerbestimmung mittels Nachweis der Expression von β -Galactosidase

Materialien:

- 100 x Hexadimethrin-Bromid („Polybrene“) (Sigma-Aldrich), siehe 3.4.1
- PBS
- Trypsin-Lösung (Gibco)
- Polybrene-Medium:
DMEM + 10 % FCS mit 8 μ g/ml Polybrene
- Paraformaldehyd-Lösung, 4 %:
8 g Paraformaldehyd werden in 150 ml β -gal PBS (s. u.) gelöst (im Abzug) und unter Rühren auf 60 °C erwärmt bis sich das gesamte Paraformaldehyd gelöst hat (die Lösung bleibt leicht getrübt). Abschließend wird mit PBS auf 200 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei 4 °C für ca. einen Monat stabil.
- Glutaraldehyd-Lösung, 25 %, (Sigma-Aldrich)
- β -gal PBS:
150 mM NaCl,
11 mM Na₂HPO₄,
4 mM NaH₂PO₄,
Die Lösung besitzt einen pH-Wert von ca. 7,3 (einstellen nicht erforderlich).
- Fixierlösung:
Die Fixierlösung wird unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt, sterilfiltriert und setzt sich (bezogen auf 100 ml) zusammen aus:
50 ml Paraformaldehyd-Lösung, 4 %,

0,8 ml Glutaraldehyd-Lösung, 25 %,
49,2 ml β -gal PBS

- X-Gal-Stammlösung:
400 mg X-Gal werden in 10 ml DMSO gelöst und lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt.
- $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung, 50 mM:
0,8236 g Kalium-Hexacyanoferrat-Eisen-(III) werden in 50 ml PBS gelöst. Die Lösung wird lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.
- $K_4[Fe(CN)_6]$ -Lösung, 50 mM:
1,056 g Kalium-Hexacyanoferrat-Eisen-(II) \cdot 3H₂O werden in 50 ml β -gal PBS gelöst. Die Lösung wird lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.
- MgCl₂-Lösung, 1 M:
1,017 g MgCl₂ werden in 5 ml bidest. Wasser gelöst.
- Färbelösung:
Die Färbelösung wird direkt vor Gebrauch nach folgendem Schema hergestellt und sterilfiltriert:
77,5 ml β -gal PBS,
10 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung,
10 ml $K_4[Fe(CN)_6]$ -Lösung,
200 μ l MgCl₂-Lösung,
2,5 ml X-Gal-Stammlösung (als letzte Komponente zugeben, da sonst ein schwerlöslicher Niederschlag entsteht).

Durchführung:

- Einen Tag vor Transduktion werden CrFK-Zellen in 6 cm Kulturschalen ausgesät (5×10^5 Zellen pro Kulturschale).
- Die Zellen werden mit verschiedenen Verdünnungen (in Log-Stufen verdünnen (z.B. 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000)) des lentiviralen Überstandes versetzt und für 24 h in Polybrene-Medium kultiviert.
- 48 h nach Transduktion wird das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit β -gal PBS gewaschen.
- Pro 6 cm Schale werden 5 ml Fixierlösung zupipettiert und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Danach werden die fixierten Zellen wiederum zweimal mit β -gal PBS gewaschen.
- Pro 6 cm Schale werden 5 ml Färbelösung aufgegeben und bei 37 °C inkubiert, bis sich die Färbung voll entwickelt hat. Die notwendige Färbedauer kann zwischen 30 min und 12 h liegen. Die gefärbten Zellen können in der Färbelösung bei 4 °C aufbewahrt werden.
- Je nach Effizienz der Transduktion werden von 10 % bis zur kompletten Fläche der Schale ausgezählt.
- Berechnung des Virus-Titers (cfu: *colony forming units*):

Titer in cfu/ml = (Anzahl der Kolonien / Volumen des Virus-Mediums in ml) x Verdünnungsfaktor

3.4.3.2 Titerbestimmung mittels Nachweis der Expression von EGFP und DSRed2

Materialien: siehe 3.4.3.1

Durchführung:

- Einen Tag vor Transduktion werden CrFK-Zellen in 96-well Platten ausgesät (5×10^3 Zellen pro Kavität).
- Die Zellen werden mit verschiedenen Verdünnungen (in Log-Stufen verdünnen (z.B. 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000)) des lentiviralen Überstandes versetzt (100 μ l pro Kavität) und für 24 h in Polybrene-Medium kultiviert.
- 48 h nach Transduktion können die EGFP und DSRed2 exprimierenden Zellen in den jeweiligen Kavitäten unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiovert 35) ausgezählt werden.
- Berechnung des Virus-Titers (cfu: *colony forming units*):

$$\text{Titer in cfu/ml} = (\text{Anzahl der Kolonien} / \text{Volumen des Virus-Mediums in ml}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.4.4 Titerbestimmung retroviraler Vektoren mittels Immunperoxidase-Assay

Die Titerung retroviraler Vektoren kann über die Methode der RTQ-PCR durchgeführt werden. Hierbei erfolgt eine Zählung der Gesamtzahl viraler Partikel pro definiertem Volumen Zellüberstand Virus-produzierender Zellen (siehe 3.2.12.4). Transduzierende Partikel stellen allerdings nur einen Bruchteil der Zahl an gezählten Gesamtpartikeln dar. Genexpressionsanalysen auf Proteinebene spiegeln funktionelle Titer wieder.

Um das Ausmaß der Bildung von rekombinanten Retroviren im Zuge der transienten Virusproduktion zu quantifizieren werden NIH 3T3-Zellen als geeignete Zielzellen mit verschiedenen Verdünnungen des Zellkulturüberstands der Produzentenzellen versetzt. Der Nachweis der mit RCR-Vektoren infizierten Zellen geschieht über die histochemische Färbemethode des anti-MoMLV-p30-Immun-Peroxidase Assays (IPA). Das Prinzip dieses Assays besteht im Nachweis des Nucleocapsidproteins p30 von MoMLV, das in einer einmal infizierten Zelle, die aufgrund der Replikationskompetenz der verwendeten Vektoren zu einer neuen Virus-produzierenden Zelle wird, in großen Mengen ausschließlich im Zytoplasma vorliegt.

Materialien:

- Materialien für Transduktion, siehe 3.4.1:
- Poly-L-Lysin (50 μ g/ml)
- Methanol
- PBS
- Primärantikörper: anti-p30 Ziegen-Serum (1:1000 in 1 % BSA-PBS verdünnt)
- Sekundärantikörper: Peroxidase-gekoppelter Kaninchen anti-Ziege Antikörper (1:1000 in 1 % BSA-PBS verdünnt)

- Farbstofflösung:
3-Amino-9-ethyl-carbazol
Dimethylformamid
6 mg 3-Amino-9-ethyl-carbazol werden in einem Glasgefäß in 1,5 ml Dimethylformamid gelöst.
- Färbelösung:
3 M Natriumacetat
Farbstofflösung
30 % H₂O₂
9,5 ml H₂O werden mit 66 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 500 µl Farbstofflösung versetzt. Nach Sterilfiltrieren der Lösung zur Kristallentfernung werden 50 µl 30 % H₂O₂ zugefügt.

Zwei Tage vor Transduktion werden die Kavitäten von 24-well Platten mit je 300 µl Poly-L-Lysin-Lösung überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch diese Behandlung wird eine bessere Zelladhärenz erreicht, was die Gefahr einer Ablösung der Zellen während der zahlreichen Waschschriffe des Assays minimiert.

Einen Tag vor Transduktion werden NIH 3T3-Zellen ausgesät ($2,5 \times 10^4$ Zellen/well). Die Zellen werden mit verschiedenen Verdünnungen des retroviralen Überstandes versetzt und für 24 h in Polybrene-Medium kultiviert.

Nach 3 Tagen werden die Zellen mit Methanol überschichtet und 30 min bei -20 °C fixiert. Nach Trocknung werden unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation der Zellen mit in PBS gelöstem BSA (2 %) bei 37 °C blockiert. Die Zellen werden 1 h bei 37 °C mit dem anti-p30-Antikörper (Primärantikörper) inkubiert. Dabei bindet der Antikörper dort, wo sich infizierte Zellen bzw. aus diesen hervorgegangene Zellkolonien befinden. Anschließend wird 3 x mit PBS Puffer gewaschen, um überschüssigen, nicht gebundenen Primärantikörper auszuwaschen. Es folgt eine einstündige Inkubation mit der Sekundärantikörperlösung. Beim Sekundärantikörper handelt es sich um einen Peroxidase-gekoppelten Antikörper, der den Fc-Teil des Primärantikörpers als Antigen erkennt. Nachdem Reste durch 3 x Auswaschen mit PBS Puffer entfernt sind, werden die Zellen noch 10 min in PBS inkubiert. Die Kavitäten werden mit Färbelösung überschichtet und unter dem Mikroskop infizierte Zellen bzw. Zellkolonien ausgezählt. Die Färbereaktion wird durch Entfernung der Färbelösung abgestoppt.

Berechnung des Virus-Titers:

Titer in cfu/ml = (Anzahl der Kolonien / Volumen des Virus-Mediums in ml) x Verdünnungsfaktor

3.4.5 Test der Funktionalität der RCR-Vektoren durch SRB-Cytotoxizitätsassays

Zur Untersuchung der Funktionalität der durch entsprechende RCR-Vektoren vermittelten Suizidgenaktivität müssen Zielzellen (HepG2, Hep3B) zunächst mit den jeweiligen viralen Vektoren infiziert werden. Mittels SRB-Vitalitätsassays wird die Suizidgen-vermittelte Abtötung der RCR-infizierten Zellen quantifiziert¹⁵⁷.

Materialien:

- Materialien für Transduktion, siehe 3.4.1:
- 50 mM 5-FC-Stammlösung (Roche)
- PBS-Puffer

- Fixierlösung: 10 % (w/v) TCA
100 g Trichloressigsäure werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.
- Waschlösung: 1 % (v/v) Essigsäurelösung
10 ml konz. Essigsäure (Eisessig) werden mit 990 ml bidest. Wasser gemischt.
- Färbelösung: 0,4 % (w/v) SRB
0,4 g Sulforhodamin B (Sigma Aldrich) werden in 100 ml 1 % Essigsäurelösung gelöst.
- Extraktionslösung: 10 mM Tris-Base (pH 10,5)
1,211 g Tris-Base werden in 1 l bidest Wasser gelöst; Extraktionslösung ist eine ungepufferte Lösung, d.h. der pH-Wert wird nicht eingestellt.

Zwei Tage vor Transduktion werden die zu transduzierenden Zielzellen (HepG2, Hep3B, BHK) in die Kavitäten von 24-well Platten ausgesät ($2,5 \times 10^4$ Zellen/well). Die Zellen werden mit dem gereinigten und Polybrene-haltigen retroviralen Überstand inokuliert. 48 h nach der Transduktion erfolgt die Zugabe der CD-spezifischen „*prodrug*“ 5-Fluorcytosin (5-FC) in unterschiedlichen Konzentrationen. Zwei Tage später erfolgt eine Erneuerung der 5-FC-Lösungen. Mittels SRB-Vitalitätsassays wird die Suizidgen-vermittelte Abtötung der RCR-infizierten Zellen fünf Tage nach Beginn der 5-FC-Applikation quantifiziert. Die Cytotoxizitätsinkubation wird beendet, indem die 24-well Platten auf Eis gestellt, tote Zellen mit kaltem PBS Puffer ausgewaschen und überlebende Zellen durch 30-minütige Inkubation in TCA-Lösung bei 4 °C fixiert werden. TCA-Reste werden in einem viermaligen Waschvorgang mit Leitungswasser ausgewaschen und die fixierten Zellen über Nacht bei 37 °C getrocknet. Die Zellen werden durch Überschichtung mit je 250 µl SRB-Farbstoff 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Ungebundener Farbstoff wird durch mehrmaliges Waschen mit 1 % Essigsäure entfernt und die gefärbten Zellen 6 h bei 37 °C getrocknet. Protein-gebundener Farbstoff wird durch 10-minütige Inkubation auf Eis mit 10 mM Tris-Base extrahiert. Pro 24-well Kavität werden drei 80 µl umfassende Aliquots auf eine 96-well Platte transferiert und im ELISA-Reader (Dynatech MR7000) bei 550 nm vermessen und ausgewertet. Je geringer die vermessene optische Dichte ausfällt, desto kleiner ist die Zahl überlebender Zellen und desto größer der cytopathische Effekt. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz an gefärbten Zellen, die die 5-FC-Applikation überlebt haben, und der vermessenen optischen Dichte nach Freisetzung bzw. Extraktion des SRB-Farbstoffs aus den Zellen. Diese lineare Beziehung gilt für OD-Werte unter 1,8.

3.4.6 Hämagglutinations (HA)-Test als Nachweissystem für das SeV-HN Protein

Sendai Virus (murines Parainfluenzavirus, Typ 1), das bei Mäusen Pneumonien hervorruft, gehört zur Gruppe der Paramyxoviren, die ein Minus-Strang-RNA-Genom besitzen. Das SeV besitzt zwei Hüllproteine, F und HN. Das F-Protein ist notwendig für das Eindringen des Virus in die Zelle und muss hierzu durch Trypsinspaltung (bzw. durch Spaltung mit einem Enzym mit Trypsin-ähnlicher Spezifität) aktiviert werden, wodurch eine hydrophobe Sequenz des Proteins zugänglich wird. Für die Virusreifung ist die Spaltung nicht notwendig, komplette Viruspartikel können auch nachträglich enzymatisch aktiviert werden. Das HN-Protein ist zuständig für die Bindung des Virus an die Zelloberfläche und besitzt weiterhin Hämagglutinations- und Neuraminidase-Aktivität. Da das HN-Protein an einen ubiquitären Rezeptor bindet (Sialinsäure-haltige Ganglioside), können aktivierte Wildtyp-Viren eine große Anzahl verschiedener Zelltypen infizieren. Eine wirksame Virusvermehrung ist aber abhängig vom Vorliegen einer Trypsin-ähnlichen Protease, da nur dann mehrere Vermehrungszyklen durchlaufen werden können.

Dieser Test macht keine Aussage über die Anzahl infektiöser SeV-Partikel, sondern nur über die Anzahl HN-tragender Partikel und kann somit als HN-Einbaunachweis für HN-pseudotypisiertes FIV dienen. Das Prinzip des Tests ist die Bindung des HN-Proteins an humane Erythrozyten der Blutgruppe 0. Dadurch dient HN-pseudotypisiertes FIV als Quervernetzter, was sich in einer Verklumpung der Erythrozyten auswirkt.

Durchführung:

- In einer 12-well Platte werden die zu testenden viralen Überstände 1:1 mit einer 1 % Erythrozyten-Suspension vermischt.
- Die 12-well Platte wird für max. 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop (Zeiss, Axiovert 35) ausgewertet, ob eine Hämagglutination stattgefunden hat.

3.5 Proteinchemische Materialien und Methoden

3.5.1 Zellaufschluß

Zur Gewinnung des Gesamtproteins aus kultivierten, adhärennten Zellen werden diese mechanisch (also nicht enzymatisch, um eine Schädigung von Membran- und Matrixproteinen zu vermeiden) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Anschließend erfolgt zur Freisetzung der zellulären Proteine ein Zellaufschluß, wobei je nach interessierender Proteinfraktion und/oder experimenteller Methode verschiedene Lysepuffer zum Einsatz kommen. Im Gegensatz zur Isolierung von Proteinen aus Geweben oder Organen ist die Gefahr eines Proteasen-vermittelten Abbaus der freigesetzten Proteine sehr viel geringer, so daß dem Lysepuffer in der Regel keine Proteasehemmer zugesetzt werden müssen.

Materialien:

- Lysepuffer:
150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,6
2 mM PMSF
1 % (w/v) Nonidet P40

Durchführung:

- Zunächst Zellen mit PBS waschen, mit einem Costar-Zellschaber (Nunc) vom Flaschen- bzw. Schalenboden ablösen und in 15 ml Röhrchen überführen.
- 10 min bei 800 xg bei 4 °C zentrifugieren, Überstand abnehmen und verwerfen.
- Zellsediment in Lysepuffer aufnehmen (z.B. 500 µl für die Zellen einer 10 cm Schale) und in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführen.
- Um ein homogenes Lysat zu erhalten, Zellsuspension unter Kühlung auf Eis oder Trockeneis 10 bis 20 x durch eine dünne Kanüle (0,9 x 70 mm) aufziehen.
- Zur Abtrennung von Zelltrümmern das Lysat für 10 min mit 15000 xg bei 4 °C zentrifugieren.
- Nur den Überstand weiterverwenden und in ein frisches, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführen.
- Lagerung der gewonnenen Lysate bei -80 °C.

3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode²⁰ basiert auf der Eigenschaft von Coomassie brilliantblue G250, daß es nach Bindung des Farbstoffs an Proteine zu einem (konzentrationsabhängigen) Farbumschlag von braun nach blau kommt. Die Bindung erfolgt hauptsächlich an basische (speziell Arginin) und aromatische Aminosäure-Reste. Zu beachten ist, daß zahlreiche Substanzen, insbesondere Detergentien, diesen Test stören können. Für die in den oben beschriebenen Lysepuffern enthaltenen Komponenten gelten die in Tabelle 3-8 aufgeführten Konzentrationsgrenzen. Um eine Störung des Tests zu vermeiden, müssen die Proben ggf. verdünnt oder vor der eigentlichen Proteinbestimmung mit TCA gefällt und in PBS resuspendiert werden.

Komponente	maximale Konzentration
EDTA	2,5 mM
NaCl	125 mM
Natrium-Desoxycholat	0,0025 %
Nonidet P40	nicht bekannt
Tris-HCl	50 mM
Triton X100	0,0025 %

Tabelle 3-8: Mit der Proteinbestimmung nach Bradford interferierende Substanzen¹

Materialien:

- Bradford-Reagenz:
100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 werden in 47,5 ml EtOH (100 %, unvergällt) gelöst. Dann werden 100 ml Phosphorsäure (85 %) zugegeben, und die Lösung mit bidest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei 4 °C ca. ein Jahr haltbar.
- Proteinstandards:
BSA in den Konzentrationen 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,25 mg/ml, gelöst in Detergentien-freiem Lysepuffer. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20 °C.

Durchführung:

- Von den interessierenden Zellysaten werden jeweils 10 µl einer 1:10, 1:5 und 1:2 Verdünnung hergestellt. Diese Verdünnungen bzw. je 10 µl der Standards werden mit je 400 µl Bradford-Reagenz versetzt. Je 200 µl werden für Doppelbestimmungen in die Kavitäten einer ELISA-Platte gegeben. Als Leerwert dient Detergentien-freier Lysepuffer (10 µl + 200 µl Bradford-Reagenz je Kavität).
- Die Platte wird im ELISA-Reader (Dynatech MR7000) bei 600 nm vermessen und ausgewertet (Berechnung der Eichgerade und Bestimmung der Probenkonzentrationen).

3.5.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Bei dem verwendeten elektrophoretischen Verfahren⁹⁰ erfolgt die Trennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen (Anwesenheit von SDS und β -Mercaptoethanol), wobei eine Kombination von zwei Geltypen eingesetzt wird: Zum einen ein großporiges Sammelgel, in welchem die Proteine konzentriert und zu einer scharf begrenzten Zone gesammelt werden, zum anderen ein darunter liegendes kleinporiges Trenngel, in welchem die Proteine nach Molekulargewicht getrennt werden. Als Gelmaterial kommt Polyacrylamid zum Einsatz. Das Trennvermögen dieser

¹ Die Angaben stellen Endkonzentrationen (Konzentration im Gemisch aus Probe und Reagenz) dar und beziehen sich auf eine Mikrotiterplattenbestimmung bei der 10 µl Proteinprobe und 200 µl Bradford-Reagenz eingesetzt werden.

diskontinuierlichen Elektrophorese beruht auf der Kombination des Molekularsiebeffekts mit einem Konzentrierungseffekt. Letzterer wird dadurch verursacht, dass sich in Trenn- und Sammelgel andere Ionen (Leitionen: Chlorid-Anionen) als in den Elektrodengefäßen (Folgeionen: Glycinat^m) befinden und der pH-Wert im Sammelgel niedriger als im Elektrodenpuffer und im Trenngel ist. Die effektive Beweglichkeit aller an der Elektrophorese beteiligten Ionen verhält sich dabei wie folgt: Leitionen > Proteine > Folgeionen. Bei Anlegen einer Gleichspannung wandern die Leitionen infolge ihrer hohen Beweglichkeit den Proteinen und Folgeionen im Sammelgel voraus und hinterlassen eine Zone geringerer Leitfähigkeit. Dadurch steigt die Feldstärke, was wiederum eine Beschleunigung der Proteine und Folgeionen hervorruft. Da die Proteine nicht schneller wandern als die Leitionen, andererseits von den Folgeionen nicht überholt werden können, entsteht eine schmale, konzentrierte Proteinschicht. Beim Übergang vom Sammel- zum Trenngel nimmt – infolge des alkalischeren pH-Wertes im Trenngel – die Beweglichkeit der Folgeionen stark zu und erreicht die Beweglichkeit der Leitionen. Damit wandern im Trenngel Leit- und Folgeionen der Proteinschicht voraus. Die Trennung der Proteine erfolgt in Anwesenheit von SDS und β -Mercaptoethanol, also unter denaturierenden Bedingungen, hauptsächlich nach der Größe der Proteine. SDS als starkes Detergenz zerstört alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen, während mit Hilfe von β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduziert werden. Weiterhin binden die SDS-Anionen an die Proteinkette und zwar ein SDS-Anion je zwei Aminosäure-Reste, so daß ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Zahl der Aminosäure-Reste und damit dem Molekulargewicht ungefähr proportional ist. Die durch das gebundene SDS hervorgerufene negative Ladung „überdeckt“ im Regelfall die ursprüngliche Nettoladung des Proteins bei weitem, so daß diese bei der Auftrennung keine Rolle mehr spielt.

Materialien:

- Materialien, Acrylamid/Bisacrylamid (30 %):
Rotiphorese Gel 30 (Roth), gebrauchsfertig.
- Tris-HCl, 1 M (pH 8,7) für Trenngel:
60,55 g Tris Base werden in 400 ml bidest. Wasser gelöst, der pH mittels conc. HCl auf 8,7 eingestellt und die Lösung auf 500 ml aufgefüllt.
- Tris-HCl, 1 M (pH 6,8) für Sammelgel:
12,11 g Tris Base werden in 80 ml bidest. Wasser gelöst, der pH mittels conc. HCl auf 6,8 eingestellt und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt.
- SDS (20 %):
28,84 g SDS werden in 100 ml bidest. Wasser gelöst.
- Elektrophoresepuffer (5 ×):
15,1 g Tris Base,
94 g Glycin,
10 g SDS,
werden in 900 ml bidest. Wasser gelöst, der pH auf 8,3 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt (Eine 10 × Lösung kann aufgrund der mangelnden Löslichkeit des Glycins nicht angesetzt werden!).
- APS-Stammlösung (10 %):
1 g APS in 10ml bidest. Wasser. Die Stammlösung wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert Die Lösung ist bei -20 °C praktisch unbegrenzt haltbar, die Aliquots sollten aber nur einmal aufgetaut werden.
- Probenpuffer (2×):
1 ml Tris (1 M, pH 6,8),
2 ml Glycerol,
2 ml SDS (20 %)

^m Glycin ist ein Zwitterion und der Ladungszustand demzufolge stark pH-abhängig.

werden mit bidest. Wasser auf 9 ml aufgefüllt und mit 2 mg Bromphenolblau versetzt. Unmittelbar vor Gebrauch wird der benötigten Menge 10 % β -Mercaptoethanol zugesetzt (entspricht 100 mM Tris, pH 6,8, 20 % Glycerol, 4 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau, 10 % β -Mercaptoethanol).

- Molekulargewicht-Standards:
Low Weight Protein Marker (Boehringer Mannheim),
Full Range Recombinant Protein Marker (Amersham).

Gießen des Gels:

- Vorarbeiten:
Für 16 × 18 cm Gele (1 mm dick) werden die entsprechenden Glasplatten (Ohren- und Spacerplatten) je 2× mit EtOH (80 %) und bidest. Wasser gereinigt (Kimwipes, fusselfrei verwenden). Auf die Spacerplatte wird erst die Silicondichtung dann die Ohrenplatte aufgelegt und der Sandwich mit den entsprechenden Klammern fixiert.
- Gießen des Trenngels (10 %):
Für zwei große Gele werden benötigt:
24 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %/0,8 %),
17,8 ml bidest. Wasser,
27 ml 1M Tris-HCl (pH 8,7),
300 μ l SDS (20 %),
300 μ l APS (10 %),
30 μ l TEMED.

Nach Zugabe der beiden letzten Komponenten wird jeweils kurz gemischt und die Gele sofort gegossen. Direkt nach dem Gießen wird die Flüssigkeit mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet, um einen geraden Gelrand zu erhalten. Nach ca. 1 h wird vom polymerisierten Trenngel das n-Butanol abgegossen und mit bidest. Wasser nachgespült, verbliebene Flüssigkeitsreste werden mit Whatman 3MM Filterpapier abgesaugt.

- Gießen des Sammelgels (5 %):
3,6 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %/0,8 %),
15,5 ml bidest. Wasser,
2,8 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8),
110 μ l SDS (20 %)

werden zusammengeben, die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von 110 μ l APS (10 %), 12 μ l TEMED gestartet und die polymerisierten Trenngele mit der Sammelgellösung überschichtet. Direkt nach dem Gießen werden die Probenkämme eingesetzt. Nach ca. 1–2 h ist die Polymerisierungsreaktion vollständig und die Gele können mit den Proben beladen werden.

Gel-Lauf:

- Vorarbeiten:
Der Kamm wird entfernt, und die eventuell vorhandenen Gelreste vorsichtig aus den Taschen mit bidest. Wasser ausgewaschen. Dann wird der Gelsandwich in die Gelkammer (Biometra) eingebaut. Vor dem Probenauftrag werden die Probenaschen mit Laufpuffer gespült und Luftblasen am unteren Gelrand entfernt.
- Probenvorbereitung:

Die benötigten Zellysate werden aufgetaut und jeweils die gewünschte Menge entnommen. Alle Proben sowie der Molekulargewichtsstandard werden mit Lysepuffer auf das gleiche Volumen gebracht und mit der

entsprechenden Menge Probenpuffer (2 ×) versetzt. Die Proben werden für 10 min bei 90 °C inkubiertⁿ und anschließend aufs Gel aufgetragen.

- Der Probeneinlauf erfolgt mit konstanter Spannung (50–80 V), die Auftrennung der Proben bei 100–120 V über Nacht. Die Elektrophorese wird abgebrochen, wenn die Bromphenolblau-Bande die untere Gelgrenze erreicht hat.

3.5.4 Western Blotting

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde in Analogie zu den DNA- und RNA-Nachweisverfahren Southern- und Northern-Blotting eine Methode entwickelt, die als Western Blotting bezeichnet wird^{25,179}. Hierbei werden die Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld vom Gel auf eine Trägermembran übertragen (das eigentliche Blotting). Die immobilisierten Proteine werden mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Durchgesetzt haben sich nicht-radioaktive Methoden, bei denen ein sekundärer Antikörper – der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist – verwendet wird, der mit einem Enzym gekoppelt ist, das eine leicht detektierbare Reaktion katalysiert (siehe 3.5.4.2).

3.5.4.1 Wet-Blotting

Materialien:

- Blotpuffer (Towbin-Puffer):
2,42 g Tris (Endkonzentration: 48 mM)
11,26 g Glycin (Endkonzentration: 39 mM)
mit 700 ml ddH₂O versetzen, pH auf 8,3 einstellen;
dann 200 ml Methanol zusetzen (Endkonzentration: 20 % (v/v)), mit ddH₂O auf 1 l auffüllen
- PVDF-Membran (Hybond P; Amersham Pharmacia Biotech)

Durchführung:

- Vorbereitung der PVDF-Membran:
Membran vollständig mit Methanol benetzen, dann 5 min in ddH₂O zum Entfernen des Methanols unter leichtem Schütteln einweichen, dabei Wasser 2 bis 3 mal wechseln, abschließend für 15 min in Blotpuffer einweichen (darauf achten, dass die hydrophobe PVDF-Membran immer vollständig benetzt ist).
- Zusammenbau des Blot-Sandwichs:
3 Whatman 3MM-Filterpapiere auf Gelgröße zuschneiden und in Blotpuffer einweichen; Blot-Sandwich zusammenbauen: auf den schwarzen Teil der Schmetterlings-Kassette in Blotpuffer getränktes Schwamm, darüber 2 ebenfalls getränkte Whatman-Papiere auflegen; Trenngel auf ein mit Blotpuffergetränktes Whatman Papier überführen und schnell luftblasenfrei auf die Whatman-Papiere auflegen; dann die vorbereitete Membran schnell luftblasenfrei auf das Trenngel auflegen; die PVDF-Membran nie trocknen lassen; wegen der einsetzenden Bindung der Proteine an die Membran nach Möglichkeit nicht mehr nachträglich gegen das Gel verschieben; abschließend ein weiteres getränktes Whatman-Papier auflegen, Schwamm hinzufügen und die Kassette schließen.

ⁿ Full Range Recombinant Molekulargewichtsstandard sollte weder mit Probenpuffer versetzt noch erhitzt werden, da dies die an die Proteine gekoppelten Farbstoffe zerstört. Damit geht der entscheidende Vorteil dieses Markers verloren, nämlich die Sichtbarkeit der Proteinbanden sowohl im Gel als auch auf der Membran nach erfolgtem Proteintransfer.

- Proteintransfer (Blotting):
Wet-Blot-Apparatur (BioRad Trans-Blot™ Cell) mit vorgekühltem Blotpuffer füllen, Blot-Sandwich überführen und Proteinproben für mindestens 90 min bei 400 mA und 4 °C blotten.

3.5.4.2 ECL-Detektionssystem

Das *Enhanced Chemiluminescence System* (ECL) ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von immobilisierten Antigenen, die direkt oder indirekt mit Meerrettich-Peroxidase (HPR) konjugiertem Antikörper markiert werden. HPR und H_2O_2 katalysieren die Oxidation von Luminol, einem cyclischen Diacylhydrazid. Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand und geht unter Lichtemission (428 nm) wieder in den Grundzustand über. Die Lichtemission wird mittels Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Die Oxidationsreaktion findet in Anwesenheit von chemischen Verstärkern, z.B. Phenol, statt, die die Lichtemission um das 100-fache erhöhen und die Emissionszeit verlängern. Die Chemolumineszenz erreicht ca. 5 min nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission, dann fällt die Signalstärke langsam ab. In Abbildung 3-5 ist das Funktionsprinzip des ECL-Systems schematisch dargestellt.

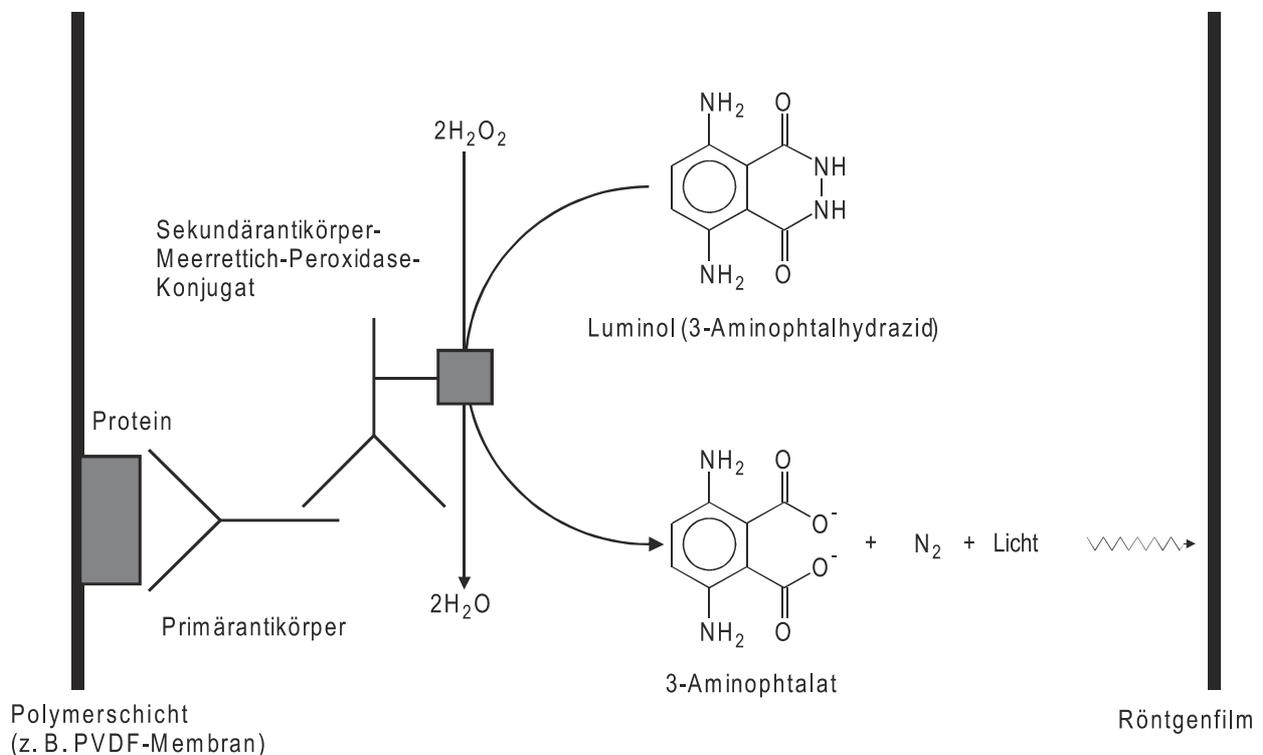


Abbildung 3-5: Prinzip der ECL-Detektion.

An das immobilisierte Protein bindet der für das zu detektierende Protein spezifische Primärantikörper. Dessen Fc-Teil wird vom Sekundärantikörper erkannt, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Diese setzt das Substrat Luminol in einer lichterzeugenden Reaktion um. Die Lichtemission wird mit Hilfe eines Films detektiert. (Abbildung nach Spiegel, 2000)

Materialien:

- TBS:
 150 mM NaCl (8,76 g/l),
 13 mM Tris (1,57 g/l),
 werden in 900 ml bidest. Wasser gelöst auf pH 7,5 gebracht (am pH-Meter mit HCl, 32 % einstellen) und auf 1000 ml aufgefüllt.

- TBS-T:
1 l TBS, pH 7,5 werden mit 0,02 % Triton X-100 (200 µl) versetzt.
- Block-Lösung:
Rotiblock-Konzentrat (Roth) 1:10 in bidest. Wasser verdünnt (50–100 ml pro Blot).
- Primärantikörper:
Die Antikörper-Lösung wird im gewünschten Maße in Block-Lösung verdünnt (10–20 ml pro Blot).
- Sekundärantikörper (Antikörper-HRP-Konjugat, Amersham):
Die Antikörper-Lösung wird im gewünschten Maße in Block-Lösung verdünnt (10–20 ml pro Blot).
- ECL-Detektionslösungen 1 und 2:
Fertiglösungen von Amersham.
- ECL-Hyperfilm (Amersham)

Durchführung:

- Blocken der Membran:
Membran für 1 h bei RT unter Schütteln in 50-100 ml Block-Lösung inkubieren; anschließend Block-Lösung verwerfen.
- Bindung des primären Antikörpers:
Antikörper-Verdünnung unmittelbar vor Gebrauch herstellen und auf die geblockte Membran geben, bei RT für 1 h inkubieren; die Antikörper-Verdünnung kann mehrfach verwendet werden, Lagerung bei 4°C.
- Waschen:
Antikörper-Lösung entfernen; nicht an die Membran gebundene Immunglobuline durch Waschen mit TBS-T entfernen: 3 x 10 min mit je 50 ml TBS-T waschen.
- Bindung des sekundären Antikörpers:
Antikörper-HRP-Konjugat-Verdünnung unmittelbar vor Gebrauch herstellen und auf die gewaschene Membran geben, bei RT für 1 h unter Schütteln inkubieren.
- Waschen:
Antikörper-Lösung entfernen; Membran 6 x 10 min mit je 50 ml TBS-T waschen.
- Detektion:
Je 7,5 ml ECL-Reagenz 1 und 2 mischen; gewaschene Membran auf einen aufgeschnittenen Vernichtungsbeutel (Brand) überführen; ECL-Mischung auf die Membran geben und für 60 sec inkubieren; überschüssiges Reagenz durch Abtropfen entfernen, dann Beutel zuklappen, Luftblasen entfernen und Beutel in Filmkassette überführen; in der Dunkelkammer ECL-Hyperfilm auflegen; mit 15 sec Belichtungszeit beginnen, dann Film entwickeln; anhand der Intensität der Banden Belichtungszeit für ein optimales Ergebnis abschätzen und Belichtung sowie Entwicklung wiederholen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines lentiviralen Gentransfersystems auf Basis des Felinen Immundefizienz Virus (FIV)

4.1.1 Initiale Virusproduktion

Zur Etablierung eines lentiviralen Gentransfersystems auf Basis des Felinen Immundefizienz Virus (FIV) der 1. Generation wurden vier Basiskonstrukte für eine Calcium-Phosphat-Tripeltransfektion eingesetzt (siehe Abbildung 4-1). Die transiente Virusproduktion erfolgte in transformierten humanen embryonalen Nierenzellen (293T), welche das *large T-Antigen* von SV40 exprimieren, durch Tripeltransfektion von (i) FIV *gag, pol* Expressionsplasmid bzw. Verpackungsplasmid, (ii) Vektorplasmid und (iii) *VSV-G* Hüllproteinexpressionsplasmid. Alle Konstrukte besitzen eine *large T*-Bindungsstelle, die eine effiziente Replikation der Plasmide in 293T-Zellen erlauben. Da die FIV-LTR gesteuerte Expression viraler Komponenten in nicht-felinen Zellen extrem schwach ist^{117,160}, erfolgt sowohl die Expression der viralen Strukturgene im Verpackungsplasmid bzw. Hüllexpressionsplasmid als auch die der Reportergene *lacZ* und *egfp* im Transfektor unter Kontrolle des hCMV-Promotors.

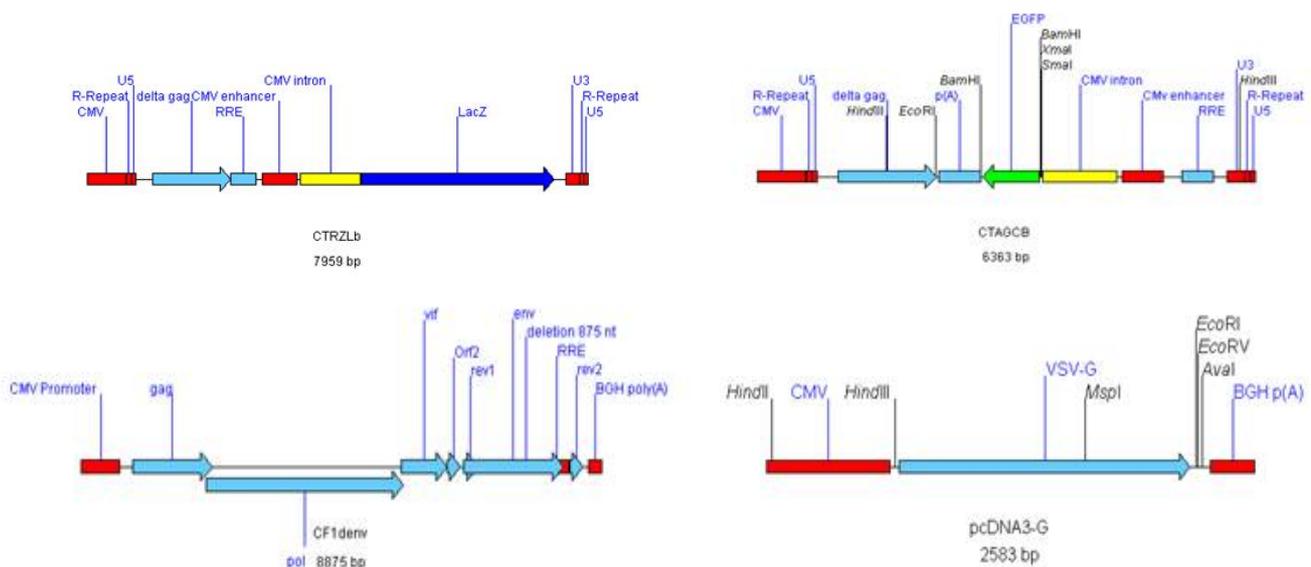


Abbildung 4-1: Ausgangsplasmide für die Generierung rekombinanter FIV-Partikel pseudotypisiert mit dem Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G)

Lentivirales Vektorplasmid CTRZLb & CTAGCb: enthält das rekombinante Genom von FIV und kodiert für die β -Galaktosidase bzw. EGFP als Reportergen.

Verpackungsplasmid CF1 Δ env: kodiert für die viralen Strukturproteine gag und pol.

Hüllexpressionsplasmid pcDNA3-G: kodiert für das Hüllglykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G).

Als kritische Parameter bezüglich der erreichbaren Titer erwies sich die Wahl der Transfektionsmethode sowie die verwendete Zelllinie, da die transkriptionelle Aktivität des hCMV-Promotors bei unterschiedlichen Zelltypen zu einer unterschiedlich starken Expression führt⁵¹.

Im Vergleich zur Liposomen-Transfektions-Methode ergaben die Calcium-Phosphat-Transfektionen begleitet von einer Stimulation des CMV Promotors mittels Natriumbutyrat die besten Ergebnisse. Dabei wurden die mit Abstand besten Virus-Titer mit durchschnittlich über 1×10^6 cfu/ml bei einer Natriumbutyratkonzentration von 10 mM erzielt (siehe Abbildung 4-2). Die so generierten VSV-G pseudotypisierten Viruspartikel sind anschließend durch Ultrazentrifugation weitgehend ohne Funktionsverlust aufkonzentrierbar und in der Lage, ein breites Spektrum verschiedener Zelltypen effizient zu transduzieren (u. a. 293T, HepG2 und Huh7).

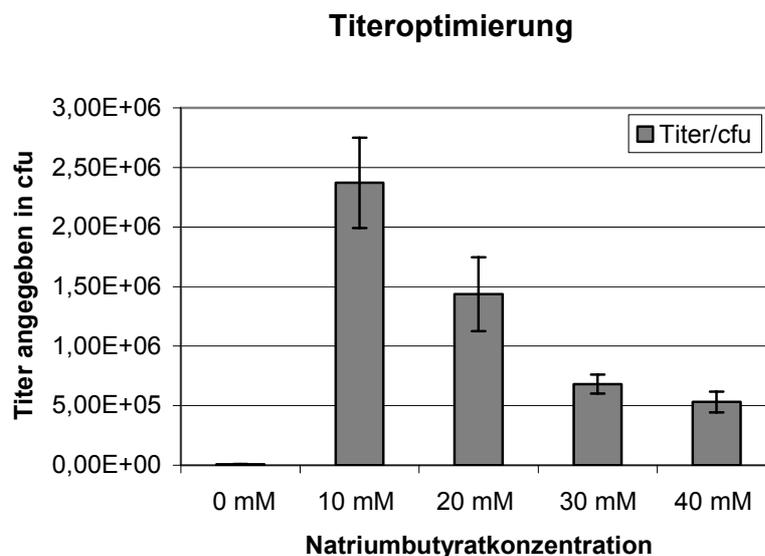


Abbildung 4-2: Erzielte Virustiter in Abhängigkeit von der eingesetzten Natriumbutyrat-Konzentration

Mit den etablierten Transfektionsbedingungen wurde durch Tripeltransfektion von 293T Zellen mit den Plasmiden CTRZLb, CF1 Δ env und pcDNA3-G rekombinante FIV-Partikel erzeugt. Der Virusüberstand wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) zur Transduktion von CRFK-Zellen (feline Nierenzelllinie) eingesetzt. 48 h nach Transduktion erfolgte ein histochemischer Nachweis der β -Galactosidase Expression mittels X-gal Färbung mit anschließender Auszählung der gefärbten Zellen zur Bestimmung des Virustiters (angegeben in *colony forming units* (cfu) pro ml). Die besten Ergebnisse wurden mit einer Konzentration von 10 mM Natriumbutyrat erhalten. Der erzielte Virus-Titer belief sich hierbei auf $2,37 \times 10^6$ cfu/ml. Höhere Konzentrationen an Natriumbutyrat führen zu einem zunehmenden Absterben der transfizierten 293T Zellen.

4.1.2 Optimierung des lentiviralen Gentransfersystems

Für weitere Modifizierungen der lentiviralen Transferplasmide wurde das Plasmid CTRZLb als Ausgangskonstrukt gewählt, da hier im Gegensatz zu CTAGCb der CMV Promotor gefolgt vom CMV Intron *in sense*, also in 5'-3' Richtung vorliegt. Diese Tatsache erleichterte die weiteren Klonierungsschritte, wie z. B. den Austausch des ursprünglichen Reportergens *lacZ* ohne zusätzlichen Austausch des CMV-Promotors. Um die Ausgangsbedingungen für einen einfachen Reportergenaustausch zu schaffen, wurden stromaufwärts und stromabwärts des *lacZ*-Gens flankierende, singuläre Restriktionsschnittstellen mittels Mutagenese eingefügt. Mittels Mutageneseprimer, die die gewünschten Punktmutationen aufwiesen, konnten an den zuvor ausgewählten Stellen im Plasmid die Restriktionsschnittstellen AgeI 5' und AscI 3' vom *lacZ*-Gen eingefügt werden (siehe Abbildung 4-3). Die 5'-AgeI Schnittstelle hat die Erkennungssequenz *accggt*; um diese Erkennungssequenz im Transfervektor CTRZLb zu generieren, wurden lediglich zwei Basen in der originären Sequenzabfolge mittels Mutageneseprimer getauscht. Die 3'-AscI Schnittstelle mit der Erkennungssequenz *ccgcgcg* wurde auf dieselbe Weise generiert (durch den Austausch von ebenfalls nur zwei Basen in der Ausgangssequenz).

Mutagenese von CTRZLb → Einfügen der 5'-AgeI-Schnittstelle

```
fiv-age1-rev          3' aaagacgtcagtggcacagcttogaata 5'
ctrzlb               5' tcctttccatgggtctttctgcagtcaccgctgcgaagcttatgaccatgattacgga 3'
ctrzlb               3' aggaaaggtaccagaaaagacgtcagtggcacagcttogaataactggtactaatgcct 5'
fiv-age1-for         5' tttctgcagtcaccgctgcgaagcttat 3'
```

Mutagenese von CTRZLb → Einfügen der 3'-AscI-Schnittstelle

```
fiv-asc1-rev         3' cttcgataaacccgctggaagatggtgc 5'
ctrzlb               5' tagaagatcgcttcaggaagctatctggcaccgcttctacaacgggagacagcacagtaga 3'
ctrzlb               3' atcttctagcgaagtccttcgataaacccgctggaagatggtgcctctgtcgtgcatct 5'
fiv-asc1-for         5' gaagctatctggcaccgcttctacaacg 3'
```

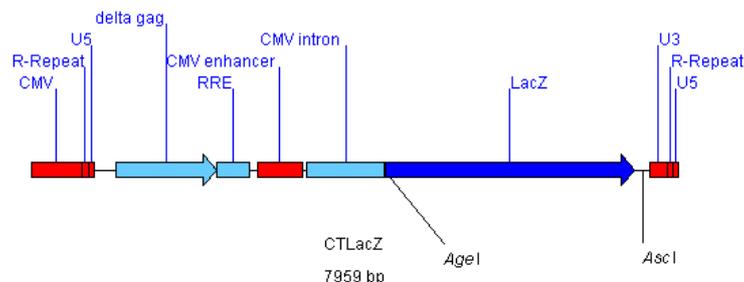


Abbildung 4-3: Mutagenese des CTRZLb-Plasmides zur Generierung jeweils flankierender Schnittstellen (AgeI und AscI) stromauf- und stromabwärts vom Reportergen lacZ

Austausch der beiden Basen *tc* zu *gt* bei der AgeI- und *acga* zu *gcgc* bei der AscI-Schnittstelle mittels Mutagenese Primer. Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsschnittstellen, rot hinterlegt sind die mutierten Basen und in roten Buchstaben ist das Startcodon des Reportergens *lacZ* markiert. In der Vektorkarte ist die Lage der erzeugten Restriktionsschnittstellen in übersichtlicher Form gezeigt.

4.1.3 EGFP & DSRed2 in sense

Über die im Basisvektor CTRZLb generierten singulären Restriktionsschnittstellen AgeI und AscI konnte mittels PCR-Klonierung das vorhandene Reportergen *lacZ* durch das *egfp* bzw. *dsred2* Reportergen ausgetauscht werden (siehe Abbildung 4-4). Die Reportergen-Sequenzen *egfp* und *dsred2* wurden aus dem retroviralen Vektorplasmid pLXSNEGFP bzw. dem Klonierungsvektor pDSRed2-1 (Clontech) per PCR-Amplifizierung entnommen. Hierbei wurde die in den Ausgangsvektoren bereits vorhandene 5'-AgeI-Restriktionsschnittstelle wiederverwendet und an das 3' Ende des jeweiligen Reportergens mittels Primerüberhang eine 3'-AscI-Restriktionsschnittstelle angehängt. Durch einen nachfolgenden Restriktionsverdau sowohl des Basisvektors CTRZLb als auch der PCR-Amplifikate mit den Restriktionsenzymen AgeI und AscI konnte das jeweilige Reportergen in den Basisvektor gerichtet einkloniert werden. Dadurch entstanden die lentiviralen Vektoren CTEGFP und CTDSRed2.

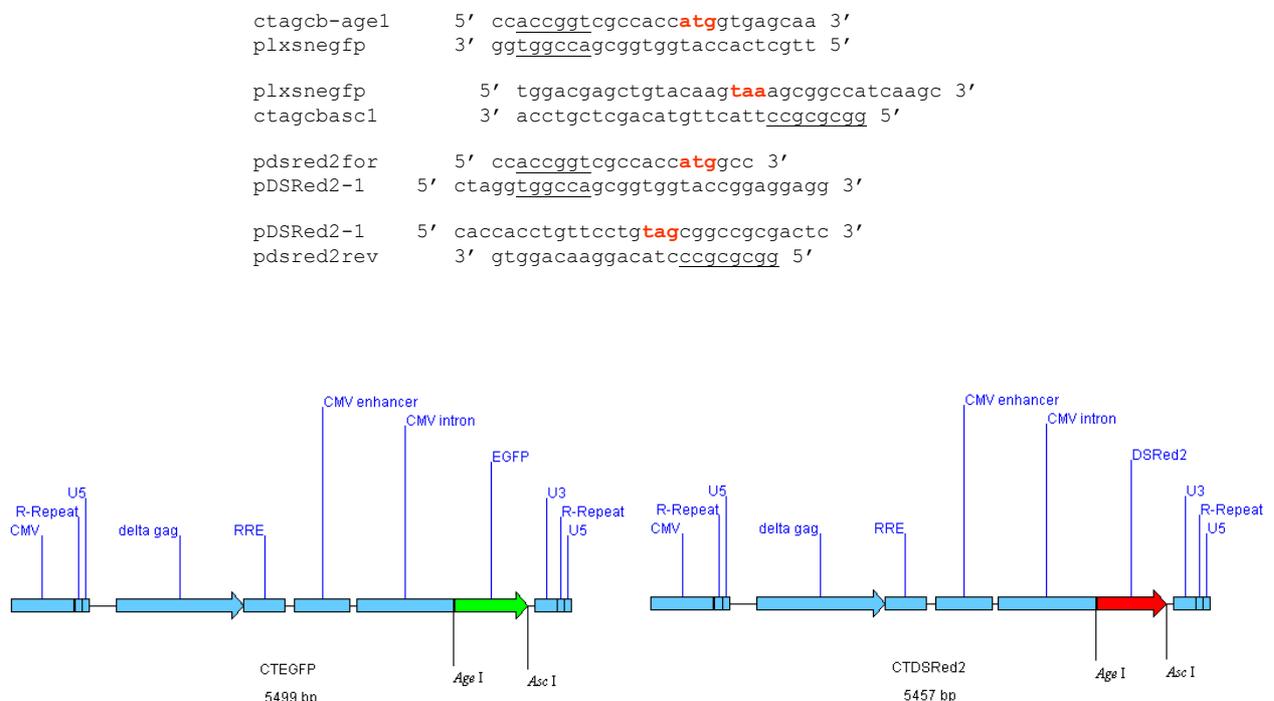


Abbildung 4-4: PCR-Klonierung von *egfp* und *dsred2* in den lentiviralen Basisvektor CTRZLb

Bei der Amplifizierung von *egfp* und *dsred2* wurde die bereits 5' vorhandene AgeI-Restriktionsschnittstelle wiederverwendet und an dem 3' Ende des jeweiligen Reportergens mittels Primerüberhang eine AscI-Restriktionsschnittstelle angehängt. Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsschnittstellen und in roten Buchstaben sind jeweils das Start- und Stopcodon markiert. Die lentiviralen Vektorkonstrukte CTEGFP und CTDSRed2 kodieren für *egfp* und *dsred2*. Die Restriktionsschnittstellen AgeI und AscI sind jeweils 5' und 3' vom Reportergen markiert.

Mit diesen neu klonierten viralen Transfervektoren ist es möglich, virale Partikel zu generieren und für Transduktionsassays auf Rezipientenzellen einzusetzen. Auf diese Weise wird der Reporternachweis im Falle einer erfolgreichen Transduktion deutlich vereinfacht, da zum einen die arbeitsintensiven histochemischen Färbereaktionen eines β -Galaktosidase-Nachweises wegfallen und die zu beobachtenden Rezipientenzellen durch die ausbleibenden Fixierungsschritte nicht mehr abgetötet werden. Dies ermöglicht zudem die Lebendbetrachtung des Untersuchungsobjektes über einen längeren Zeitraum und erlaubt dadurch gleichzeitig die Akkumulation des übertragenen Reportergens in den Rezipientenzellen, wodurch wiederum die Nachweissensitivität verbessert wird.

Die Funktionalität der neu generierten viralen Transfervektoren CTLacZ, CTEGFP und CTDSRed2 konnte nach einem Virusrescue durch die Transduktion von Rezipientenzellen unterschiedlicher Herkunft gezeigt werden. So konnten humane (HepG2 u. 293T), canine¹⁵ (MDCK u. M12), feline¹⁶ (CrFK) und murine¹⁷ (BHK) Zellen transduziert werden (Abbildung 4-5). Diese Form der Transduktion wird ungeachtet des Zelltyps und dessen Abstammung als pantrop bezeichnet und beruht auf den Tropismuseigenschaften des VSV-Glykoproteins (VSV-G), das bei der Verpackung der entstehenden Nachkommenviruspartikel aus der Zellmembran der Produzentenzellen in die neu entstehenden Virushüllen inkorporiert wird. Der VSV-G basierte Pantropismus ergibt sich dadurch, dass VSV-G von ubiquitär vorkommenden Membranphospholipiden erkannt wird^{109,150}.

¹⁵ canine = vom Hund stammend

¹⁶ feline = von der Katze stammend

¹⁷ murine = vom Nager, hier insbesondere von der Maus stammend

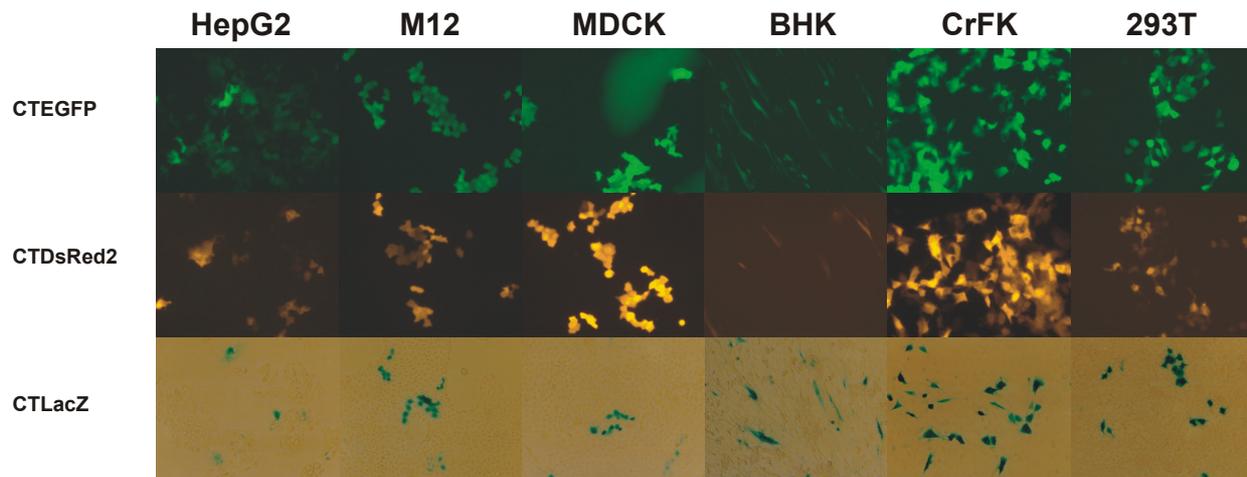


Abbildung 4-5: Funktionalität der neu generierten lentiviralen Transfervektoren CTLacZ, CTEGFP und CTDSRed2

Die Funktionalität der lentiviralen Transfervektoren wurden nach den ortsgerichteten Mutagenesen zur Einfügung der *AgeI* und *AscI* Restriktionsschnittstellen getestet, über die die verschiedenen Reportergene *lacZ*, *egfp* bzw. *dsred2* eingefügt wurden. Erfolgreich transduziert werden konnten die Zelllinien HepG2, M12, MDCK, BHK, CrFK und 293T.

4.1.4 Central Polypurine Tract & Central Termination Site (cppt/cts)

Die Lentiviren haben die einzigartige Eigenschaft, in nicht teilungsaktiven Zellen replizieren zu können (2.1.5). Durch eine zusätzliche Reinsertion einer cppt/cts-Sequenz, die dem parentalen FIV-Vektor-Genom fehlt, sollten FIV-basierte rekombinante Vektoren in die Lage versetzt werden, zellteilungsinaktive Zellen deutlich effizienter zu transduzieren.

4.1.4.1 PacI und FseI Mutagenese für cppt/cts Insertion

Für die Integration der cppt/cts-Sequenz in das Genom der etablierten rekombinanten lentiviralen Transfervektoren CTLacZ und CTDSRed2 (4.1.3) bedurfte es zweier weiterer singulärer Restriktionsschnittstellen. Diese wurden über ortsgerichtete Mutagenese eingefügt. Dazu wurden die beiden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme PacI und FseI ausgewählt, die möglichst stromaufwärts vom CMV-Promotor liegen sollten, damit die cppt/cts-Sequenz eine zentrale Position im Vergleich zum Wildtyp-Virusgenom (siehe Abbildung 2-5) auch im Vektorgenom einnehmen kann.

Dazu wurde über Mutagenese-Primer (Abbildung 4-6) im Falle der PacI-Sequenz aus der im Vektorplasmid enthaltenen Originalsequenz *ctaataaa* die PacI-Schnittstelle *ttaattaa* generiert. Analog dazu wurde die im Vektorplasmid enthaltene Originalsequenz *agaaagcc* zu der FseI-Erkennungssequenz *ggccggcc* modifiziert.

```

pac-rev          3' ttagtttagtttattattcatacataac 5'
ctlacz          5' gaatccatttcgaatcaaatcaaactaataagtatgtattgtaaggta 3'
ctlacz          3' cttaggtaaagcttagtttagtttgattattcatacataacattccat 5'
pac-for         5' aatcaaatcaaactaataagtatgtattg 3'

fse-rev         3' tcttcttcttcttcgcccggaagtcatgt 5'
ctlacz          5' aaggaaaagacaaaagaagaagaagaagaagccttcagtacatttatattggctca 3'
ctlacz          3' ttccttttctgtttcttcttcttcttcttcttccggaagtcatgtaaatataaccgagt 5'
fse-for         5' agaagaagaagagcccgccttcagtaca 3'

```

Abbildung 4-6: Mutagenese des CTLacZ-Plasmides zur Generierung einer PacI- und einer FseI-Restriktionsschnittstelle stromaufwärts vom CMV-Promotor

Austausch der Basenabfolge *ctaataaa* zu *ttaattaa* im Falle der PacI-Restriktionsschnittstelle und der Basen *agaaagcc* zu *ggccggcc* im Falle der FseI-Schnittstelle mittels Mutagenese-Primer. Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsschnittstellen, rot hinterlegt sind die mutierten Basen.

4.1.4.2 cppt/cts-Insertion in den FIV Transfervektor

Für die Amplifizierung der cppt/cts Sequenz diente das Plasmid CT5b, in dem das WT-Genom des FIV-Stammes *Petaluma* (Klon 34TF10) enthalten ist. Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass insgesamt 125 bp aus dem *pol*-Gen amplifiziert wurden (siehe Abbildung 2-5). Dieses Fragment enthält den identifizierten 105 bp großen cppt/cts Bereich flankiert von jeweils 10 bp 5' und 3', gefolgt von den Restriktionsschnittstellen PacI und FseI, die mittels der PCR-Primer angefügt wurden (siehe Abbildung 4-7). Dieses Fragment wurde anschließend nach dessen Aktivierung über die erzeugten Restriktionsschnittstellen in die entsprechend restringierten Vektorplasmide kloniert.

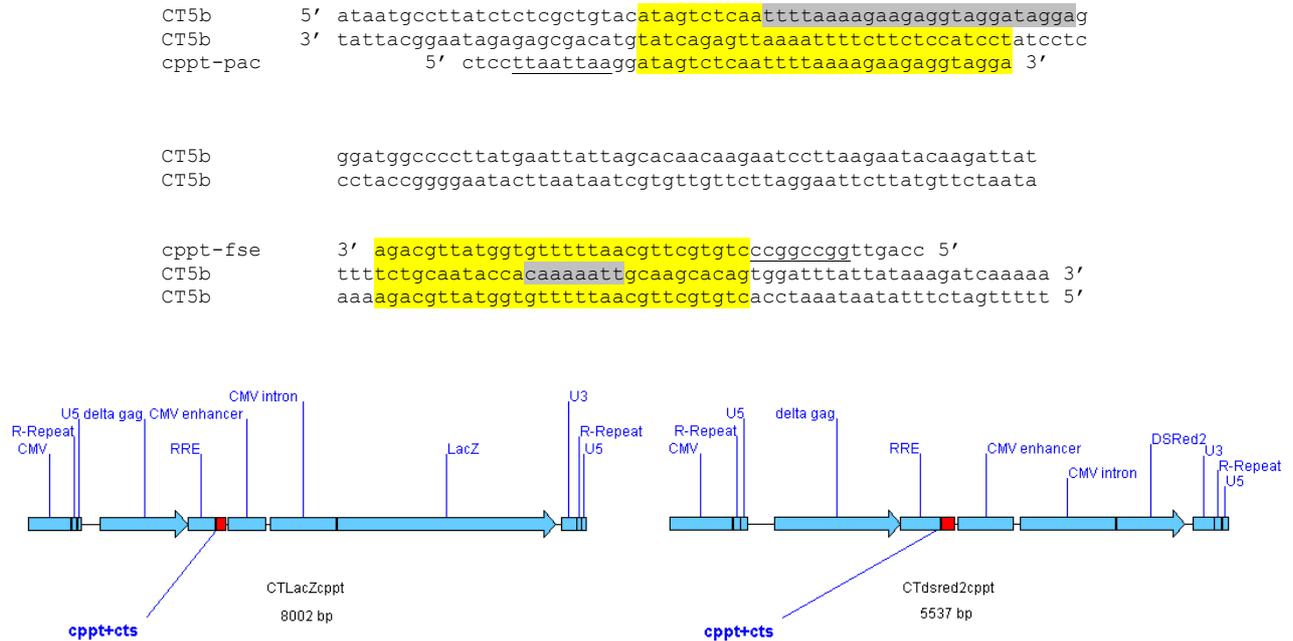


Abbildung 4-7: PCR-Amplifizierung der *central polypurine tract* / *central termination sequence* aus dem Genom des WT-FIV Plasmides CT5b

Oben: Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsschnittstellen, gelb hinterlegt sind die übereinstimmenden Bereiche von PCR-Primer und Zielsequenz und grau hinterlegt sind die cppt und cts Sequenzen im zu amplifizierenden Bereich.

Unten: Lokalisation des *central polypurine tracts* und der *central termination sequence* in FIV-Vektoren, die für *lacZ* und *dsred2* kodieren.

Nach der Insertion der cppt/cts Sequenz in die Transfervektoren CTLacZ und CTDSRed2 wurden diese für die Gewinnung von virushaltigem Überstand eingesetzt. Dieser Überstand wurde für eine Transduktion von verschiedenen Rezipientenzellen verwendet, um so die Funktionalität der neu klonierten Transfervektoren zu überprüfen. Erwartungsgemäß ließen sich alle Zelltypen erfolgreich transduzieren, mit Expressionsnachweis der entsprechenden Reportergene zwei Tage nach der Infektion (post infection, p.i.) (Abbildung 4-8).

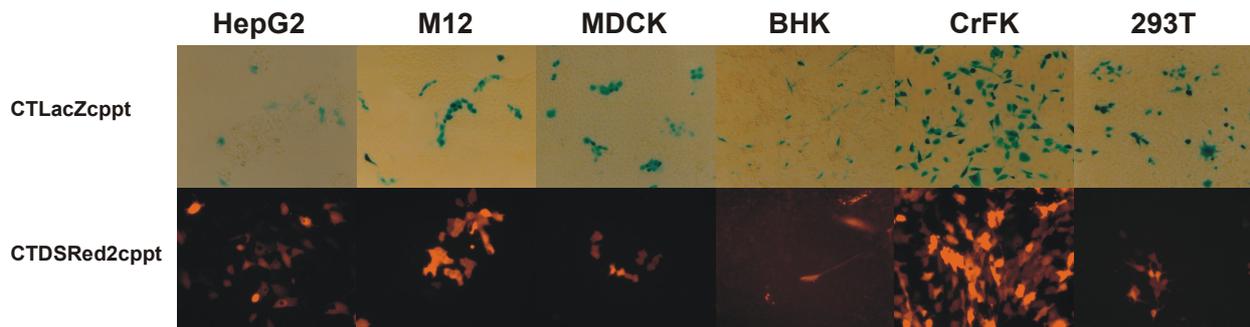


Abbildung 4-8: Funktionalität der FIV-Vektoren nach der Insertion der cppt/cts Sequenz

Die Funktionalität der FIV-Vektoren wurde nach der Mutagenese zur Einfügung der PacI und FseI Restriktionsschnittstelle stromaufwärts vom CMV-Promotor und der anschließenden Insertion der cppt/cts Sequenz über die zuvor eingebrachten Restriktionsschnittstellen überprüft. Erfolgreich transduziert werden konnten die Zelllinien HepG2, M12, MDCK, BHK, CrFK und 293T.

4.1.5 Titeroptimierung

Im Hinblick auf die Pseudotypisierung von FIV mit verschiedenen heterologen Hüllproteinen anderer Virusklassen, deren Einbau in die FIV-eigene Hülle erwartungsgemäß nicht effizient verläuft (Ausnahmen: VSV-G und Glykoprotein von *Ross River Virus* (RRV)), konnten exemplarisch niedertitrig Virusüberstände mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikel auf schonende Weise durch Ultrafiltration (Tabelle 4-1 und Abbildung 4-9) gewonnen werden. Das bedeutet, dass bei diesem physikalischen Anreicherungsprozess der Viruspartikel deren Infektiosität vergleichsweise wenig eingeschränkt wird.

Die bisher allgemein gängigste Methode der Vektorpartikelanreicherung besteht in der Ultrazentrifugation von viralen Vektoren, die mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus pseudotypisiert sind. Bei Einbau dieses Glykoproteins in die Hülle des viralen Vektors wird diese äußerst stabil und damit resistent gegen die Scherkräfte, wie sie bei höheren g-Zahlen während der Ultrazentrifugation auftreten. Eher ungeeignet ist diese Variante der Ankonzentration allerdings für virale Vektoren, die nicht mit dem VSV-G Protein pseudotypisiert sind, sondern mit den autologen Hüllglykoproteinen, die im Falle der Retro- und Lentiviren meist aus einer Transmembrandomäne und einer Oberflächendomäne bestehen. Diese Oberflächendomäne ist nicht kovalent mit der Transmembrandomäne verbunden und wird deshalb durch hohe Zentrifugalkräfte leicht abgeschert, so dass die Infektiosität des viralen Partikels schnell verloren gehen kann.

Vektor	Titer Überstand	Titer Konzentrat	Aufkonzentrierungsfaktor
CTLacZ	$5,33 \times 10^4$	$1,85 \times 10^7$	347
CTLacZcppt	1×10^4	$1,67 \times 10^6$	167
CTDSRed2	7×10^4	$5,04 \times 10^8$	7200
CTDSRed2cppt	7×10^4	$1,50 \times 10^7$	214

Tabelle 4-1: Virale Titer vor bzw. nach Ultrafiltration

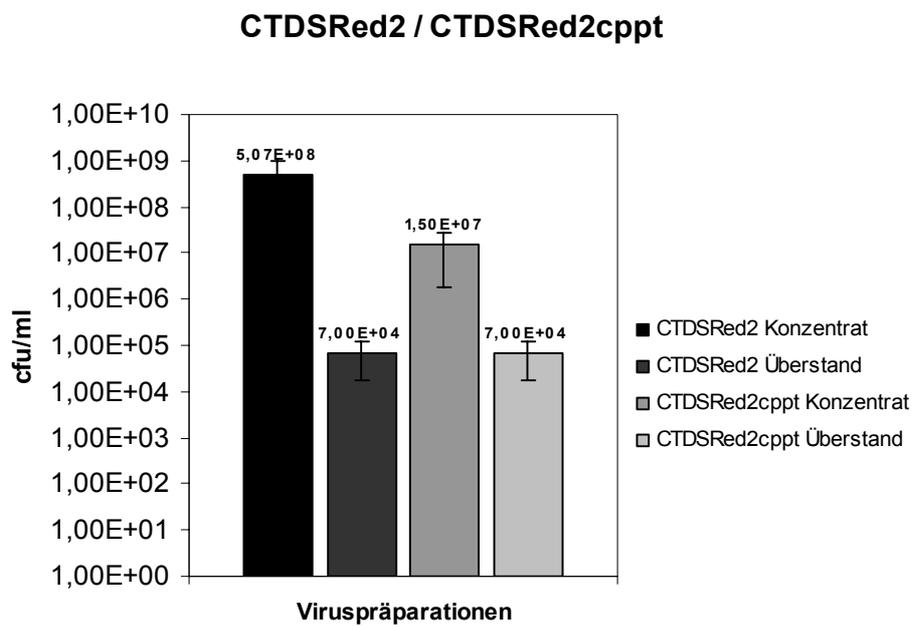
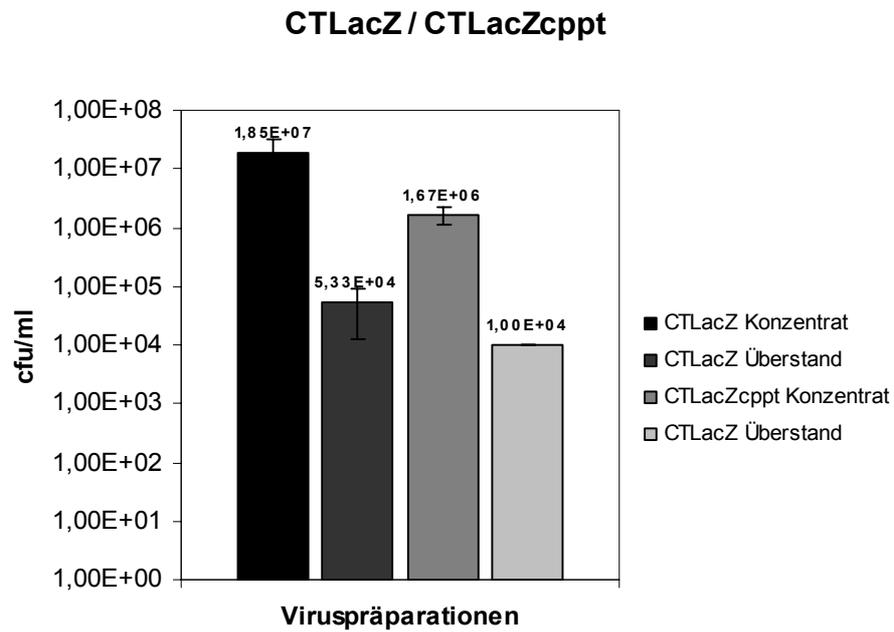


Abbildung 4-9: Aufkonzentration viralen Überstandes mittels Ultrafiltration

4.2 Targeting ASGP-R exprimierender Zellen mittels SeV-F Pseudotypen

4.2.1 Expressionsnachweis des ASGP-R in potentiellen Zielzellen von FIV SeV-F Pseudotypen

Für eine spezifische Transduktion von Hepatozyten mittels Sendai-Virus F-Protein (SeV-F) pseudotypisierten FIV-Vektoren bietet sich der Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R) als Ziel-Rezeptor an, da dessen Expression weitestgehend auf Hepatozyten begrenzt ist¹⁶³. Des Weiteren konnte bereits eine Interaktion des SeV-F Proteins mit dem ASGP-R nachgewiesen werden^{15,94}. Um geeignete Nachweissysteme für die ASGP-R Spezifität der viralen SeV-F Pseudotypen zu definieren, wurden verschiedene Zelllinien auf die Expression des ASGP-R im Westernblot hin untersucht (siehe Abbildung 4-10).

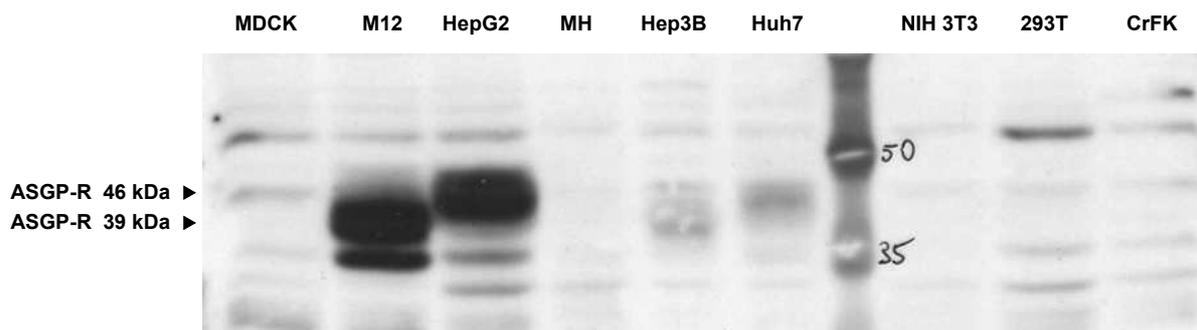


Abbildung 4-10: Western Blot-Nachweis der Expression des ASGP-R in verschiedenen Zelllinien

Die canine Epithelzelllinie M12 und die humanen Hepatomzelllinien HepG2, Hep3B sowie Huh7 exprimieren den ASGP-R unterschiedlich stark, was anhand der spezifischen Bandenstärke des humanen ASGP-R bei 39 kDa und 46 kDa zu sehen ist. Im Gegensatz hierzu wurden auf der murinen Hepatomzelllinie MH, der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3, der humanen Epithelzelllinie 293T sowie der felines Epithelzelllinie CrFK keine Expression des ASGP-R gefunden. Die parentale Zelllinie MDCK, von der die M12 Zelllinie abgeleitet wurde, zeigte ebenfalls keine ASGP-R Expression.

Für die humanen Hepatomzelllinien Huh7, Hep3B und HepG2 konnte hiermit im Westernblot die Expression des humanen ASGP-R nachgewiesen werden, nicht jedoch für die murine Hepatomzelllinie MH. Die stärkste ASGP-R Expression zeigte HepG2. Im Gegensatz dazu war die Expression des ASGP-R bei Huh7 und Hep3B deutlich schwächer. Es konnte keine ASGP-R Expression auf der caninen Epithelzelllinie MDCK nachgewiesen werden, während die davon abgeleitete, durch Transfektion mit einem ASGP-R erzeugte Zelllinie M12 den humanen ASGP-R stabil exprimiert⁵³. Die murine Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 sowie die humanen und felines Epithelzelllinien 293T und CrFK zeigten ebenfalls keine Expression des ASGP-R. Der eingesetzte

anti-ASGP-R Antikörper (Calbiochem: Cat. No.: 180120) erkennt die 41 kDa Bande des murinen ASGP-R sowie die 46 kDa und 39 kDa Banden der H1-Domäne des humanen ASGP-R^{87,193}.

4.2.2 Präsentation des ASGP-R auf der Zelloberfläche von HepG2 und M12 Zielzellen

Im Hinblick auf die zukünftigen Transduktionsstudien wurden die beiden Zelllinien HepG2 und M12, die eine sehr starke ASGP-R Expression im Westernblot zeigten, für Immunfluoreszenzfärbungen zur Lokalisierung des ASGP-R in der Zelle verwendet. Zusätzlich wurden die Zelllinien MDCK und 293T, die keine ASGP-R Expression im Westernblot aufwiesen, als Negativkontrollen bei der Immunfluoreszenzfärbung gegen den ASGP-R eingesetzt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde der gleiche anti-ASGP-R-Antikörper verwendet wie im entsprechenden Westernblot-Nachweis. Als Sekundärantikörper gegen den anti-ASGP-R Antikörper diente ein Ziege anti-Maus Antikörper, der mit dem Fluorochrom Alexa 546 gekoppelt war. Die Immunfluoreszenz-Analyse bestätigte die Ergebnisse der Westernblot-Analyse für die jeweiligen Zelllinien. Der ASGP-R konnte auf der Zelloberfläche von HepG2 und M12 Zellen identifiziert werden, da hier nur die Zellmembran angefärbt war (Abbildung 4-11). Dagegen konnte er nicht auf den Zelllinien MDCK sowie 293T nachgewiesen werden. Die Spezifität des ASGP-R Nachweises zeigten die Kontrollfärbungen, bei denen entweder nur der anti-ASGP-R Antikörper, Ziege anti-Maus Antikörper oder kein Antikörper eingesetzt wurde. Hierbei war keine für den ASGP-R spezifische Zellmembranfärbung erkennbar.

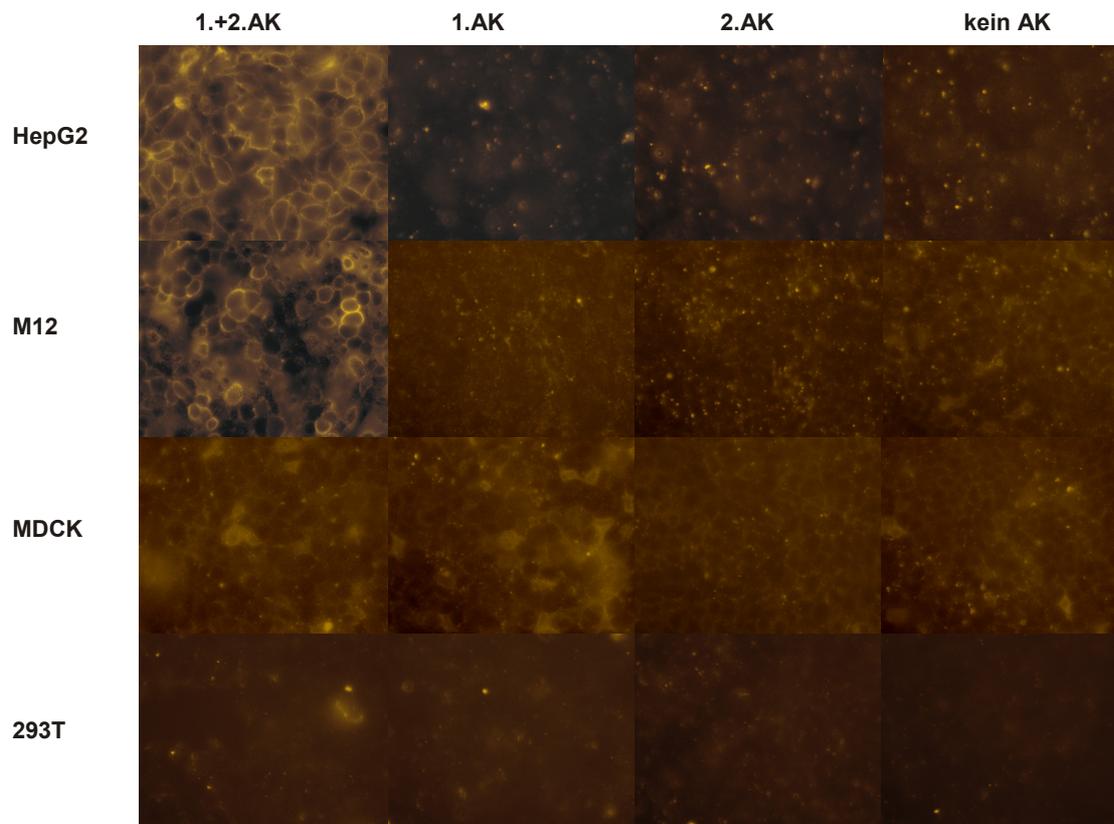


Abbildung 4-11: Immunfluoreszenznachweis der ASGP-R Expression in Rezipientenzellen für SeV-F pseudotypierte FIV-Partikel

Die Zelllinien HepG2 und die M12 zeigten eine typische Membranfärbung nach der Anfärbung der Zellen mit einem Maus anti-ASGP-R Antikörper, als Sekundäntikörper diente ein mit Alexa 546 Fluorochrom gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper. Die als Negativkontrollen verwendeten Zelllinien MDCK (parentale Zelllinie von M12) und 293T zeigten keine Membranfärbung, genau wie die parallel durchgeführten Kontrollen, bei denen jeweils nur einer der beiden oder kein Antikörper eingesetzt wurde.

4.2.3 Generierung von FIV-SeV-F Pseudotypen mittels transienter Transfektion der SeV-F Hüllglykoproteine in 293T Verpackungszellen

Im nächsten Schritt wurde das VSV-G Hüllprotein in Analogie zu dem ASGP-R spezifischen MoMLV(SeV-F) System¹⁶² durch das SeV-F Protein ersetzt. Zur Herstellung der FIV-SeV-F Pseudotypen wurde die 293T Verpackungszelllinie durch eine CaPO₄-Tripeltransfektion (siehe 3.3.3.1 und 3.4.1) mit den neu klonierten Transfervektoren CTDsRed2cppt bzw. CTLacZcppt sowie dem Verpackungsplasmid CF1Δenv und dem neu verwendeten SeV-F Hüllexpressionsplasmid transfiziert. Als SeV-F Hüllexpressionsplasmid kamen mehrere Plasmidkonstrukte zum Einsatz, die für unterschiedliche SeV-F Varianten kodierten (siehe 4.2.3.1-4.2.3.3). Des Weiteren wurde eine stabile 293T-Verpackungszelllinie etabliert (siehe 4.2.3.4), die das native SeV-F Protein exprimiert. Dadurch konnte eine Tripeltransfektion durch eine Doppeltransfektion von Transfer-

vektor und Verpackungsplasmid in die Verpackungszelllinie ersetzt werden. Dies war für einen FIV-SeV-F Rescue ausreichend und zeigte im Vergleich zur Tripeltransfektion Vorteile bezüglich der Transfektionseffizienz.

4.2.3.1 SeV-F Hüllglykoprotein

Als erstes Konstrukt wurde das Hüllexpressionsplasmid pUC29-IF-zeo verwendet, das für das wildtypische, membranständige Fusionsprotein aus dem SeV-WT kodiert⁵⁰. Dieses Plasmid enthält zusätzlich das Intron A des hCMV (Stamm *Towne*), das Enhancer-Bindungsstellen enthält und die gebildete mRNA stabilisieren soll³⁰. In Abbildung 4-12 ist das verwendete Konstrukt schematisch dargestellt.

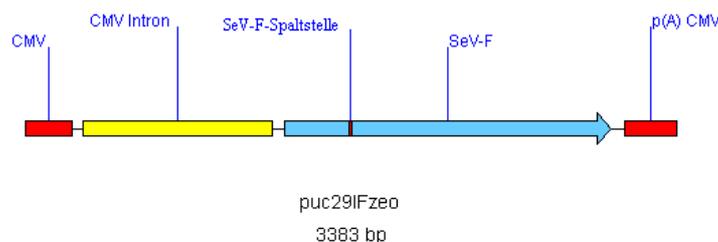


Abbildung 4-12: Aufbau des SeV-F Expressionsplasmides pUC29-IF-zeo

4.2.3.2 SeV-F_{mut} Hüllglykoprotein

Für die Generierung der FIV-SeV-F_{mut} Pseudotypen wurde eine konstitutiv fusionsaktive Variante des SeV-F Proteins verwendet. Dazu wurde mittels Mutagenese-Primer die SeV-F Spaltstelle im pUC29-IF-zeo Plasmid mutiert, sodass die Sequenzabfolge der potentiellen SeV-F Spaltstelle auf Nukleotidebene *gttccacagtcgaga* des D52 (*Fushimi* Stamm) in folgende Sequenzabfolge *cgtcgtcagaagaga* abgeändert wurde (Abbildung 4-13). Das so entstandene Hüllexpressionsplasmid wurde pUC29-IF-zeo_{mut} benannt. Durch die veränderte Aminosäureabfolge im Bereich der SeV-F-Spaltstelle von VPQSR zu RRQKR wurde eine neue Spaltstelle und zwar die eines virulenten Stammes des Newcastle Disease Virus (NDV) generiert. Diese kann zwischen der SeV-F F1- und der F2-Domäne durch zelleigene ubiquitäre Furin-Proteasen gespalten werden⁶⁷. Im Gegensatz dazu ist der Wildtyp SeV-F auf eine Aktivierung durch extrazelluläre Proteasen wie z.B. Tryptase Clara¹⁷⁴ angewiesen. Durch die Generierung von FIV-SeV-F_{mut} Pseudotypen konnte

auf die Aktivierung der viralen Partikel mittels acetyliertem Trypsin unmittelbar vor den Transduktionsassays verzichtet werden.

Mutagenese von pUC29-IF-zeo zu pUC29-IF-zeo_{mut}

```

fmut-rev          3' ctgtgttttacggccagcagcagtccttctctaagaagccacgacac 5'
pUC29IFzeo       5' accaatgatagacacaaaaatgccgggtgttccacagtcgagattccttcgggtgctgtgattgggtactatcg 3'
pUC29IFzeo       3' tggttactatgctgtgttttacggccacaagggtgcagctctaagaagccacgacactaacatgatagc 5'
fmut-for         5' gacacaaaaatgccgggtcgtcgtcagaagagattccttcgggtgctgtg 3'

```

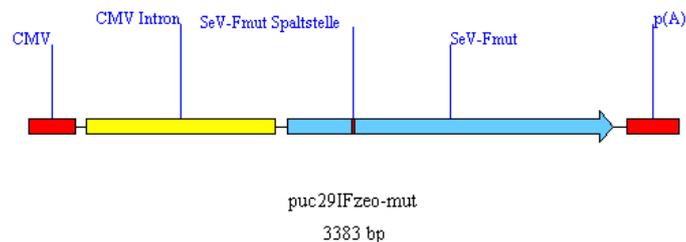


Abbildung 4-13: Mutagenese der Spaltstelle des SeV-F im Expressionsplasmid pUC29-IF-zeo

Die Sequenz der SeV-F Spaltstelle ist mit blauen Buchstaben markiert, zusätzlich sind in der Sequenz der Mutagenese-Primer die Basen unterstrichen, die mittels der Mutagenese ausgetauscht wurden. In der unteren Bildhälfte ist der Aufbau des nach der Mutagenese resultierenden SeV-F_{mut} Expressionsplasmides pUC29-IF-zeo_{mut} gezeigt.

4.2.3.3 SeV-F_{del} Hüllglykoprotein

Für die Generierung der FIV-SeV-F_{del} Pseudotypen wurde das Hüllexpressionsplasmid pCMV-F_{del} (Abbildung 4-14) verwendet. Das von J.K. Yee (City of Hope, Duarte, USA) bereitgestellte Konstrukt kodiert für ein F-Hüllprotein, bei dem die zytoplasmatische Domäne von 42 auf 2 Aminosäuren reduziert wurde⁸⁹. Durch die auf zwei Aminosäuren verkürzte zytoplasmatische Domäne soll die Inkorporation von FIV-SeV-F_{del} in die Virushülle während der Virusproduktion deutlich effizienter ablaufen und somit zur Steigerung des Virustiters beitragen.

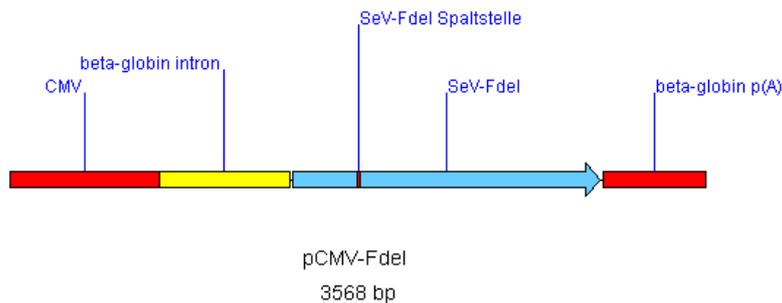


Abbildung 4-14: Aufbau der SeV-F_{del} Transkriptionseinheit des Expressionsplasmids pCMV-F_{del}.

Die intrazelluläre Domäne von SeV-F_{del} wurde um 42 Aminosäuren verkürzt, sodass die Gesamtlänge der intrazellulären Domäne nur noch zwei Aminosäuren umfasst.

4.2.3.4 Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie für die SeV-F Pseudotypisierung von FIV

Parallel zu der transienten Pseudotypisierung mit den unterschiedlichen SeV-F Varianten wurde eine 293T Zelllinie generiert, die stabil das SeV-F exprimiert und auf der Zelloberfläche präsentiert.

Dazu wurden 293T Zellen mittels CaPO₄-Transfektion mit dem Plasmid pUC29-IF-zeo transfiziert und 48 h später mit Zeocin (600 µg/ml) selektiert. Einzelne Zeocin-resistente Klone wurden propagiert und mittels Westernblot auf SeV-F Expression getestet. Es wurden 3 von den 46 getesteten 293T Zellklonen (Klone 13,15 und 39), die das SeV-F Protein am stärksten exprimierten, ausgewählt, unter Zeocin-Selektion weiterpropagiert und nach 45 Tagen erneut auf die SeV-F Expression getestet. Alle 3 Klone zeigten weiterhin Resistenz gegenüber Zeocin, aber lediglich Klon 15, nachfolgend als 293T-F15 bezeichnet, zeigte zusätzlich auch die gewünschte Expression des SeV-F Proteins (Abbildung 4-15). Bei den 293T-F Zellklonen 13 und 39 dagegen war eine SeV-F Expression nicht nachweisbar. Somit wurde für die im Anschluß folgenden Pseudotypisierungsversuche mit SeV-F der 293T-F15 Zellklon verwendet.

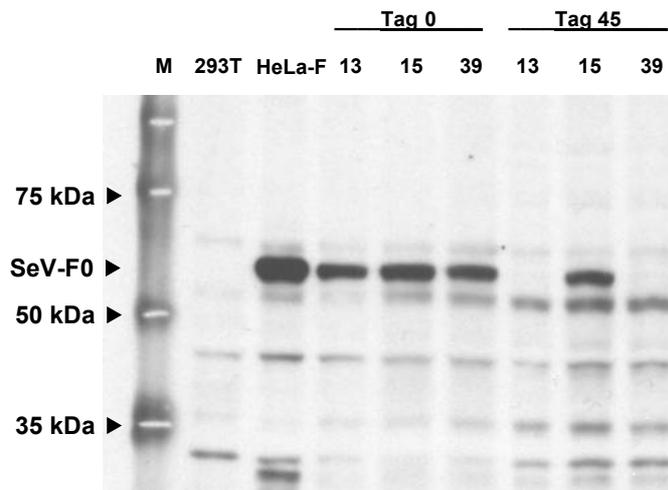


Abbildung 4-15: Western Blot-Nachweis der Expression des SeV-F Proteins in SeV-F exprimierenden 293T Verpackungszellen

Die 293T Zellen wurden nach der Transfektion mit dem Plasmid pUC29-IF-zeo, das für das Resistenzgen Zeocin und für das SeV-F Protein kodiert, mittels Zeocin selektioniert, die einzeln Klone propagiert und im Westernblot auf SeV-F Proteinexpression getestet. Von den 46 selektierten Klonen wurden 3 zur weiteren Analyse ausgewählt, die im Western Blot die stärkste SeV-F Expression (Tag 0) zeigten. SeV-F wurde dabei als ungespaltene, nicht fusionsaktive F0 Version detektiert. Nach weiteren 45 Tagen Propagation der 3 ausgewählten 293T-F Klone wurden diese erneut auf SeV-F Expression im Westernblot untersucht. Es zeigte sich das trotz vorhandener Zeocin-Resistenz die Klone 293T-F13 und 293T-F39 das SeV-F Protein nicht mehr exprimierten. Die als Negativkontrolle eingesetzte parentale 293T-Zelllinie zeigte keine Expression des SeV-F Proteins. Die Zelllinie HeLa-F, die das SeV-F Protein stabil exprimiert und als Positivkontrolle eingesetzt wurde, zeigte eine deutliche SeV-F Expression.

4.2.3.5 Expressionsnachweis der SeV-F Hüllproteine

Vorraussetzung für einen effizienten Einbau des SeV-F Proteins in die FIV Virushülle ist, dass die jeweiligen SeV-F Varianten, die zur Pseudotypisierung eingesetzt wurden, in die Zellmembran der Verpackungszellen integriert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dadurch stehen die jeweiligen Varianten der SeV-F Proteine bei dem Aussprossungsprozess des Virus für einen Einbau in die Virushülle zur Verfügung. Die Integration der SeV-F Proteine in die Zellmembran wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen der Verpackungszelllinie 293T nach deren Transfektion mit den unter 4.2.3.1 bis 4.2.3.3 beschriebenen Expressionsvektoren sowie der stabilen Verpackungszelllinie 293T-F15 nachgewiesen (Abbildung 4-16) und war deutlich anhand der Membranfärbung zu sehen. Hierzu wurde ein monoklonaler Maus anti-SeV-F Antikörper (mAk-48F)¹⁶¹ verwendet, der in der Lage war, alle bisher beschriebenen SeV-F Varianten zu detektieren. Mit einem Alexa 546 gekoppelten Ziege anti-Maus Sekundärantikörper, konnte letztlich das SeV-F nachgewiesen werden. Die entsprechenden Negativkontrollen, bei denen jeweils nur einer der beiden Antikörper bzw. kein Antikörper für den SeV-F Nachweis eingesetzt wurde, um die Spezifität der

eingesetzten Antikörper zu überprüfen, zeigten erwartungsgemäß kein Signal. Als Negativkontrolle diente die parentale, nicht-transfizierte 293T Zelllinie, die kein SeV-F exprimiert und keine Membranfärbung aufwies. Als Positivkontrolle wurde die HeLa-F Zelllinie verwendet, die stabil mit der cDNA von SeV-F transfiziert ist⁵⁰ und eine deutliche Membranfärbung aufwies.

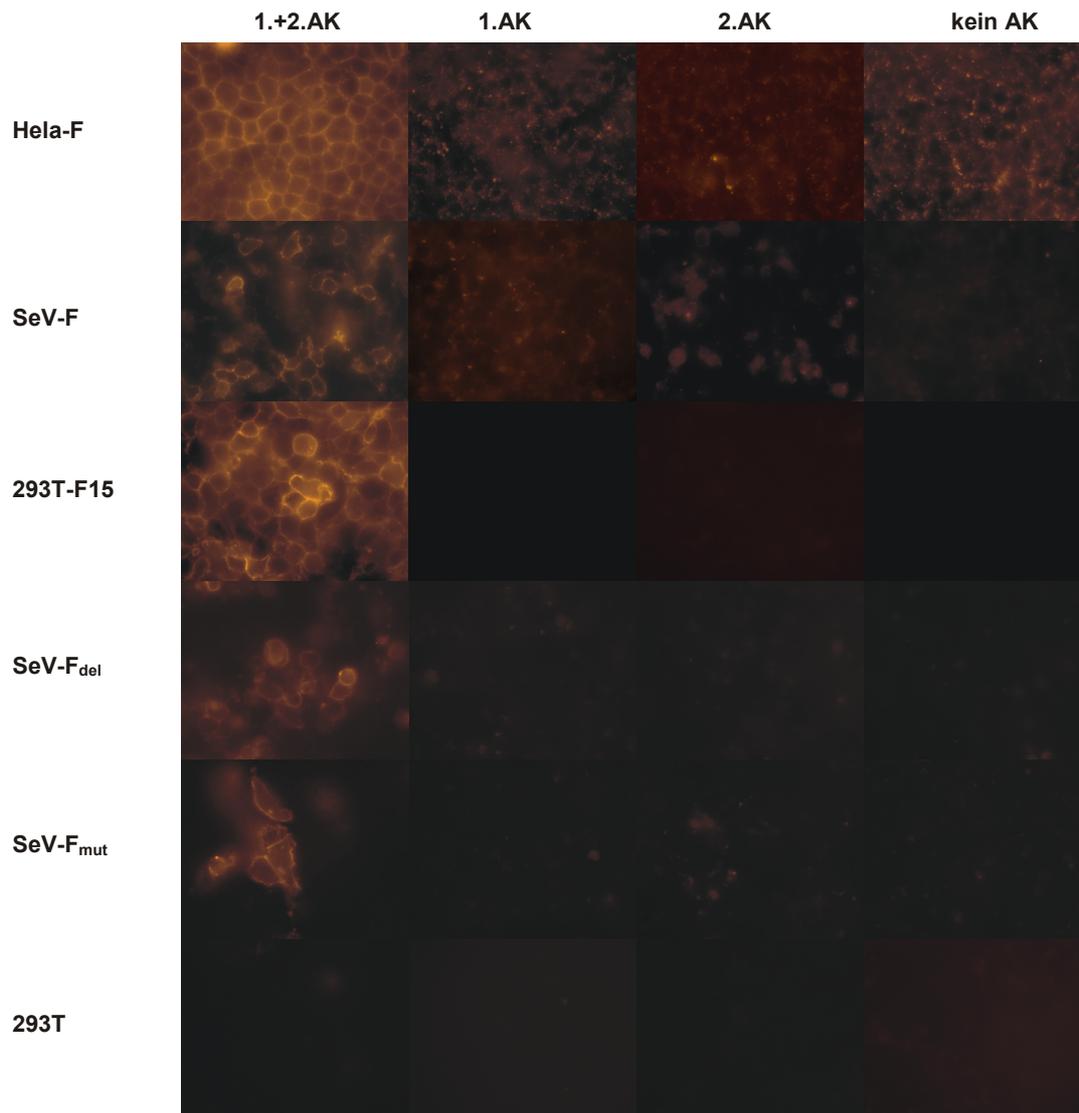


Abbildung 4-16: Immunfluoreszenznachweis der Expression des nativen SeV-F Proteins und seiner Derivate in 293T Verpackungszellen sowie der HeLa-F-Zelllinie

Die in die 293T-Verpackungszelllinie transfizierten SeV-F Varianten SeV-F, SeV-F_{del} und SeV-F_{mut} wurden von den Verpackungszellen exprimiert und in die Zellmembran eingebaut, und konnten durch einen Maus anti-SeV-F und einem weiteren Alexa 546 gekoppelten Ziege anti-Maus Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Die nicht mit SeV-F transfizierte parentale 293T Verpackungszelllinie (Negativkontrolle) zeigte keine Membranfärbung im Gegensatz zu der stabil SeV-F exprimierenden HeLa-F Zelllinie (Positivkontrolle). Die Inkubation nur des Primär- oder des Sekundärantikörpers mit den untersuchten transfizierten Zelllinien zeigte keine unspezifischen Färbung.

4.2.3.6 Rescue-Versuch der FIV SeV-F Pseudotypen

Für den angestrebten Rescue-Versuch SeV-F pseudotypisierter FIV Partikel standen nun mit den Hüllexpressionsplasmiden pUC29-IF-zeo, pUC29-IF-zeo_{mut} und pCMV-F_{del} sowie der stabilen 293T-F15 Verpackungszelllinie die nötigen Hilfsmittel zur Verfügung. Die Generierung der Pseudotypen erfolgte mittels Transfektion von lentiviralem Transfervektor, Verpackungsplasmid und der entsprechenden Hüllexpressionsplasmide in die 293T-Verpackungszelllinie (Tripeltransfektion). Für die stabile Verpackungszelllinie 293T-F15 wurde lediglich der Transfervektor sowie das Verpackungsplasmid transfiziert (Doppeltransfektion).

24 h nach der Transfektion in die Verpackungszellen wurde das Kulturmedium ausgewechselt (DMEM + 10% FCS gegen Serum-freies Ultra Culture Medium (Cambrex)). Der Austausch des Serum-haltigen Mediums gegen Serum-freies Medium ist notwendig, um eine Trypsin-vermittelte Aktivierung des SeV-F Proteins durchführen zu können. Das Serum-freie Medium wurde ebenfalls für 24 h auf den transfizierten Zellen belassen und die viralen Partikel darin gesammelt. Anschließend wurde der Überstand mit 1 µg/ml acetyliertem Trypsin für 30 min bei 37°C aktiviert und direkt im Anschluß wurde das Trypsin durch Zugabe von FCS, mit einer Endkonzentration von 10%, inaktiviert. Bei dieser enzymatischen Aktivierung wird das in die Hülle der viralen Partikel eingebaute SeV-F₀ Protein gespalten, sodass eine fusionsaktive Form des SeV-F, das sogenannte F₁, entsteht, das mit der abgespaltenen Domäne F₂ nun nur noch über Disulfidbrücken verbunden ist. Im Falle des Rescues von FIV-SeV-F_{mut} war der Wechsel nach 24 h auf Ultra Culture nicht notwendig. Die im Überstand enthaltenen viralen Partikel enthielten bereits das konstitutiv fusionsaktive SeV-F_{mut}-Protein und mussten daher nicht mehr mittels acetyliertem Trypsin aktiviert werden. Daher konnte hier durchgängig in DMEM mit 10% FCS kultiviert werden.

Die generierten FIV-SeV-F Überstände wurden über einen 0,45 µm Millex Sterilfilter (Millipore) filtriert, um eine Verschleppung von Virus-Produzentenzellen zu vermeiden. Anschließend wurde der filtrierte Überstand mit Polybrene (8 µg/ml) versetzt und für die Transduktion (24 h) der bereits unter 4.1.4.2 verwendete Rezipientenzellpanel eingesetzt, siehe Tabelle 4-2 und Abbildung 4-17. Jedoch ließ sich mit keinem der FIV-SeV-F Pseudotypen, die für das Reportergen *dsred2* kodierten, eine Transduktion der verschiedenen Zelllinien nachweisen. Die erfolgreich transduzierten Rezipientenzellen hätten aufgrund der Expression des *dsred2*-Proteins (einem autofluoreszenten Protein aus der Seeanemone *Discosoma coral*, das bei einer Anregung von $\lambda = 558$ nm rot fluoresziert (Emission $\lambda = 583$ nm)) bei entsprechender Anregung, eine Rotfluoreszenz zeigen müssen. Auch in den nachweislich ASGP-R exprimierenden Zelllinien HepG2 und M12 gelang dieser Nachweis nicht.

Transduktion von Rezipienten-Zelllinien							
Pseudotypen	HepG2	M12	MDCK	BHK	CrFK	293T	NIH 3T3
FIV SeV-F _{transient}	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV SeV-F _{mut transient}	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV SeV-F _{del transient}	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV SeV-F _{stabil}	-	-	-	-	-	-	n.d.

Tabelle 4-2: Kein Transduktionsnachweis ASGP-R exprimierender Zellen mit den bisherigen FIV-SeV-F Pseudotypen

Mit den verschiedenen SeV-F Varianten pseudotypisierte lentivirale Überstände konnte keine Transduktion von Zelllinien unterschiedlichsten Ursprungs nachgewiesen werden. Das gilt auch für die verwendeten ASGP-R exprimierenden Zelllinien HepG2 und M12. (-) steht hier für „keine Transduktion nachweisbar“.

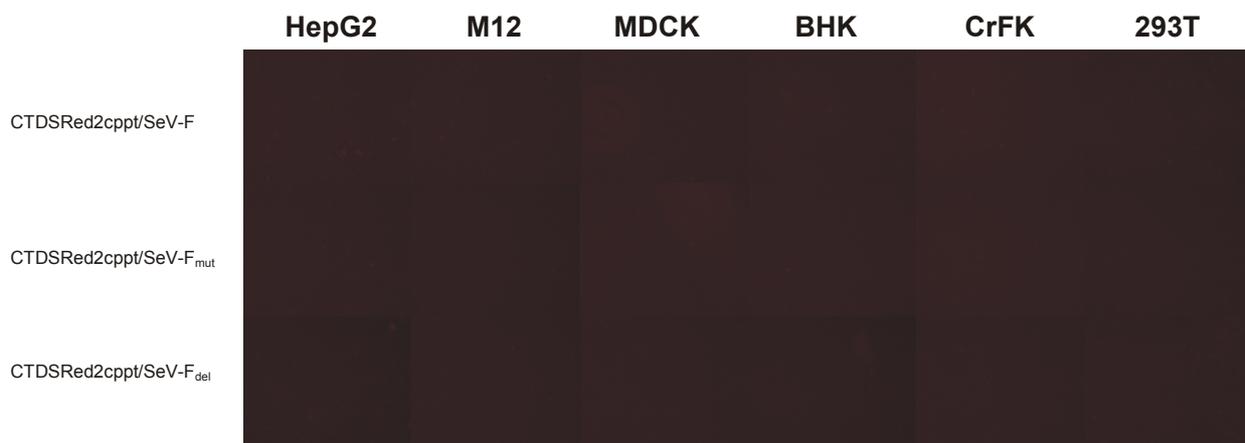


Abbildung 4-17: Kein Transduktionsnachweis auf ASGP-R exprimierenden Zellen

Mit den verschiedenen SeV-F Varianten pseudotypisierte lentivirale Überstände konnte keine Transduktion von Zelllinien unterschiedlichsten Ursprungs nachgewiesen werden. Das gilt auch für die ASGP-R exprimierende Zelllinien HepG2 und M12.

4.3 Generierung chimärer SeV-F Hüllproteine für eine effizientere Inkorporation in die FIV Virushülle

4.3.1 Einbauproblematik heterologer Hüllproteine in die FIV-Virushülle

Bei Retro-, Lenti- und generell auch Paramyxoviren findet der Zusammenbau des Viruspartikels in der Wirtszelle in der Nähe sogenannter *Lipid Rafts* - Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran - die hauptsächlich aus Sphingolipiden und Cholesterol bestehen, statt¹⁵⁶. Für die Transportprozesse bedarf es einer Myristylierung der jeweiligen Core- bzw. Matrixproteine¹⁴⁹, die dadurch in die Nähe der *Lipid Rafts* transportiert werden, jedoch nicht in diese integrieren. Im Gegensatz hierzu werden die viralen Hüllglykoproteine durch eine Palmitoylierung von Cysteinresten der zytoplasmatischen Domänen markiert¹³⁷ und direkt in die *Lipid Rafts* der Plasmamembran eingebaut. Eine Palmitoylierung von Cysteinresten der zytoplasmatischen Domäne des F-Proteins ist zwar für die Paramyxoviren bekannt, nicht jedoch speziell für das Sendai Virus¹⁸², siehe hierzu Tabelle 4-3.

	Transmembran Domäne	Zytoplasmatische Domäne
FIV Transmembranglykoprotein (Petaluma Stamm) (Klon: 34TF10)	GLGGILGIGLGVLLIILCLPTLV 24AS	DCIRNCIHKILGYTVIAMPEVEGEEIQPMELRRNGRQC CMSEKEEE 47AS
VSV Glykoprotein (Indiana Stamm)	SSIASFFFIIGLIIGLFLVL 20AS	RVGIHLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK 29AS
SeV Fusionsprotein (Fushimi Stamm)	TVITIIIVVMVILVVIIVIVIVLY 24AS	RLKRSMLMGNPDDRIPRDTYTLPEKIRHMYTNGGFDAEAEKR 42AS

Tabelle 4-3: Vergleichende Darstellung der Transmembrandomänen und zytoplasmatischen Domänen der jeweiligen Hüllglykoproteine von FIV, VSV und SeV

Die Länge der zytoplasmatischen Domänen der verglichenen viralen Hüllglykoproteine ist sehr unterschiedlich und variiert von 29 AS bis hin zu 47 AS. Farblich hervorgehoben ist die Aminosäure Cystein, die bei dem VSV-Glykoprotein und wahrscheinlich auch bei dem Hüllglykoprotein von FIV nach deren Palmitoylierung für den Transport des jeweiligen Hüllglykoproteins zu den sogenannten *Lipid Rafts* in der Plasmamembran sorgt und dort am Ort des Ausknospens des Virus aus der Wirtszelle für den Einbau in die Virushülle zur Verfügung steht. Auffällig ist, dass das SeV-F über kein Cystein in der zytoplasmatischen Domäne verfügt.

Dies könnte bedeuten, dass es zu einem sehr ineffizienten oder fehlenden Transport der bisher für die Pseudotypisierung verwendeten Varianten der SeV-F Proteine (4.2.3.1 bis 4.2.3.3) zu den *Lipid Rafts* kam. Aus diesem Grund wurden mittels PCR-Klonierung chimäre SeV-F Hüllglykoproteine hergestellt. Deren extrazelluläre Domänen stammten vom SeV-F bzw. SeV-F_{mut} und waren, eine korrekte Faltung sowie Prozessierung des exprimierten Proteins vorausgesetzt, für die Interaktion mit dem ASGP-R verantwortlich. Für den Transport zu den *Lipid Rafts* sowie die

Integration in die Plasmamembran sorgten die zum Teil heterogenen Transmembran- bzw. zytoplasmatischen Domänen von CD4, VSV-G und FIV Env, siehe hierzu Abbildung 4-18.

Die Herstellung der unter Abbildung 4-18 dargestellten chimären SeV-F Hüllglykoproteine erfolgte über die sukzessive Anknüpfung der heterologen Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen mittels „Überlänge-Primern“ in zwei bis drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen an die extrazelluläre bzw. Transmembran-Domäne des SeV-F. Das finale PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Topo Subklonierungsvektor (Invitrogen) über die Topoisomerase-Reaktion eingefügt, danach amplifiziert und konnte anschließend mittels des Restriktionsenzymes EcoRI ausgeschnitten und über selbige Restriktionsschnittstelle in das eukaryontische Expressionsplasmid pI.18 inkloniert werden.

Die chimären SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine liessen sich auf Sequenzebene durch Austausch der SeV-F₁-F₂-Spaltstelle in den SeV-F Hüllglykoproteinen im Subklonierungsvektor pCR2.1 Topo generieren. Diese konnte mittels der Restriktionsenzyme AccI und ClaI aus dem unter 4.2.3.2 generierten Expressionsvektor pUC29-IF-zeo_{mut} ausgeschnitten werden und ergab dadurch ein 278 bp langes Fragment. Dieses wurde nach einer Gelaufreinigung über dieselben Schnittstellen in die jeweiligen chimären SeV-F Hüllglykoproteine in den pCR2.1 Topo Vektor eingefügt. Analog zu den chimären SeV-F Hüllglykoproteinen konnten nun die chimären SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine aus den pCR2.1 Topo Vektor in den eukaryontischen Expressionsvektor pI.18 umklont werden.

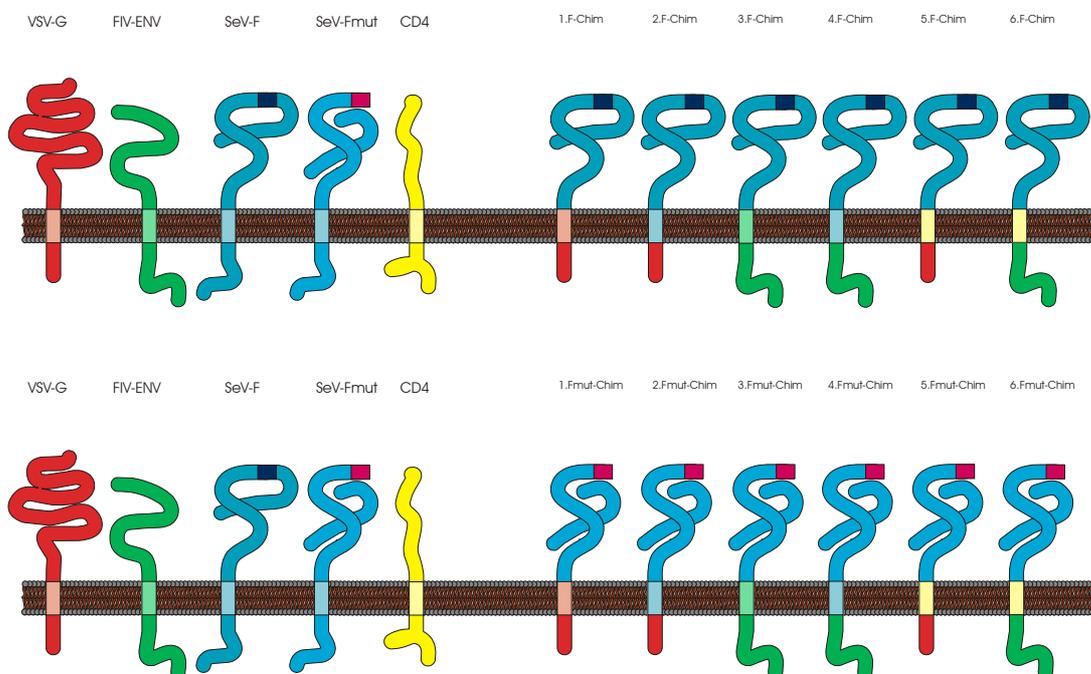


Abbildung 4-18: Schematische Darstellung nativer, chimärer viraler Hüllproteine

Auf der linken Seite ist der Aufbau der nativen viralen Hüllproteine schematisch dargestellt (**rot**: das Fusionsglykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV); **grün**: das Hüllprotein (ENV - Envelope) von FIV; **blau**: das zu aktivierende und das konstitutiv fusionsaktive Fusionsglykoprotein des Sendai Virus (SeV); **gelb**: das T-Zell Oberflächenglykoprotein CD4). Auf der rechten Seite sind die chimären Hüllproteine #1-6 dargestellt, die sich jeweils aus der (i) extrazellulären, der (ii) Transmembran- und der (iii) zytoplasmatischen Domäne der nativen Hüllproteine zusammensetzen.

Anhand der farblichen Markierungen ist die heterologe (VSV/SeV/CD4) bzw. autologe (FIV) Abstammung der jeweiligen Domänen der generierten chimären Hüllproteine erkennbar. Die Chimären #5-6 besitzen die Transmembrandomäne des sog. CD4-Rezeptors. Die Zellmembran der Vektor-Produzentenzellen wird durch die Lipid-Doppelschicht skizziert; an dieser Stelle sind die jeweiligen Transmembrandomänen lokalisiert.

4.3.2 Expressionsnachweis der chimären SeV-F Hüllglykoproteine

Analog zum Expressions- und Einbaunachweis der drei Varianten der nativen SeV-F Hüllglykoproteine in die Zellmembran der 293T Verpackungszellen wurden die neu generierten chimären SeV-F und SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine überprüft. Dazu wurden 293T Verpackungszellen mit den unter 4.3.1 erzeugten Expressionsvektoren transfiziert und 48 h später eine Immunfluoreszenzmembranfärbung der transfizierten Zellen mit denselben unter 4.2.3.5 eingesetzten Maus anti-SeV-F Primärantikörpern sowie Ziege anti-Maus Sekundärantikörpern durchgeführt.

Für alle chimären SeV-F und SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine konnten die Expression, der Einbau in die Zellmembran und die Präsentation auf der Oberfläche der 293T Zellen gezeigt werden. Die Negativkontrollen, bei denen entweder nur Erst-, Sekundärantikörper oder kein Antikörper eingesetzt wurden, zeigten keine Fluoreszenz.

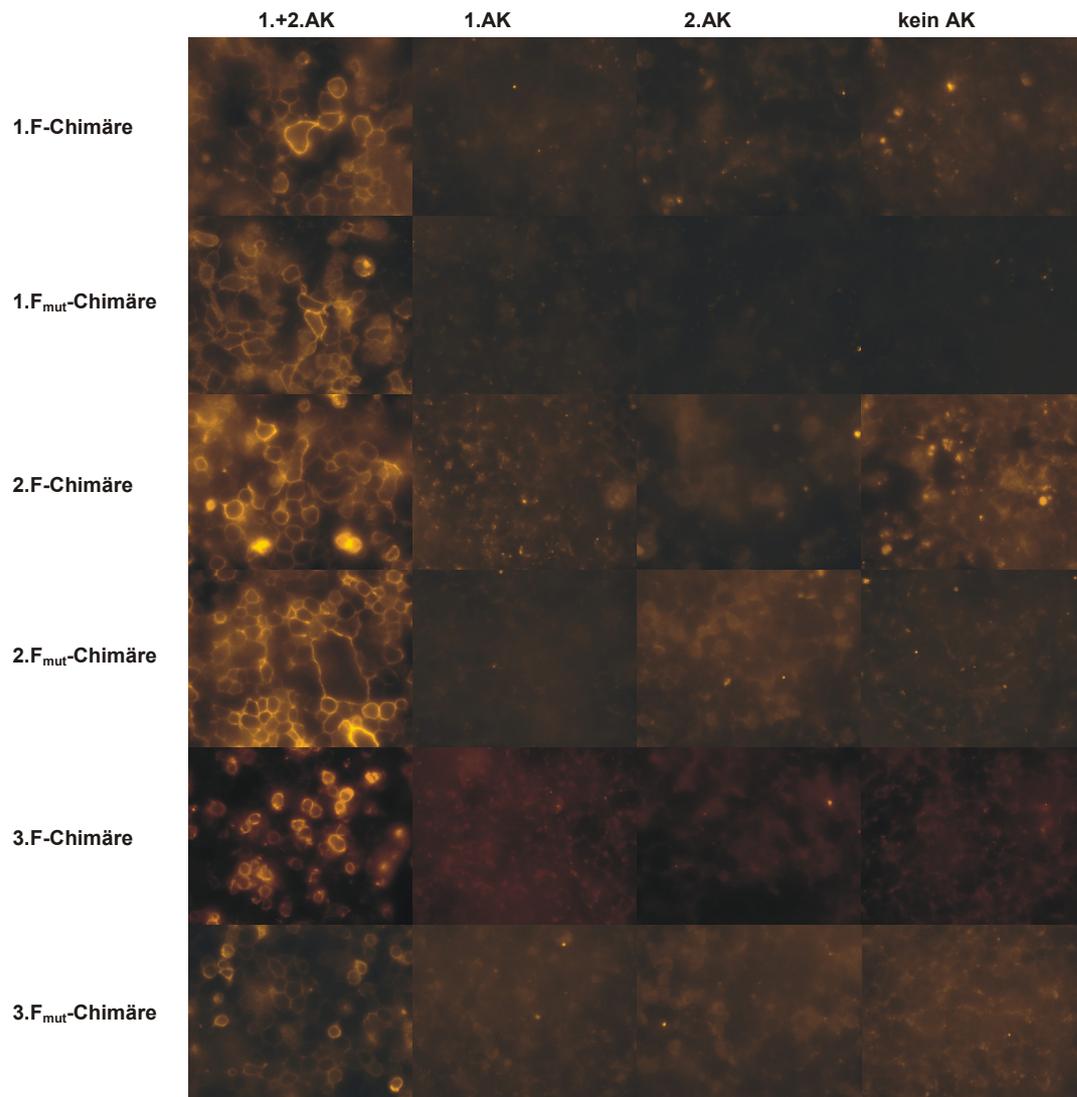


Abbildung 4-19: Immunfluoreszenznachweis der in 293T Verpackungszellen exprimierten 1. bis 3. chimären SeV-F und SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine

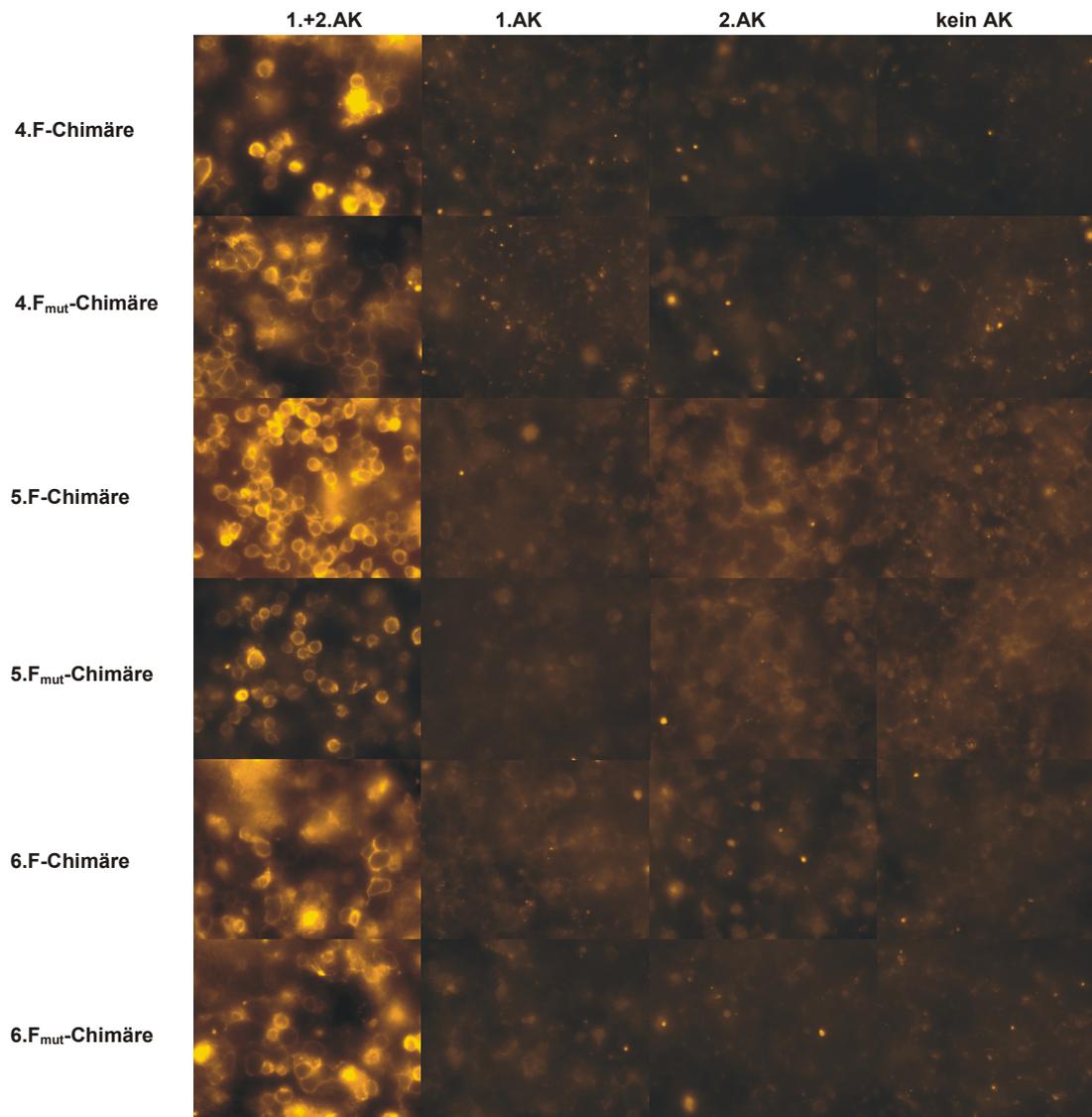


Abbildung 4-20: Immunfluoreszenznachweis der in 293T Verpackungszellen exprimierten 4. bis 6. chimären SeV-F und SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine

4.3.3 Nachweis des Einbaus der nativen SeV-F Hüllglykoproteine und chimären SeV-F bzw. SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine in die FIV Virushülle

Durch die Generierung von rekombinanten FIV-Viruspartikeln, pseudotypisiert mit den unter 4.2.3.1 - 4.2.3.3 und 4.3.1 beschriebenen SeV-F Hüllglykoprotein-Varianten, bestand die Möglichkeit, durch Ultrazentrifugation die viralen Partikel aufzukonzentrieren. Dieses Viruspellet konnte durch anschließende Lyse und Denaturierung im Westernblot auf den Gehalt an inkorporiertem SeV-F Hüllglykoprotein und lentiviralem Nukleokapsidprotein p24 analysiert werden. In der Abbildung 4-21 ist das Ergebnis dieser Westernblot-Analyse gezeigt.

Spur 1 zeigt die ca. 61 kDa SeV-F₀ Bande aus der HeLa-F Zelllinie. Der Proteinstandard mit den Markerbanden bei 35 kDa, 50 kDa und 75 kDa ist auf Spur 2, 6, 10 und 23 zu sehen. Für die nativen SeV-F Hüllglykoproteine SeV-F (Spur 3) und SeV-F_{mut} (Spur 5) konnte im nachhinein eine Integration in die FIV-Virushülle gezeigt werden. Bei SeV-F_{mut} ist sowohl das inkorporierte ungespaltene SeV-F_{mut 0} als auch das bereits aktivierte und somit gespaltene SeV-F_{mut 1} zu sehen. Das SeV-F_{del} (Spur 4) dagegen ist in der FIV-Hülle nicht nachweisbar. Verglichen mit den nativen SeV-F Hüllglykoproteinen konnte für die chimären SeV-F bzw. SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine (Spur 7, 8 und 11-20) nur eine Inkorporation mit gleichzeitiger Co-Präzipitation von p24 für das chimäre 2. SeV-F Hüllglykoprotein nachgewiesen werden, bei allen anderen chimären SeV-F bzw. SeV-F_{mut} Hüllglykoproteinen war keine Inkorporation in die FIV-Virushülle zu erkennen, jedoch in unterschiedlichen Mengen das Nukleokapsidprotein p24. Eine Sendai Virus_{EGFP} Präparation aus einer Eipassage (aufgetragen in Spur 21) zeigte ebenfalls in großer Menge inkorporiertes SeV-F₀, aber auch SeV-F₁. Um falsch-positive Signale aufgrund einer eventuellen Verschleppung des SeV-F Hüllglykoproteins in den Zellkulturüberstand auszuschließen, wurde ultrazentrifugierter Überstand (Spur 22) von 293T Verpackungszellen, die mit dem für SeV-F kodierenden Expressionsplasmid pUC29-IF-zeo transfiziert waren, ebenfalls aufgetragen. Der Zellkulturüberstand war negativ für SeV-F.

Ein Einbau des SeV-F Proteins in die Virushülle von FIV konnte gezeigt werden. Diese im Rescue erzeugten FIV-SeV-F Pseudotypen waren jedoch nicht fähig, die bislang für die Transduktion verwendeten Zelllinien zu infizieren.

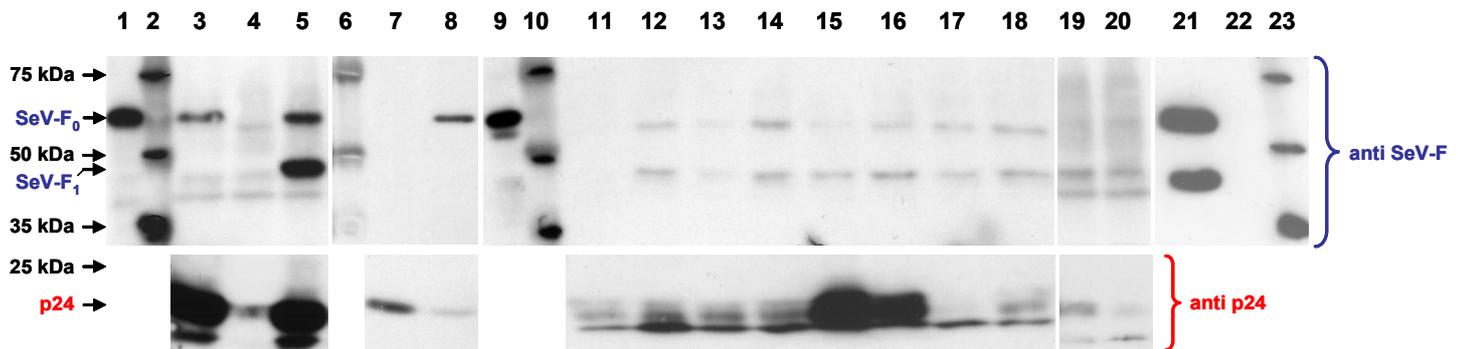


Abbildung 4-21: Einbaunachweis der nativen SeV-F und chimären SeV-F bzw. SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine in die FIV Virushülle

Generierte FIV-Überstände, pseudotypisiert mit den nativen SeV-F und chimären SeV-F bzw. SeV-F_{mut} Hüllglykoproteinen, wurden ultrazentrifugiert; die erhaltenen FIV-Pellets wurden für die Westernblot-Analyse auf SeV-F Inkorporation und für die p24-Nukleokapsidprotein-Detektion eingesetzt.

Spur 1: Zelllysat HeLa-F, **Spur 2:** Protein-Standard, **Spur 3:** Überstand SeV-F u. p24, **Spur 4:** Überstand SeV-F_{del} u. p24, **Spur 5:** Überstand SeV-F_{mut} u. p24, **Spur 6:** Protein-Standard, **Spur 7:** Überstand 1.SeV-F Chimäre u. p24, **Spur 8:** Überstand 2.SeV-F Chimäre u. p24, **Spur 9:** Zelllysat HeLa-F, **Spur 10:** Protein-Standard, **Spur 11:** Überstand 3.SeV-F Chimäre u. p24, **Spur 12:** Überstand 4.SeV-F Chimäre u. p24, **Spur 13:** Überstand 5.SeV-F Chimäre u. p24, **Spur 14:** Überstand 6.SeV-F Chimäre u. p24, **Spur 15:** Überstand 1.SeV-F_{mut} Chimäre u. p24, **Spur 16:** Überstand 2.SeV-F_{mut} Chimäre u. p24, **Spur 17:** Überstand 3.SeV-F_{mut} Chimäre u. p24, **Spur 18:** Überstand 4.SeV-F_{mut} Chimäre u. p24, **Spur 19:** Überstand 5.SeV-F_{mut} Chimäre u. p24, **Spur 20:** Überstand 6.SeV-F_{mut} Chimäre u. p24, **Spur 21:** Sendai Virus_{EGFP} aus Eipassage, **Spur 22:** Überstand SeV-F transfizierter 293T Verpackungszellen, **Spur 23:** Protein-Standard.

4.3.4 Funktioneller Nachweis der chimären SeV-F bzw. SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine im Rescue

Für die chimären SeV-F und SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine galt es, nach erfolgtem Expressionsnachweis mittels der 293T-Zelllinie, pseudotypisierte FIV-Partikel herzustellen und für eine Transduktion des ausgewählten Zellpanels einzusetzen. Die Herstellung der viralen Überstände mit den einzelnen Varianten der chimären Hüllglykoproteine erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für die nativen SeV-F Hüllglykoproteine. Dies galt ebenso für die Transduktion der Rezipientenzellen, beschrieben unter 4.2.3.6. In der Tabelle 4-4 ist das Ergebnis der Transduktion der Rezipientenzellen gezeigt. Ergänzend sind die Immunfluoreszenzaufnahmen Abbildung 4-22 und Abbildung 4-23 in der Reihenfolge entsprechend den in der Tabelle gelisteten FIV-Pseudotypen gezeigt. Auch hier konnte keine Transduktion der verwendeten Rezipientenzellen durch die verschiedenen FIV-Pseudotypen erzielt werden, die für das Reportergen *dsred2* kodieren. Dies hätte ebenfalls in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse durch rot fluoreszierende Rezipientenzellen nachgewiesen werden können.

Transduktion von Rezipienten-Zelllinien							
Pseudotypen	HepG2	M12	MDCK	BHK	CrFK	293T	NIH 3T3
FIV 1.SeV-F Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 2.SeV-F Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 3.SeV-F Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 4.SeV-F Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 5.SeV-F Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 6.SeV-F Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 1.SeV-F _{mut} Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 2.SeV-F _{mut} Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 3.SeV-F _{mut} Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 4.SeV-F _{mut} Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 5.SeV-F _{mut} Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 6.SeV-F _{mut} Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.

Tabelle 4-4: Kein Transduktionsnachweis von ASGP-R exprimierenden Rezipientenzellen

Mit den verschiedenen chimären SeV-F bzw. SeV-F_{mut} Hüllglykoprotein-Chimären pseudotypisierte lentivirale Überstände konnte keine Transduktion von Zelllinien unterschiedlichsten Ursprungs nachgewiesen werden. Das gilt auch für ASGP-R exprimierende Zelllinien. (-) entspricht nicht transduziert und (n.d.) entspricht nicht durchgeführt.

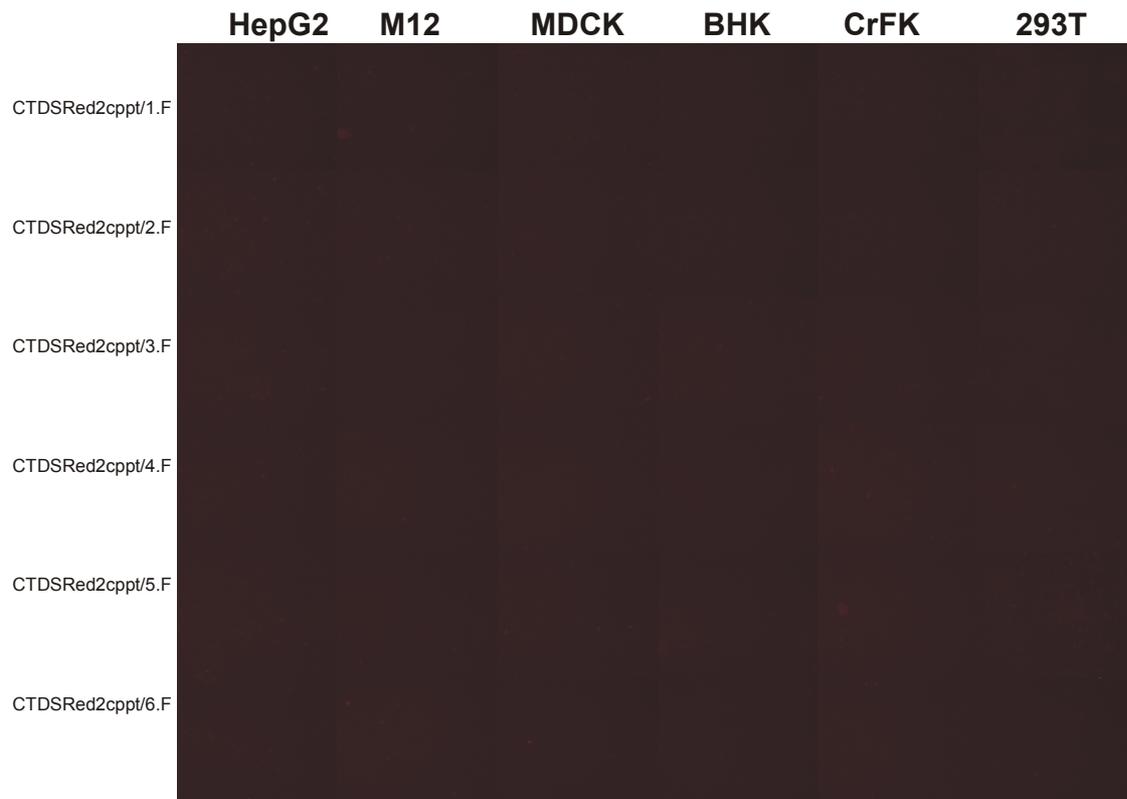


Abbildung 4-22: Kein Transduktionsnachweis ASGP-R exprimierender Zellen

Mit den SeV-F Chimären Nr.1-6 pseudotypisierten lentiviralen Überständen konnte keine Transduktion von Zelllinien unterschiedlichsten Ursprunges nachgewiesen werden. Das gilt auch für die ASGP-R exprimierenden Zelllinien HepG2 und M12.

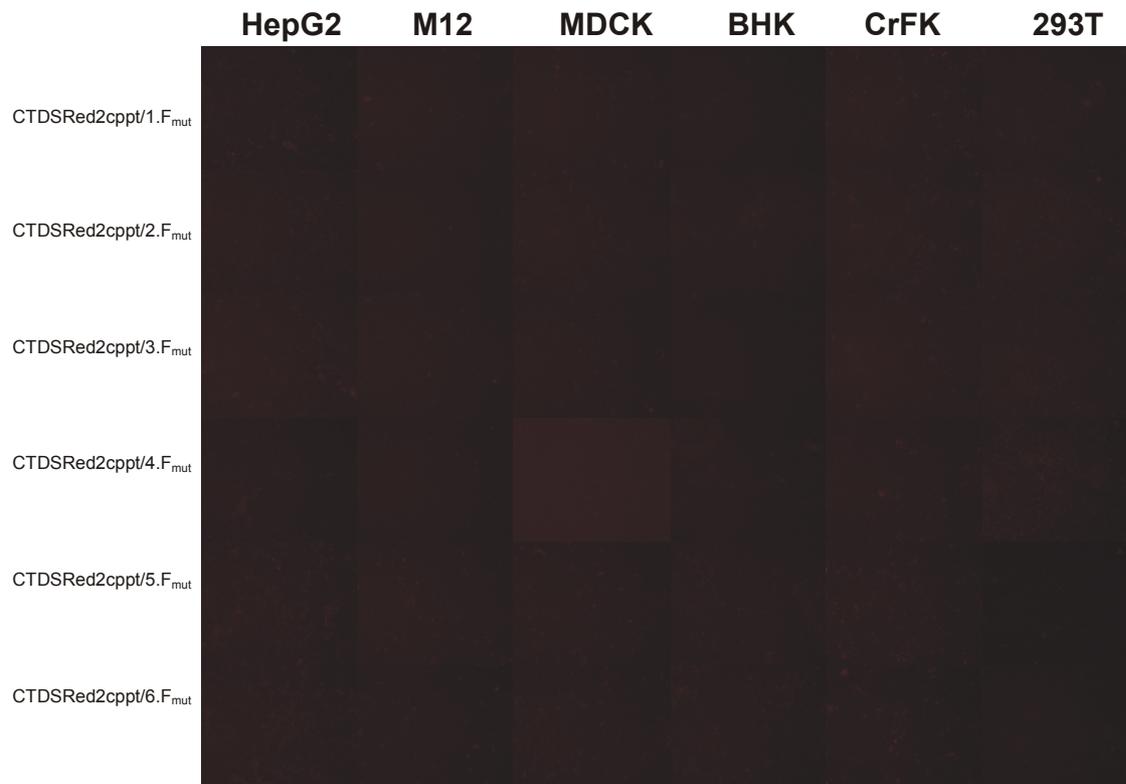


Abbildung 4-23: Kein Transduktionsnachweis ASGP-R exprimierender Zellen.

Mit den SeV-F_{mut} Chimären Nr. 1-6 pseudotypisierten lentiviralen Überständen konnte keine Transduktion von Zelllinien unterschiedlichsten Ursprunges nachgewiesen werden. Das gilt auch für die ASGP-R exprimierende Zelllinien HepG2 und M12.

4.4 SeV-F und SeV-HN pseudotypisiertes FIV mit pantropen Transduktionseigenschaften

Da das SeV-F Hüllprotein wildtypisch ausschließlich in Begleitung des SeV-HN Proteins in der Hülle des Sendai Virus vorkommt und nur beide viralen Hüllglykoproteine in Kombination bei Einbau in die Sendai Virus Hülle ohne Einschränkungen zu infektiösen Sendai Viren im Rescue führen, wurde in der nächsten Serie von Experimenten das SeV-HN Hüllglykoprotein zusätzlich zu dem SeV-F für die Generation von FIV-SeV-F/HN Pseudotypen eingesetzt. Diese Pseudotypen wurden anstelle der bisher verwendeten Tripeltransfektion nun durch eine Vierfachtransfektion von FIV-Transfektor (CTEGFP oder CTDSRed2cppt), Verpackungsplasmid (CF1Δenv) und den beiden Expressionsplasmiden für die Hüllglykoproteine SeV-F (pUC29-IF-zeo) und SeV-HN (pI.18-HN) in die 293T Verpackungszellen hergestellt. Der gewonnene Überstand wurde bezüglich der Filtration, SeV-F Aktivierung und dem Zusatz von Polybrene, wie unter 4.2.3.6 beschrieben, gleich behandelt. Dasselbe gilt für die Durchführung der Transduktion der Rezipientenzellen.

Im Gegensatz zu den SeV-F 1-fach Pseudotypen konnte nun 48 h nach der Transduktion mit den SeV-F/HN 2-fach Pseudotypen eine Expression des *egfp*- und des *dsred2*-Reportergens in allen Rezipientenzelllinien nachgewiesen werden, siehe Abbildung 4-24.

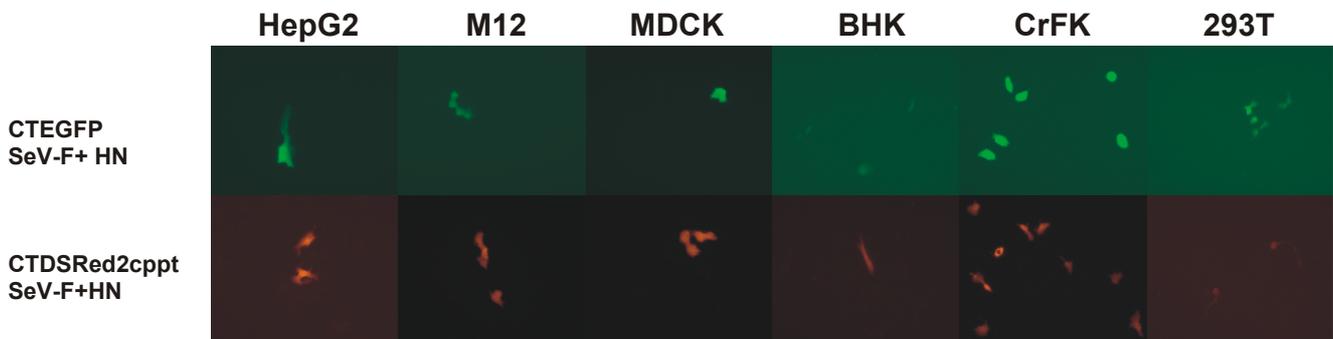


Abbildung 4-24: Pantrope Transduktionseigenschaften von FIV, pseudotypisiert mit SeV-F und SeV-HN
Wurde FIV neben SeV-F zusätzlich mit SeV-HN pseudotypisiert, konnten infektiöse Partikel generiert werden, die pantrope Transduktionseigenschaften vorwiesen und damit in der Lage waren, eine Vielzahl von Zelllinien zu transduzieren.

4.4.1 Einbaunachweis von SeV-HN in virale Partikel durch einen Hämagglutinations (HA)-Test

Durch einen HA-Test ist es möglich, eine Aussage über die Anzahl SeV-HN-tragender Partikel zu treffen. Das Prinzip des Tests beruht auf der Bindung viraler Adhäsionsproteine, wie etwa des HN-Proteins, an Sialinsäure-Reste, die auf einer Vielzahl von Zelltypen sehr zahlreich vertreten sind, wie zum Beispiel auf der Zelloberfläche von humanen Erythrozyten. Dadurch können die Zelladhäsionsproteine der Viren direkt an die Erythrozyten binden, wodurch diese agglutinieren oder ein Netzwerk bilden können, bestehend aus Viren und Zellen.

Bei einem erfolgreichen Einbau des SeV-HN Hüllglykoproteins in die Virushülle des FIV, sollte durch einen HA-Test die Agglutination von Erythrozyten vermittelt werden, da hier das SeV-HN Hüllglykoprotein das alleinige Zelladhäsionsprotein in der FIV Hülle darstellt.

Eine Inkorporation des SeV-HN Hüllglykoproteins in die Virushülle des FIV konnte nachgewiesen werden, siehe hierzu Abbildung 4-25. Dazu wurden, wie zuvor beschrieben, virale Überstände generiert, die SeV-F/HN oder SeV-F_{mut}/HN pseudotypisierte FIV-Partikel enthielten. Die Überstände des SeV-F/HN Pseudotyps wurden für den HA-Test in nicht-aktiviertem und aktiviertem Zustand eingesetzt. Alle generierten Überstände wurden im Verhältnis 1:1 mit einer 1% humanen Erythrozytenlösung vermischt und für 1 h bei 4°C inkubiert.

Eine Agglutination der Erythrozyten konnte erreicht werden 1. mit nicht-aktivierten SeV-F/HN Pseudotypen, 2. mit aktivierten SeV-F/HN Pseudotypen und 3. mit SeV-F_{mut}/HN Pseudotypen.

Ebenso wurden die Erythrozyten agglutiniert, wenn sie mit aktiviertem Sendai Virus_{EGFP} aus der Eipassage, das hier als Positiv-Kontrolle diente, vermischt wurden. Dagegen kam es zu keiner Agglutination der Erythrozyten bei Anwendung von FIV-VSV-G Pseudotypen oder DMEM supplementiert mit 10% FCS.

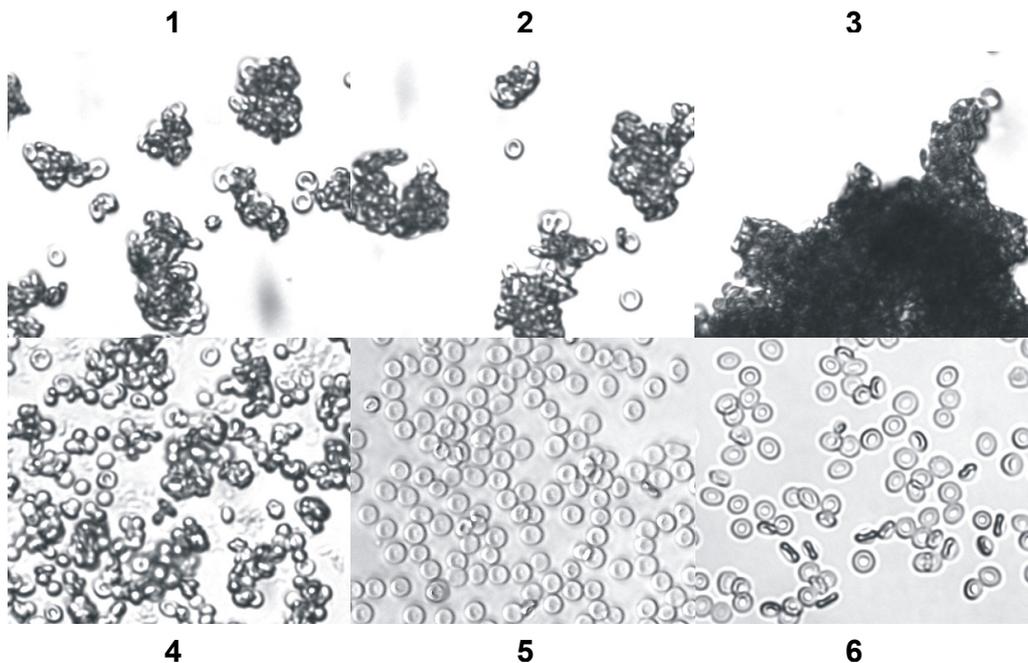


Abbildung 4-25: Einbaunachweis des SeV-HN Hüllglykoproteins in SeV-F/HN pseudotypisierte FIV-Partikel durch einen HA-Test

Pseudotypisierte FIV-Überstände wurden für einen HA-Test eingesetzt, der als Einbaunachweis für SeV-HN in die Hülle des FIV dient und die Agglutination der zugegebenen Erythrozyten bewirkt. Pseudotypisierte virale Überstände wurden 1:1 mit einer 1% humanen Erythrozyten-Lösung versetzt und 1h bei 4°C inkubiert. **1) FIV-SeV-F/HN**, nicht aktiviert, Agglutination **2) FIV-SeV-F/HN**, aktiviert, Agglutination **3) FIV-SeV-F_{mut}/HN**, Agglutination **4) Sendai Virus_{EGFP}**, aktiviert, Agglutination **5) FIV-VSV-G**, keine Agglutination **6) DMEM + 10% FCS**, keine Agglutination

4.5 Ecotropes Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) pseudotypisiert mit SeV-F

Für die Durchführbarkeit einer Pseudotypisierung von FIV mit dem SeV-F Hüllglykoprotein diente das MoMLV-SeV-F Modell nach ¹⁶² als Grundlage und gleichzeitig als Positivkontrolle für die Transduktionsexperimente mit den FIV-SeV-F Pseudotypen. In der Abbildung 4-26 sind zum Teil erfolgreich transduzierte Rezipientenzellen des bislang verwendeten Zellpanels gezeigt. In der obersten Reihe wurde Produzentenzellüberstand eingesetzt, der nur mit SeV-F pseudotypisierte MoML-Viren enthielt. Die in der mittleren Reihe gezeigten Zelllinien wurden mit einem ecotropen

MoML-Virus transduziert, das zusätzlich mit dem SeV-F Hüllglykoprotein pseudotypisiert war und das Reporterogen *egfp* kodierte. In der unteren Reihe wurden die verschiedenen Zelllinien zum Vergleich mit einem unveränderten ecotropen MoML-Virus transduziert. Die MoMLV-SeV-F Pseudotyp-haltigen Überstand war eine Transduktion aller im Rezipientenzellpanel enthaltener Zelllinien nicht möglich. Das ecotrope MoML-Virus war lediglich in der Lage die murine Zelllinie NIH 3T3 zu transduzieren, da nur diese über den Rec-1 Rezeptor verfügt, an den das ecotrope Hüllglykoprotein von MoMLV andocken kann. Über diese Verbindung findet anschließend die Internalisierung des Virus in die Wirtszelle statt. Dagegen konnte das MoML-Virus, das neben dem ecotropen Hüllglykoprotein zusätzlich noch das SeV-F Protein in der Virus-Membran besitzt, mit Ausnahme der BHK-Zelllinie, alle anderen Rezipientenzellen des Zellpanels transduzieren und zeigte somit pantrope Transduktionseigenschaften. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von ¹⁶². Dort wurde beschrieben, dass MDCK-Zellen von ecotropen, mit SeV-F pseudotypisierte MoML-Viren nicht transduziert werden konnten. Die erfolgreiche Transduktion der Rec-1 exprimierenden NIH 3T3-Zellen, und der ASGP-R exprimierende HepG2- und M12-Zellen konnte damals schon gezeigt werden. CrFK- und 293T-Zellen wurden damals in dieser Arbeit nicht im Transduktionsassay ausgetestet.

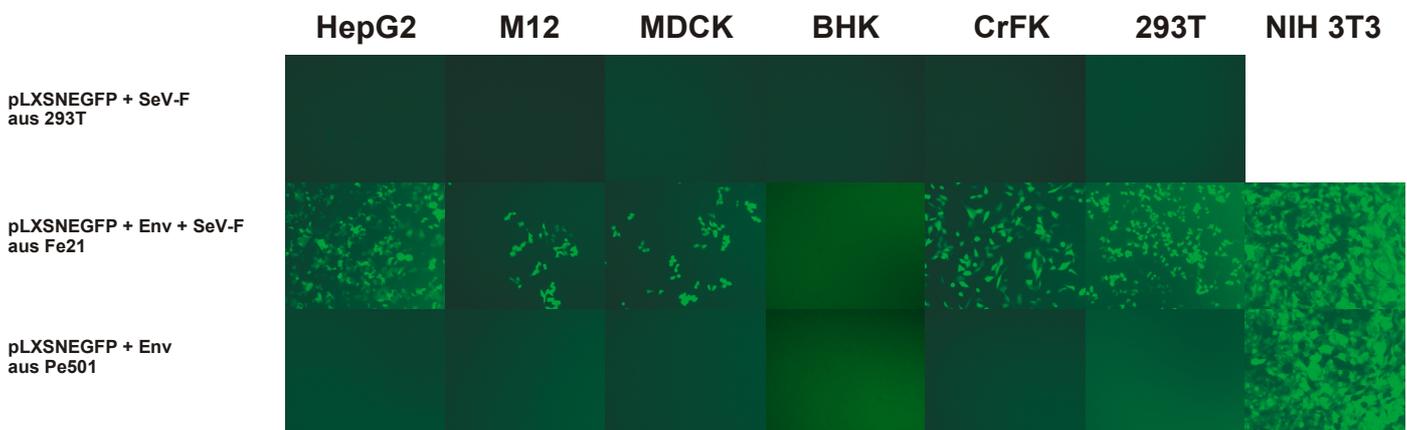


Abbildung 4-26: Ecotropes MoMLV pseudotypisiert mit SeV-F zeigt pantrope Transduktionseigenschaften im Vergleich zu rein ecotropen MoMLV

MoML-Viren, die von der retroviralen Verpackungszelllinie PE501 stammen, besitzen lediglich ein ecotropes Hüllglykoprotein in der Virus-Hülle und können somit ausschließlich murine Zellen (NIH 3T3) transduzieren. MoML-Viren dagegen, die aus der FE21 Verpackungszelllinie stammen, sollten zusätzlich zu dem ecotropen Hüllglykoprotein das native SeV-F in der Virushülle besitzen. Diese Pseudotypen zeigten pantrope Transduktionseigenschaften, allerdings mit der Ausnahme, dass keine Hamsterzellen (BHK) transduziert werden konnten. Der Nachweis von MoMLV transduzierten Zellen wurde durch ein vom MoMLV kodiertes Reporterogen (*egfp*) durch auftretende Grünfluoreszenz ermöglicht.

4.6 SeV-F kodierende replikationskompetente Retroviren (RCRs)

4.6.1 Generierung neuer SeV-F pseudotypisierter replikationskompetenter Retroviren (RCR) auf Basis von MoMLV

Parallel zu den Pseudotypisierungsversuchen des lentiviralen FIV mit den SeV-F Hüllglykoproteinvarianten wurde bei einem replikationskompetenten Retrovirus (RCR) auf Basis von MoMLV der Austausch des amphotropen endogenen Hüllglykoprotein-Genes gegen das heterologe SeV-F und SeV-Fmut Hüllglykoprotein-Gen unter Erhalt des Leserahmens durchgeführt, um auf diese Weise einen Hepatotropismus dieser RCR-Vektoren (restringierte Adressierung ASGP-R exprimierender Hepatozyten und Hepatomzellen) zu erzeugen. Für den Austausch wurden die im pEA-Ausgangsvektor (Abbildung 4-27) vorhandenen Schnittstellen SfiI und ClaI, die sich direkt im Anschluß der Leadersequenz und in Nähe des Stopcodon des amphotropen endogenen Hüllglykoproteins befinden, verwendet. Dadurch blieb die ursprüngliche MoMLV-Envelope-eigene Signalsequenz erhalten, deren Funktion die der SeV-F eigenen Signalsequenz ersetzt. Die 5'-SfiI- und die 3'-ClaI-Schnittstellen wurden über Primer mittels PCR der Sequenz von SeV-F und SeV-F_{mut} angehängt, sodass ein zwangloser Austausch unter Beibehaltung des Leserahmens möglich wurde.

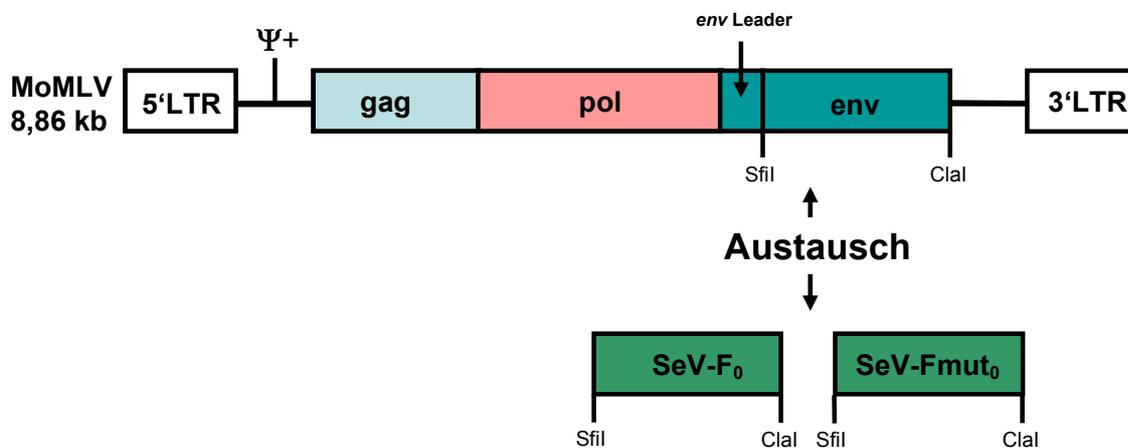


Abbildung 4-27: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zum Austausch des endogenen amphotropen Hüllglykoproteingenes mit den SeV-F und -Fmut Varianten

Der Hüllglykoproteingenaustausch geschah über die Restriktionsschnittstellen SfiI und ClaI unter Beibehaltung der Leadersequenz des endogenen Hüllglykoproteins von MoMLV.

4.6.2 Expressionsnachweis des SeV-F und SeV-F_{mut} in 293T Verpackungszellen

Ein Expressionsnachweis der in das RCR-Genom klonierten SeV-F Varianten konnte durch eine Transfektion der 293T Verpackungszellen mit den neu generierten RCR-SeV-F und RCR-SeV-F_{mut} Vektoren und einer anschließenden immunhistochemischen Membranfärbung gegen das SeV-F und SeV-F_{mut} Hüllglykoprotein gezeigt werden, siehe Abbildung 4-28. Weiterhin konnte durch diese Membranfärbung gezeigt werden, dass das Leaderpeptid des amphotropen endogenen Hüllglykoproteins von MoMLV den Einbau der SeV-F Hüllglykoproteine in die Zellmembran der 293T Verpackungszelle unterstützt und diese somit zugleich für den Einbau in die Virushülle ausknospender RCRs zu Verfügung stehen. Die im Rahmen dieser immunhistochemischen Färbung durchgeführten Negativkontrollen belegen die Spezifität des verwendeten Erst- und Sekundärantikörpers.

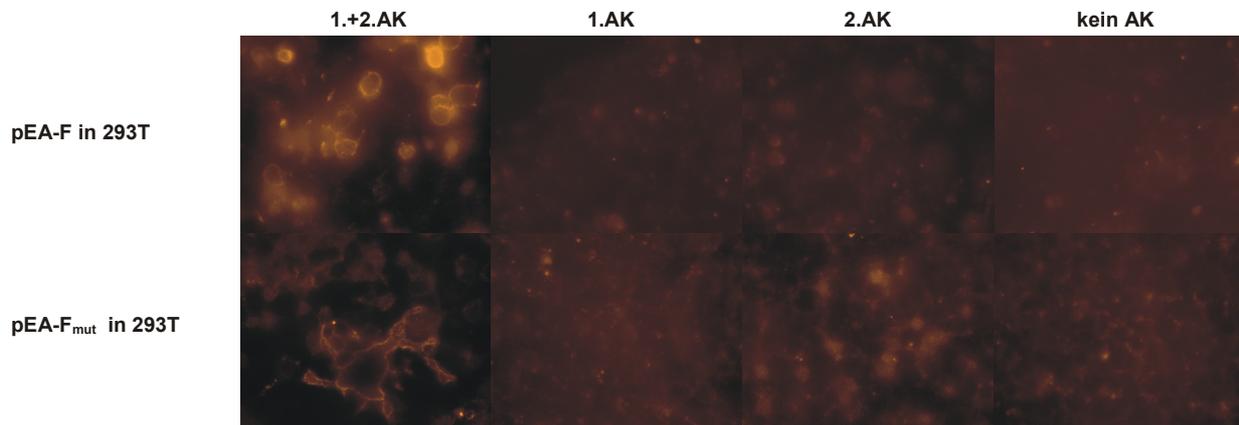


Abbildung 4-28: Immunfluoreszenznachweis nach Transfektion der RCR Transfervektoren in 293T Verpackungszellen, die für SeV-F und SeV-F_{mut} kodieren.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde 48 h nach Transfektion SeV-F und SeV-F_{mut} kodierender RCR Vektoren durchgeführt. Sowohl SeV-F als auch SeV-F_{mut} konnten in der Zellmembran der 293T Verpackungszellen nachgewiesen werden (durch Verwendung eines Maus anti-SeV-F und eines weiteren Alexa 546 gekoppelten Ziege anti-Maus Sekundärantikörpers).

4.6.3 Western Blot-Nachweis für den SeV-F Einbau in RCRs

Wie bereits in 4.3.3 beschrieben, konnten auch hier durch Anreicherung der erzeugten viralen Partikel mittels Ultrazentrifugation und anschließender Lyse des Viruspellets die erzeugten Pseudotypen auf die Inkorporation der SeV-F und SeV-F_{mut} Hüllglykoproteine in die Virushülle im Westernblot überprüft werden. Nach der Lyse der Viruspellets wurden diese aufgeteilt. Eine Hälfte wurde für den Inkorporationsnachweis der SeV-F und SeV-F_{mut} Varianten verwendet; die andere Hälfte für den Inkorporationsnachweis des retroviralen Nukleokapsidproteins p30 in virale Partikel.

Wie in Abbildung 4-29 gezeigt, konnte eine Inkorporation von SeV-F und SeV-F_{mut} in die Hülle von RCRs gezeigt werden. Gleichzeitig konnte auch das Vorhandensein des Nukleokapsidproteins p30 mit einer Größe von 30 kDa nachgewiesen werden. In Spur 1 wurde Lysat der Zelllinie HeLa-F (Positivkontrolle für SeV-F Nachweis) aufgetragen und zeigt das ungespaltene SeV-F₀. Spur 2 zeigt den Protein-Standard und Spur 3 das ungespaltene SeV-F₀ Hüllglykoprotein und zugleich das p30 Nukleokapsidprotein. In Spur 4 konnten die F₁-Domäne des bereits gespaltenen SeV-F_{mut} und ebenfalls das p30 nachgewiesen werden. In Spur 5 wurde das lysierte Viruspellet aufgetragen, das aus dem Überstand mit dem retroviralen Transfervektor pLXSNEGFPneo transfizierter FE21 Verpackungszellen generiert wurde. Es konnte hier im Westernblot kein SeV-F detektiert werden, dagegen aber das p30 Nukleokapsidprotein.

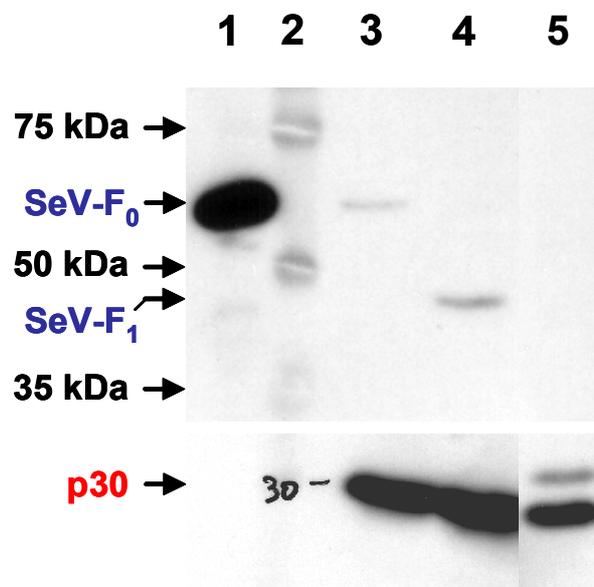


Abbildung 4-29: Western Blot-Nachweis der SeV-F und SeV-F_{mut} Inkorporation in die generierten RCR-Partikel (nach Ankonzentration der im Überstand enthaltenen Partikel mittels Ultrazentrifugation)

Parallel zum SeV-F-Nachweis wird auch p30, das Nukleokapsid-Protein von MoMLV, nachgewiesen. **Spur 1:** Zellysat der HeLa-F Zelllinie, **Spur 2:** Protein-Standard, **Spur 3:** Überstand von RCR-SeV-F, **Spur 4:** Überstand von RCR-SeV-F_{mut}, **Spur 5:** Überstand pLXSNEGFPneo aus der FE21 Verpackungszelllinie

4.6.4 Funktioneller Nachweis von SeV-F und SeV-F_{mut} pseudotypisierten RCRs

Für den funktionellen Nachweis einer Transduktion der Rezipientenzelllinien mit den SeV-F und SeV-F_{mut} pseudotypisierten RCRs konnte aufgrund fehlender Reportersequenzen im RCR-Genom nicht wie bisher die Detektion eines exprimierten Reportergens herangezogen werden. Stattdessen wurde ein Immunperoxidase-Assay (IPA) durchgeführt, um mögliche transduzierte Rezipientenzellen nachzuweisen. Der Immunperoxidase-Assay beruht auf der immunhistochemischen Detektion des retroviralen Nukleokapsidproteins p30, das nach der Transduktion aufgrund der replizierenden Natur des RCRs angereichert im Zytoplasma der Rezipientenzelle vorliegt. Dabei kommt es bei der immunhistochemischen Färbung zu einem rot-braunem Farbniederschlag in der transduzierten Zelle, sodass der komplette Zellkörper, mit Ausnahme des Zellkerns, angefärbt ist, siehe hierzu Abbildung 4-30. So konnten mit dem Ausgangsvektor pEA, der für das Genom eines amphotropen RCRs kodierte und hier als Positiv-Kontrolle für den p30 Nachweis diente, HepG2-, CrFK- und 293T-Zellen transduziert werden. Alle diese genannten Zelllinien zeigten den typischen rot-braunen Farbniederschlag im Zytoplasma. Auch war zu erkennen, dass der komplette Zellrasen zum Zeitpunkt der Färbung 48 h nach der Transduktion mit dem amphotropen RCR durchinfiziert war. Nicht transduziert werden konnten dagegen die Rezipientenzelllinien M12, MDCK und BHK. Nicht transduzierte Rezipientenzelllinien, die für die Bestimmung der Hintergrundfärbung mittels IPA dienten, zeigten keinen rot-braunen Farbniederschlag, der für transduzierte Zellen typisch ist. Somit konnte keine Transduktion von ASGP-R-exprimierenden Zelllinien durch SeV-Hüllprotein enthaltende MoMLV-RCRs erreicht werden. Ebenfalls kein Transduktionsnachweis der verwendeten Rezipientenzelllinien konnte für die mit SeV-F und SeV-F_{mut} pseudotypisierten RCRs erbracht werden. Dies gilt für die sowohl ASGP-R exprimierenden sowie nicht-ASGP-R exprimierenden Rezipientenzelllinien.

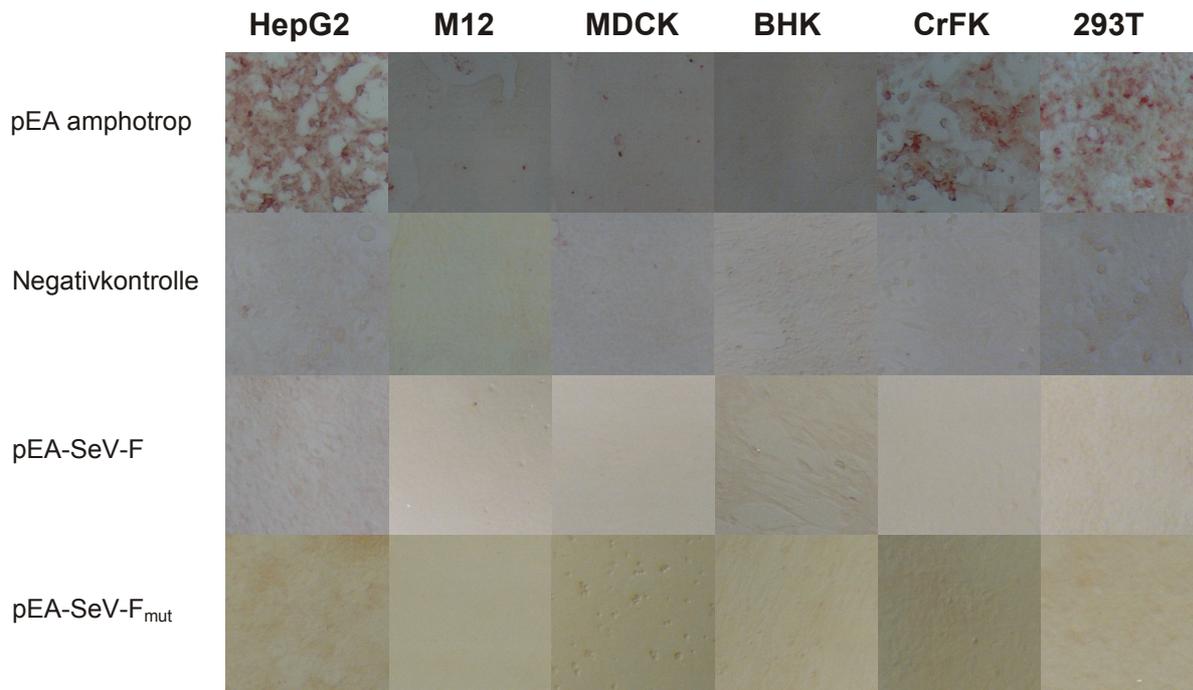


Abbildung 4-30: Immunperoxidase-Assay als Transduktionsnachweis für verschiedene Rezipientenzelllinien sowohl durch den RCR-Ausgangsvektor pEA (Positiv-Kontrolle) als auch durch die mit den SeV-F und SeV-F_{mut} pseudotypisierten RCRs
 Durch einen amphotropen RCR Vektor lassen sich HepG2-, CrFK- und 293T Zellen transduzieren, erkennbar an dem rot-braunem Niederschlag im Zytoplasma dieser Zellen nach dem IPA-Test 48 h nach Transduktion. Nicht transduzieren lassen sich M12-, MDCK- und BHK-Zellen. Hier ist keine Färbung zu erkennen. Als Negativ-Kontrolle und somit zur Bestimmung des Hintergrundes dienten nicht transduzierte Rezipientenzelllinien. Hier war erwartungsgemäß keine Färbung der Rezipientenzellen zu erkennen. Ebenfalls war keine Färbung und somit keine Transduktion der mit den RCR-SeV-F und RCR-SeV-F_{mut} behandelten Rezipientenzellen zu erkennen.

4.7 Suizidgen kodierende RCRs

4.7.1 Generation und Evaluation eines neuen Replikationskompetenten Retroviralen (RCR) Vektors, kodierend für das SuperCD Suizid-Gen

Das SuperCD-Gen kodiert für ein Fusionsprotein aus YCD (474 bp) und YUPRT (648 bp); dabei erfolgte die Klonierung unter Deletion des Stopcodons von YCD und Deletion des Startcodons von YUPRT (bei Beibehaltung des Leserahmens). Da das YCD-Gen sowohl im pACE-YCD- als auch im pUC19-SuperCD-Plasmidkonstrukt als Teil des SuperCD-Gens enthalten ist, wurde bei der Umklonierung auf die innerhalb des YCD-Gens liegende Schnittstelle *Bst*Z17I zurückgegriffen. Am 3'-Ende wurde jeweils die *Not*I-Schnittstellen verwandt. Durch Ligation des Fragmentes in das dephosphorylierte pACE-YCD-Vektorfragment wurde das Fusionsgen SuperCD erhalten (siehe Abbildung 4-31).

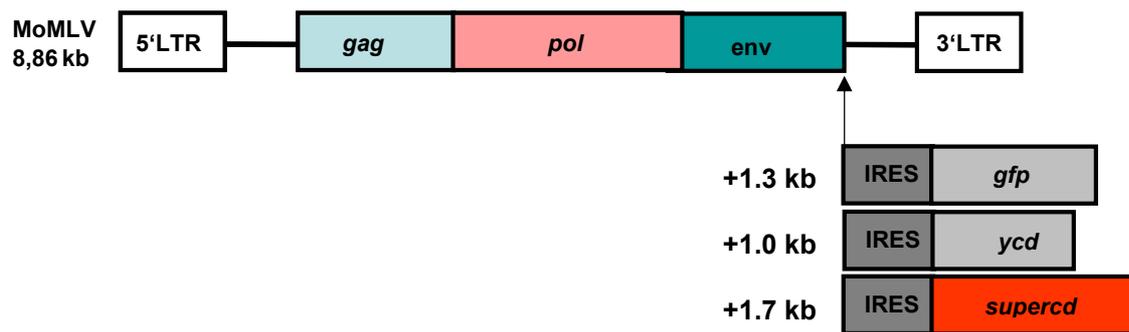


Abbildung 4-31: Schematische Darstellung der Herstellung von RCRs mit Überlänge genom

Über eine interne Ribosomenbindungsstelle (*Internal Ribosome Entry Site* (IRES)) wurden bereits 3' vom Hüllglykoproteinen *env* das Reportergen *gfp* bzw. das Suizidgen Cytosindeaminase der Hefe (*ycd*) unter Beibehaltung des Leserahmens einkloniert. Neu hinzugefügt wurde hier das SuperCD Gen (Fusion aus der Hefe-Cytosindeaminase und der Hefe-Uracilphosphoribosyltransferase).

4.7.1.1 Generierung transienter Retrovirus-Produzentenzellen

Die Produktion rekombinanter replikationskompetenter viraler Vektoren erfolgte durch transiente Transfektion der provirale DNA tragenden Ausgangsplasmide in 293T-Virus-Produzentenzellen. Im Anschluss an einen Mediumwechsel 24 h nach der Transfektion wurden die viralen Überstände über einen Zeitraum von 48 h gesammelt. Abbildung 4-32 zeigt mit dem retroviralen Vektorplasmid pACE-GFP transfizierte 293T-Zellen, die MoMLV-GFP-Vektoren produzieren.

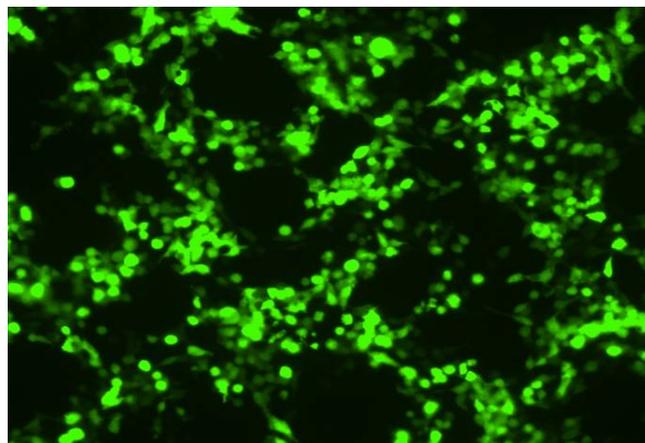


Abbildung 4-32: Produktion von *egfp* kodierenden RCR-Vektoren durch transiente Transfektion der provirale DNA tragenden Ausgangsplasmide in 293T-Virus-Produzentenzellen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme pACE-GFP-transfizierter 293T Zellen zur Generierung von MoMLV-GFP-Vektoren. Die Aufnahme entstand 76 h nach der Transfektion.

Die geernteten Überstände wurden getitert, um sie gezielt für Infektionen von Zielzellen auf der Grundlage analoger *moi* (*multiplicity of infection*)-Werte einsetzen zu können.

4.7.2 Etablierung eines RTQ-PCR Standards

Zur Evaluierung der retroviralen Vektor-Titer wurde die Methode der real-time quantitativen PCR (RTQ-PCR) etabliert. Die virale RNA wurde aus dem Kulturüberstand der Virus-produzierenden Zellen aufgereinigt, revers transkribiert und die erhaltene cDNA schließlich quantifiziert.

Das für die Quantifizierungs-Experimente benutzte Primerpaar erkannte einen Teilbereich des viralen Verpackungssignals Ψ in der *gag*-Region des MoMLV-Genoms. Das Amplikon umfasste eine Länge von 79 bp. Im Gegensatz zur konventionellen PCR sind aufgrund der Kinetik dieser Reaktion kürzere Amplifikate favorisiert.

4.7.3 Optimierung der RNA-Isolierung

Retrovirale Vektor-Titer können direkt über die Quantifizierung viraler RNA-Sequenzen in Vektorüberständen bestimmt werden. Bei dieser Art der Quantifizierung ist die „Plasmidverschleppung“ in diesen Überständen ein Problem, das auf die transiente Transfektion der Virus-Produzentenzellen mit den für die Virusproduktion benötigten Plasmiden zurückzuführen ist. Die im Rahmen der RTQ-PCR zu amplifizierende Sequenz kommt sowohl in der aus viraler RNA durch reverse Transkription erzeugten cDNA als auch im retroviralen Vektorplasmid vor. Aufgrund einer dadurch bedingten drastischen Signalüberlagerung würde eine aussagekräftige Titerung unmöglich.

Zur Elimination von „DNA-Kontaminationen“ aus dem Zellkultur-Überstand wurde deshalb vor der reversen Transkription der isolierten viralen RNA ein DNase-Verdau durchgeführt. Um die Effizienz des DNase-Verdau zu überprüfen, wurden DNase-verdaute bzw. unverdaute Vektorüberstände direkt, ohne Durchführung einer reversen Transkription, hinsichtlich der Sequenz des viralen Verpackungssignals Ψ quantitativ untersucht (Abbildung 4-33). Die Ergebnisse demonstrieren einerseits, dass im nicht DNase-verdauten Überstand der Plasmid-Hintergrund die Zahl der vorhandenen viralen cDNA-Sequenzen um ein Vielfaches übersteigt. Andererseits konnte die Plasmidkontamination durch den DNase-Verdau fast vollständig eliminiert werden.

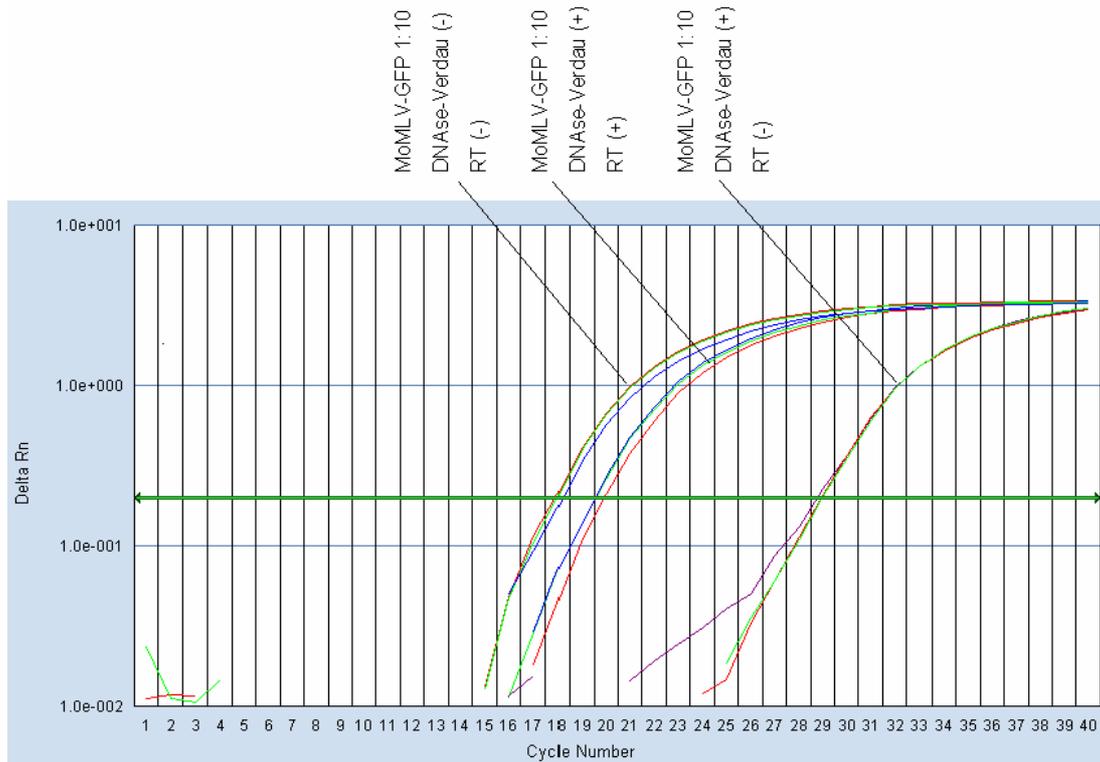


Abbildung 4-33: Notwendigkeit des DNase-Verdaus im Rahmen der Titerbestimmung viraler Vektoren durch RTQ-PCR

In nicht DNase-verdaulichem Überstand überstieg der Plasmid-Hintergrund ($3,15 \pm 0,30 \cdot 10^9$ Moleküle/ml unverdünntem Überstand) die Zahl der vorhandenen viralen cDNA-Sequenzen ($1,12 \pm 0,10 \cdot 10^9$ Moleküle/ml) um ein Vielfaches (linke und mittlere Amplifikationskurve). Die Plasmidkontamination konnte jedoch durch den DNase-Verdau fast vollständig eliminiert werden ($1,50 \pm 0,15 \cdot 10^6$ Moleküle/ml, rechte Amplifikationskurve). Die Abkürzung MoMLV-GFP 1:10 bedeutet, dass 1:10 verdünnter Vektorüberstand analysiert wurde; RT = reverse Transkription.

Nach DNase-Verdau können die viralen Titer durch Subtraktion der in Ansätzen ohne Reverse Transkriptase ermittelten noch verbliebenen Plasmid-Kopiezahlen von den in Ansätzen mit Reverser Transkriptase ermittelten Gesamt-Kopiezahlen bestimmt werden. Der Plasmid-Hintergrund war allerdings nach der DNase-Behandlung vernachlässigbar gering.

4.7.4 Titerbestimmung von RCR-Vektoren

Die RTQ-PCR erwies sich über einen Bereich von 10^2 - 10^6 Molekülen/Reaktion als quantitativ korrekt. Um eine Quantifizierung der viralen Gesamtpartikel im Überstand Virus-produzierender Zellen aufgrund des begrenzten quantitativen Bereichs der PCR zu garantieren, wurden neben unverdünntem auch 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnter Überstand zur Feststellung der Zahl an

viralen Genomen eingesetzt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt (Abbildung 4-34).

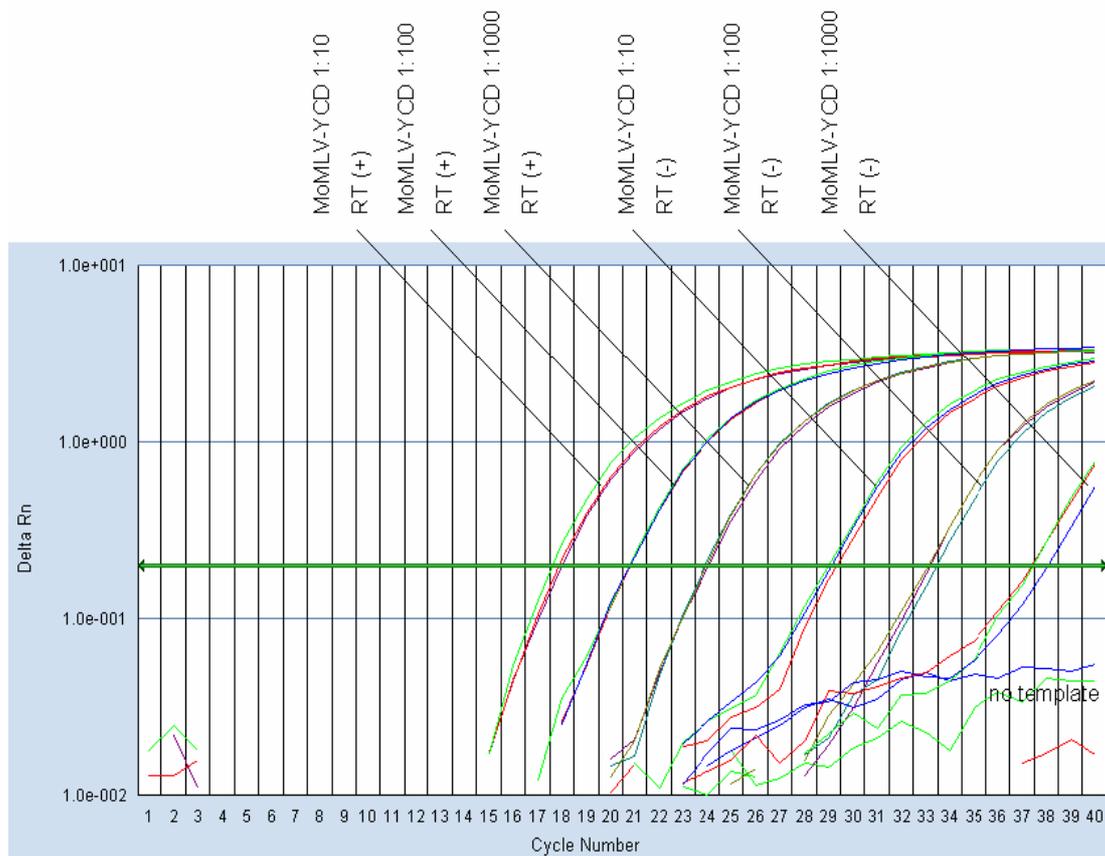


Abbildung 4-34: Titerbestimmung retroviraler Vektoren im Überstand Virus-produzierender 293T Zellen

Gezeigt sind stellvertretend die Amplifikationsplots zur Titerung von 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünntem Kulturüberstand des Vektors MoMLV-YCD. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zur Abschätzung von Plasmidkontaminationen wurden Proben mit bzw. ohne reverse Transkription quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte dadurch, dass aufgrund der nun bekannten C_1 -Werte der Proben die Variable „DNA-Menge“ anhand der Standardkurve berechnet werden konnte. *No template*, hier: Überstand nicht transfizierter 293T-Virus-Produzentenzellen.

Es zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen der Verdünnung des Vektorüberstandes und der Menge an detektierten viralen Partikeln (Abbildung 4-35). Der Titer des unverdünnten Überstandes wurde aus den Werten der 1:100 und 1:1000 Verdünnung hochgerechnet und der Mittelwert gebildet (Tabelle 4-5).

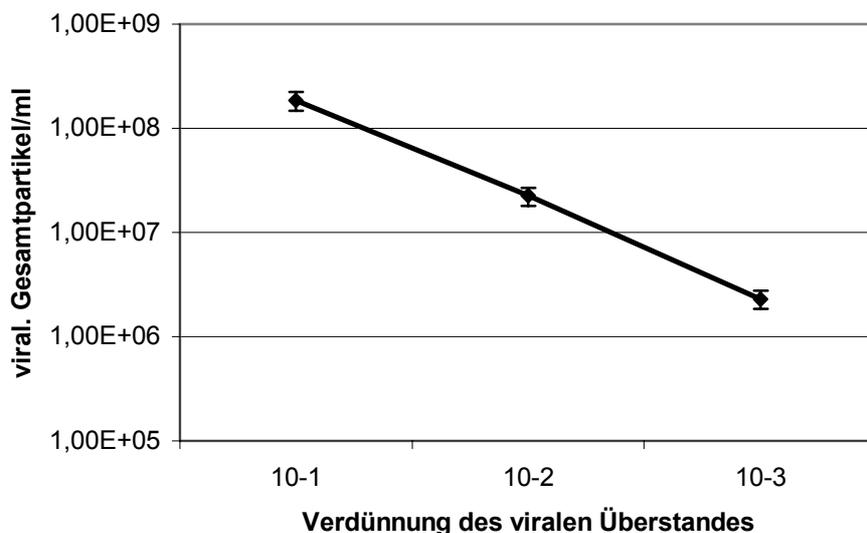


Abbildung 4-35: Lineare Beziehung zwischen viralen Gesamtpartikeln in verdünnten Überstand und der Verdünnung des Überstandes

Die Zahl an RNA-Molekülen bzw. viralen Partikeln im Überstand Virus-produzierender 293T-Zellen wurde durch RTQ-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Amplifikation einer Region im Verpackungssignal Ψ des MoMLV-Virus und einer Plasmid-Standardkurve. Die Daten stammen aus Dreifachbestimmungen.

Verdünnung	Gesamtkopienzahl/ml	Plasmid-Kopienzahl/ml (Verschleppung)	Virale Genome/ml (korrigiert um Plasmid- kontamination)	Virale Gesamtpartikel/ml
1:10	$3,70 \pm 0,64 \cdot 10^8$	$1,25 \pm 0,13 \cdot 10^5$	$3,70 \pm 0,64 \cdot 10^8$	$1,85 \pm 0,32 \cdot 10^8$
1:100	$4,50 \pm 0,13 \cdot 10^7$	$7,00 \pm 0,80 \cdot 10^3$	$4,50 \pm 0,13 \cdot 10^7$	$2,25 \pm 0,07 \cdot 10^7$
1:1000	$4,59 \pm 0,15 \cdot 10^6$	$3,00 \pm 0,85 \cdot 10^2$	$4,59 \pm 0,15 \cdot 10^6$	$2,30 \pm 0,08 \cdot 10^6$
Virale Gesamtpartikel in unverdünntem Überstand				$2,27 \pm 0,08 \cdot 10^9$

Tabelle 4-5: Berechnung retroviraler Titer im Überstand Virus-produzierender Zellen

Angegeben sind die Kopienzahlen/ml des entsprechend verdünnten Überstandes des RCR-Vektors MoMLV-YCD, dessen Titerung hier stellvertretend vorgestellt ist. Der virale Titer des unverdünnten Überstandes (untere Zeile der Tabelle) wurde aus den Werten der 1:100 und 1:1000 Verdünnung (Daten jeweils aus Dreifachbestimmungen) hochgerechnet und der Mittelwert gebildet. Die für die 1:10 Verdünnung erhaltenen Werte wurden nicht berücksichtigt, da sie außerhalb des linearen Bereichs der RTQ-PCR lagen. Die Plasmidkontamination konnte vernachlässigt werden. Die Zahl der viralen Gesamtpartikel errechnete sich durch Division der Zahl der Genome durch zwei, da MoMLV-Viren zwei identische Genomkopien tragen.

Die getiterten viralen Überstände konnten schließlich gezielt für Infektionen von Zielzellen auf der Grundlage analoger *moi*-Werte eingesetzt werden.

4.7.5 Analyse funktioneller viraler Titer durch Immun-Peroxidase-Assay

Die durch RTQ-PCR auf genomischer Ebene ermittelten viralen Titer wurden mit den auf Proteinebene bestimmten Titern verglichen. Dazu wurde nach Inokulation von NIH 3T3-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der zu quantifizierenden retroviralen Überstände die Vektorexpression ermittelt. Der Nachweis der mit RCR-Vektoren infizierten Zellen erfolgte über den anti-MoMLV-p30-Immun-Peroxidase Assay (IPA). Das Prinzip dieses Assays besteht im Nachweis des Nukleokapsidproteins p30 von MoMLV, das in einer infizierten Zelle in großen Mengen im Zytoplasma vorliegt. Bei der Titerung durch RTQ-PCR wurden Titer in der Größenordnung von $1,0 \pm 0,06 \cdot 10^9$ bis $2,5 \pm 0,08 \cdot 10^9$ Viren/ml Vektorüberstand gemessen. Die im IPA-Assay ermittelten Titer fielen um drei log-Stufen niedriger aus. Trotz der weitaus größeren Genauigkeit im Vergleich zu Methoden wie dem IPA-Assay, die auf einem Protein-Expressionsnachweis beruhen, haben Titerungsmethoden auf PCR-Basis den Nachteil, defekte virale Partikel bzw. sonstige die Infektion von Rezipientenzellen betreffende Inhibitoren nicht auszuschließen. Die durch RTQ-PCR ermittelten Titer korrelierten mit den biologischen Titern des IPA-Assays, sodass der Beitrag defekter Partikel und Inhibitoren bei allen in dieser Studie getesteten Vektoren vergleichbar ist.

4.7.6 “Killing Potential” von RCR-YCD und -SuperCD

Von besonderer Bedeutung für die angestrebte Leberkrebs-Gentherapie ist die Möglichkeit, dass in RCR-Vektoren zusätzlich Suizidgene eingebaut werden können. Dies würde eine effiziente Tumorlyse ermöglichen, die nach erfolgtem Suizidgen-Transfer und anschließender systemischer Applikation einer sog. „*prodrug*“ ausgelöst werden könnte. Die zusätzliche Kodierung von Suizidgenen im RCR-Vektorgenom stellt gleichzeitig einen besonderen Sicherheitsmechanismus dar, da im Rahmen der „*prodrug*“-getriggerten Tumorlyse gleichzeitig auch alle RCR-Produzentenzellen eliminiert werden.

Hierfür wurden RCR-Vektoren, die für die Suizidgene YCD, SuperCD bzw. für das Markergen GFP kodieren, *in vitro* auf ihre Funktionalität auf humanen Hepatomzelllinien (HepG2, Hep3B) getestet.

Als Ergebnis der Transfektion der proviralen DNA in die 293T-Produzentenzellen entstanden infektiöse replikationskompetente Viruspartikel, deren Genom die komplette Information des Wildtyp MoMLV Virus (*gag*, *pol*, *env*) und zusätzlich die Information für das jeweilige Transgen (GFP, YCD, SuperCD) trug.

Zum Nachweis der Funktionalität der Suizidgenaktivität des RCR-YCD- bzw. RCR-SuperCD-Vektors erfolgte eine Inokulation humaner Hepatomzellen (HepG2) mit den entsprechenden viralen Überständen. Für die Infektion wurde wiederum eine *moi* von 5×10^4 (auf Basis der durch RTQ-PCR ermittelten Titer) gewählt.

Zwei Tage vor der Infektion wurden auf 24-*well*-Platten $2,5 \times 10^4$ Rezipientenzellen pro *well* ausgesät (der genannte *moi*-Wert bezog sich hierbei auf diese initial ausgesäte Zellzahl). Die durch Transfektion von 293T-Virusproduzentenzellen generierten und getiterten Vektorlösungen wurden entsprechend verdünnt und für die Transduktion eingesetzt.

48 h nach der Transduktion erfolgte die Zugabe der CD-spezifischen „*prodrug*“ 5-Fluorcytosin (5-FC) in unterschiedlichen Konzentrationen. Zwei Tage später erfolgte eine Erneuerung der 5-FC-Lösungen. Mittels SRB-Vitalitätsassays (siehe auch 3.4.5) wurde die Suizidgen-vermittelte Abtötung der RCR-infizierten Zellen fünf Tage nach Beginn der 5-FC-Applikation quantifiziert (Abbildung 4-36). Als Negativkontrolle dienten mit dem RCR-GFP-Vektor transduzierte Zellen.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine äußerst effektive „*prodrug*“-Metabolisierung sowohl durch RCR-YCD- als auch durch RCR-SuperCD-Vektoren vermittelt wurde. Weiterhin zeigte sich bei diesem *in vitro* Versuch, dass das virale RCR-SuperCD-Konstrukt bei niedrigen 5-FC-Konzentrationen ($< 1,0$ mM) eine gering gesteigerte Suizidgenaktivität im Vergleich zu dem RCR-YCD-Vektor auf die humanen Hepatomzellen HepG2 hat (Abbildung 4-37 A).

Als Negativkontrolle wurden BHK-Zellen mit den entsprechenden viralen Überständen behandelt. Da bei dieser Zelllinie bekanntermaßen keine Suszeptibilität gegenüber MoMLV gegeben ist und daher keine Transduktion mit MoMLV stattfinden kann, konnte den Zellen durch die jeweiligen RCR-Vektoren MoMLV-YCD bzw. MoMLV-SuperCD erwartungsgemäß keine Suizidgenaktivität verliehen werden (Abbildung 4-37 B).

Durch den in dieser Versuchsreihe gewählten hohen 5-FC-Konzentrationsbereich (bis 10 mM) konnte eine primär zelleigene 5-FC-Toxizität beobachtet werden (Abbildung 4-37: s. MoMLV-GFP-Kurven).

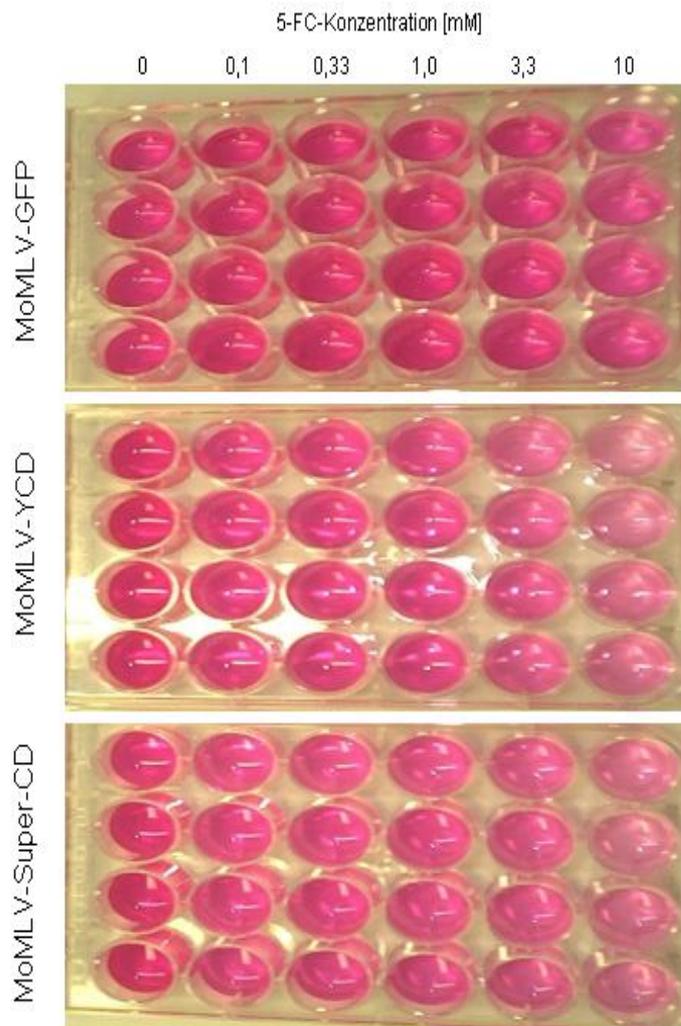
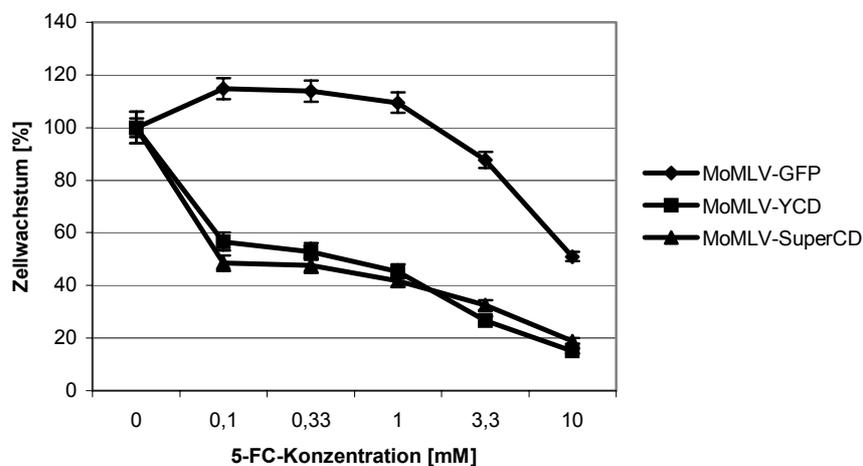


Abbildung 4-36: Quantifizierung der Suizidgen-vermittelten Abtötung RCR-infizierter HepG2-Hepatomzellen fünf Tage nach Beginn der 5-FC-Applikation mittels SRB-Vitalitätsassays

Überlebende Zellen wurden fixiert und mit SRB-Lösung gefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde durch Waschen entfernt und proteingebundener Farbstoff mit 10 mM Tris-Base extrahiert. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz an gefärbten Zellen, die die 5-FC-Applikation überlebt haben, und der vermessenen optischen Dichte nach Freisetzung bzw. Extraktion des SRB-Farbstoffs aus den Zellen. Bei Transduktion mit MoMLV-YCD bzw. MoMLV-SuperCD war der mit steigender 5-FC-Konzentration zunehmende cytopathische Effekt an der Abnahme der optischen Dichte und damit der Zahl überlebender Zellen zu erkennen. MoMLV-GFP-transduzierte Zellen hingegen starben nicht, was an der gleichmäßigen starken optischen Dichte zu ersehen ist. Pro 5-FC-Konzentration wurden jeweils Vierfachbestimmungen ausgeführt.

A)



B)

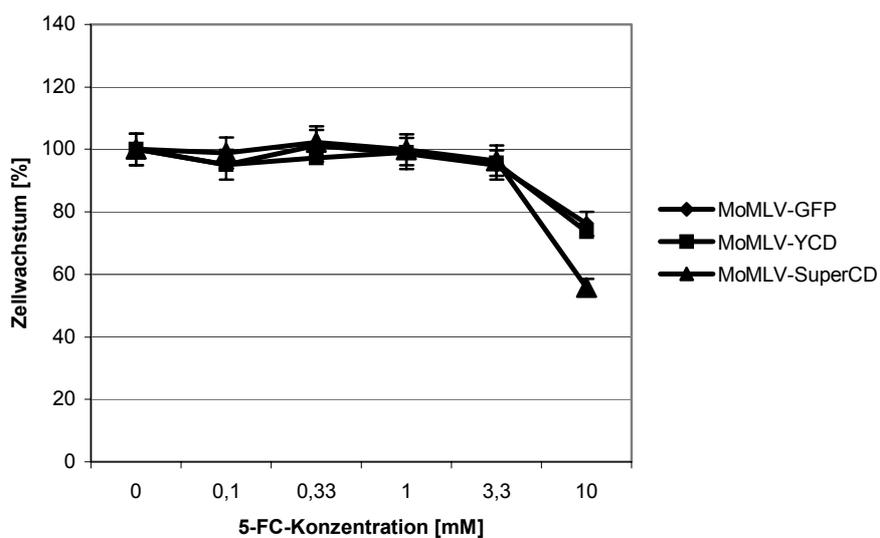


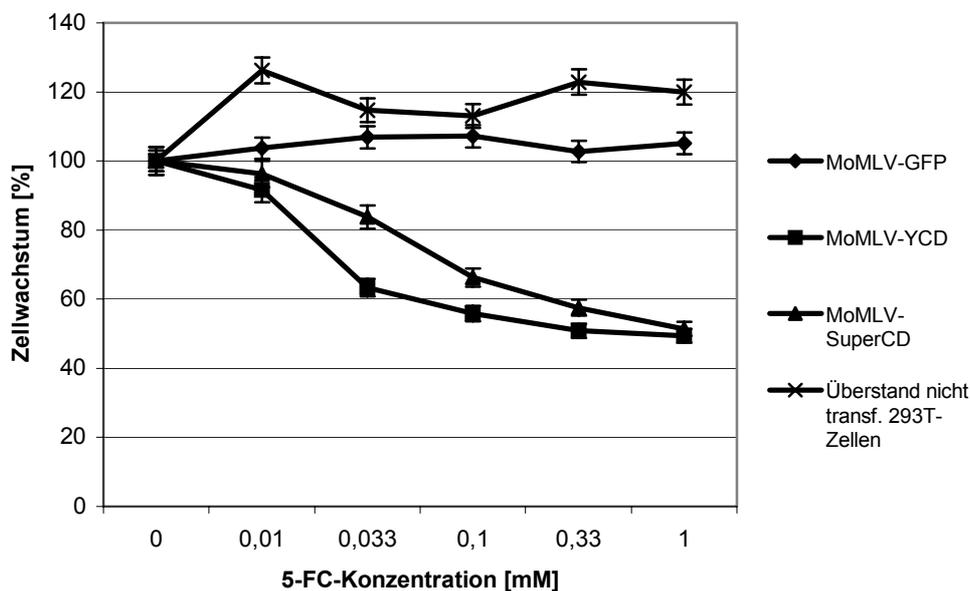
Abbildung 4-37: In vitro Sensitivität MoMLV-transduzierter Zellen gegenüber der „prodrug“ 5-FC
 HepG2-Hepatomzellen (A) bzw. BHK-Zellen (B), transduziert mit den angezeigten Vektoren bei einer moi von 5×10^4 , wurden verschiedenen 5-FC-Konzentrationen ausgesetzt und die Rate an überlebenden Zellen fünf Tage nach der ersten 5-FC-Applikation vermessen (wie unter 3.4.5 beschrieben). Die Ergebnisse sind ausgedrückt als der Prozentsatz an Zellwachstum bzw. überlebenden Zellen in An- bzw. Abwesenheit der „prodrug“ 5-FC. Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus vier (HepG2) bzw. zwei (BHK) unabhängigen individuellen Bestimmungen.

Da es sich bei den in dieser Studie verwendeten viralen Vektoren um replikationskompetente Retroviren handelt, kann auch auf den Rezipientenzellen (HepG2) Virussynthese stattfinden, die die Infektionsrate und damit das Absterbeverhalten evtl. zu beeinflussen vermag. Deshalb musste dieser Aspekt im Folgenden näher untersucht werden, um eine Aussage treffen zu können, ob das Fusionsprotein SuperCD im Vergleich zum YCD-Ausgangspolprotein als das wirksamere betrachtet werden kann, d.h. die Geschwindigkeit der Umsetzung der „*prodrug*“ 5-FC in die eigentlich toxischen Komponenten 5-Fluordesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) bzw. 5-FUTP erhöht ist.

Aufgrund der im Vergleich zu YCD zusätzlich gegebenen Uracilphosphoribosyltransferaseaktivität wurde erwartet, dass das Fusionsenzym für die in zwei Stufen vonstatten gehende Umsetzung von 5-FC zum Zwischenprodukt 5-Fluoruridinmonophosphat eine gesteigerte Durchsatzrate ermöglicht. Ein „Performance“-Plus des SuperCD/5-FC „*prodrug*“ Aktivierungssystems gegenüber einem YCD/5-FC „*prodrug*“ Aktivierungssystem sollte sich unter den gewählten *in vitro*-Bedingungen aus enzymkinetischen Gründen vor allem im unteren 5-FC-Konzentrationsbereich von 0 mM bis 1,0 mM (im Nichtsättigungsbereich der zelleigenen Orotatphosphoribosyltransferase, die ebenfalls wie YUPRT die Reaktion von 5-FU zum 5-FUMP katalysiert) offenbaren. Ziel der folgenden Versuchsreihe war deshalb die Durchführung eines Cytotoxizitätsassays bei niedrigeren 5-FC-Konzentrationen als in der ersten Versuchsreihe (nun im Bereich zwischen 0 mM und 1,0 mM). Das Experiment wurde an zwei verschiedenen Hepatomzelllinien (HepG2/Hep3B) durchgeführt. Als Transduktionsnegativkontrolle dienten wie im vorherigen Versuch durch MoMLV nicht transduzierbare BHK-Zellen. Bei Hepatomzellen, die mit MoMLV-GFP transduziert bzw. mit Überstand nicht transfizierter 293-T-Virus-Produzentenzellen behandelt wurden, zeigte sich keine Einschränkung des Zellwachstums (Abbildung 4-38). Dagegen offenbarte sich sowohl bei MoMLV-YCD- als auch bei MoMLV-SuperCD-transduzierten Zellen ein deutlicher Suizidgen-bedingter cytopathischer Effekt (Abbildung 4-38).

Die Ergebnisse demonstrieren jedoch, dass die Erwartungen bezüglich einer „enzymkinetischen“ Überlegenheit von SuperCD gegenüber YCD hinsichtlich der Toxifizierung der „*prodrug*“ 5-FC im Kontext eines replikationskompetenten Vektorhintergrundes (s.o.) nicht verifiziert werden konnten. Im Falle der Transduktion mit MoMLV-SuperCD waren bei dieser Versuchsreihe sogar niedrigere Absterberaten als bei der Inokulation mit MoMLV-YCD zu verzeichnen (Abbildung 4-38 und Abbildung 4-39). Anzumerken ist, dass bei dem in dieser zweiten Versuchsreihe gewählten unteren 5-FC-Konzentrationsbereich (0 mM bis 1,0 mM), der im Nichtsättigungsbereich der zell-eigenen Cytosindesaminase liegt, die ebenfalls wie YCD die Reaktion von 5-FC zu 5-FU katalysiert, im Gegensatz zu dem in der ersten Versuchsreihe gewählten hohen 5-FC-Konzentrationsbereich (bis 10 mM) keine primär zelleigene 5-FC-Toxizität zu beobachten war (Abbildung 4-38 und Abbildung 4-39 versus Abbildung 4-37: MoMLV-GFP-Kurven).

A)



B)

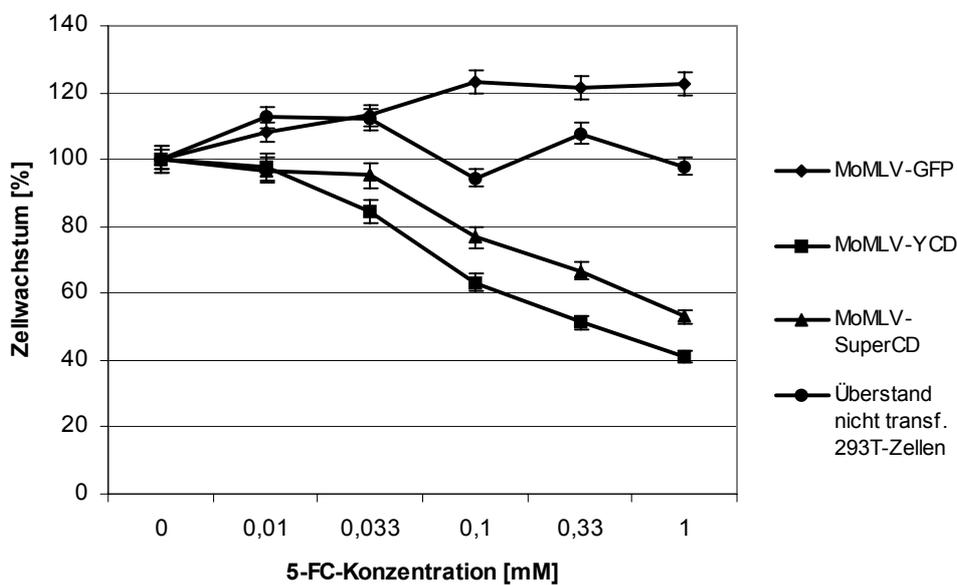


Abbildung 4-38: In vitro Sensitivität MoMLV-transduzierter Zellen gegenüber der „prodrug“ 5-FC
HepG2- (A) bzw. Hep3B-Hepatomzellen (B), transduziert mit den angezeigten Vektoren bei einer *moi* von $2,5 \times 10^4$ (bzw. als Kontrolle mit Überstand nicht transfizierter 293T-Zellen), wurden verschiedenen 5-FC-Konzentrationen ausgesetzt und die Rate an überlebenden Zellen 5 Tage nach der ersten 5-FC-Applikation vermessen, wie unter 3.4.5 beschrieben. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als der Prozentsatz an Zellwachstum bzw. überlebenden Zellen in An- bzw. Abwesenheit der „prodrug“ 5-FC. Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen individuellen Bestimmungen.

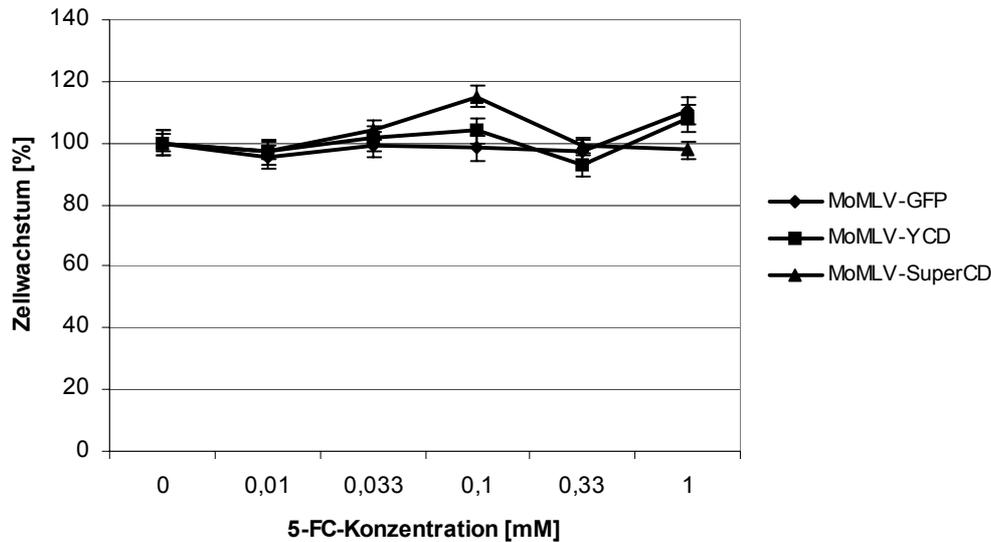


Abbildung 4-39: *In vitro* Sensitivität MoMLV-behandelter BHK-Zellen gegenüber 5-FC

Die Behandlung mit den angezeigten Vektoren wurde bei einer *moi* von $2,5 \times 10^4$ durchgeführt. Es folgte eine systemische 5-FC-Applikation in verschiedenen Konzentrationen. Die Rate an überlebenden Zellen wurde 5 Tage nach Beginn der 5-FC-Anwendung vermessen, wie unter 3.4.5 beschrieben. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als der Prozentsatz an Zellwachstum bzw. überlebenden Zellen in An- bzw. Abwesenheit der „*prodrug*“ 5-FC. Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen individuellen Bestimmungen.

4.7.7 Untersuchung der Replikationskinetik

Aufgrund der Replikationskompetenz der viralen Vektoren fungieren auch die Rezipientenzellen (HepG2) als Virus-Produzentenzellen. Zur Untersuchung der Replikationskinetik wurde Kulturüberstand von Zellen, die mit den entsprechenden Viren infiziert wurden, zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 48 h, 96 h und 168 h nach Infektion) geerntet und per RTQ-PCR die Titer an viralen Gesamtpartikeln ermittelt. Im Ergebnis blieben die von Rezipientenzellen stammenden Titer um zwei bis vier log-Stufen hinter den durch 293T-Virus-Produzentenzellen erzeugten zurück (Abbildung 4-40).

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass MoMLV-YCD deutlich besser als MoMLV-SuperCD in HepG2-Zellen repliziert (Abbildung 4-40).

Somit könnte man eine größere Absterberate im Falle einer Transduktion mit MoMLV-SuperCD eindeutig auf eine höhere Effizienz des Fusionsproteins im Vergleich zu YCD zurückführen und nicht durch Unterschiede bezüglich Replikationskinetik und damit Diskrepanzen hinsichtlich der Durchinfektion der Zellen.

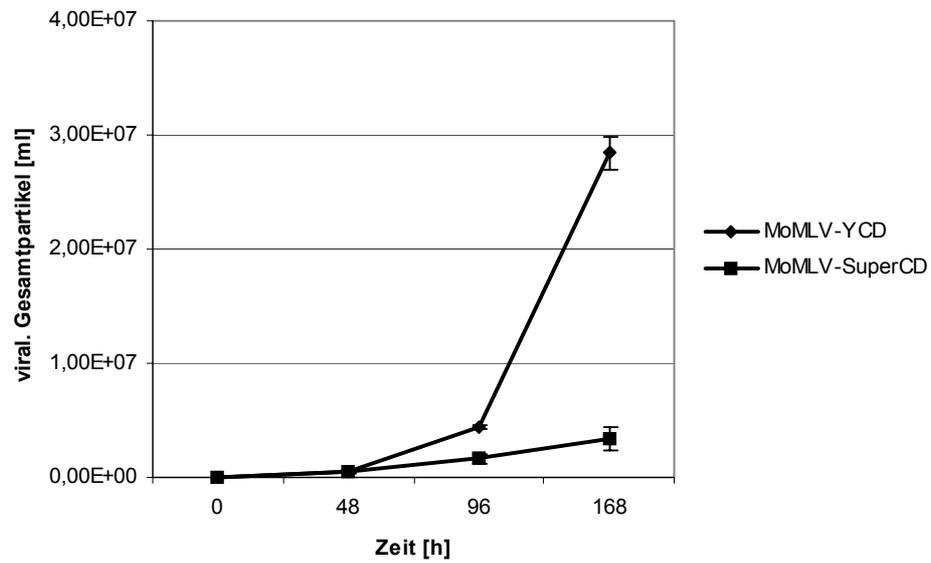


Abbildung 4-40: Untersuchung der Synthese viraler Vektoren durch Rezipientenzellen (HepG2)

Der Kulturüberstand von Zellen, die mit den entsprechenden Viren ($moi = 5 \times 10^4$) transduziert wurden, wurde zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und per RTQ-PCR die Titer an viralen Gesamtpartikeln ermittelt. Die Daten resultieren aus Doppelbestimmungen.

5 Diskussion

Die Leber weist eine Vielzahl monogenetischer Erbkrankheiten auf, bei denen mit konventionellen pharmakologischen Behandlungsmethoden zum Teil nur unbefriedigende therapeutische Ergebnisse erzielt werden. Für diese, schon in den Erbanlagen determinierten Erkrankungen wäre eine kausale, d.h. gentherapeutische Behandlung ideal. Voraussetzung hierfür ist die Entwicklung hepatotroper Vektorsysteme, die nach *in vivo* Applikation Zielzell-spezifisch die stabile Expression der eingebrachten therapeutischen Gensequenzen ermöglichen. Retrovirale Vektoren sind in besonderer Weise für die Gentherapie monogenetischer Erkrankungen geeignet, da sich retroviral kodierte therapeutische Gensequenzen stabil in das Genom der proliferierenden Zielzellen integrieren. Bei *in vivo* Experimenten wurden bereits mehrfach amphotrope retrovirale Vektoren in die Leber appliziert. Dabei wurde jedoch in der Regel selbst nach Stimulation der hepatozellulären Replikation über Leberteilektomie^{49,79,145} bzw. Lebertoxin-Applikation⁹⁶ nur eine Transduktionseffizienz von weniger als 5% erreicht. Des Weiteren kam es bei der Applikation der herkömmlichen amphotropen MoMLV Vektoren, die ein sehr breites Wirtsspektrum besitzen, zu einem „Vektorabstrom“ in andere Gewebe^{21,27,49}. Um die mangelnde Transduktions-Effizienz retroviraler Vektoren^{115,164} bei der Adressierung von ausdifferenzierten zellteilungs-inaktiven Geweben zu verbessern, wurde ein nicht-humanpathogenes, rekombinantes und replikations-defizientes lentivirales Vektorsystem auf Basis des Felinen Immundefizienz Virus (FIV) etabliert. Das Ziel hierbei war, das Potential von FIV-Vektoren, die in der Lage sind effizient zellteilungs-inaktives Gewebe zu transduzieren und das therapeutische Transgen stabil in das Wirtsgenom zu integrieren³², mit dem schon an Sendai Virus gezeigten SeV-F vermittelten Hepatotropismus^{15,94} zu verbinden, um so die Spezifität und Wirksamkeit einer zukünftigen Lebergentherapie für monogenetische Erbkrankheiten zu verbessern. Zusätzlich könnten bekannte Risiken umgangen werden, die zum Beispiel die Anwendung von rekombinanten Adenoviren bei einer Korrektur von monogenetisch bedingten Leberschäden mit sich bringen.

5.1 Herstellung von rekombinanten FIV-Vektoren der 1. Generation

Für den Erfolg viraler Vektoren beim Einsatz in der Gentherapie ist in erster Linie deren Virustiter maßgeblich. Je höher der Titer ist, desto effizienter kann in der Regel der Gentransfer in die Zielzellen bzw. das Zielgewebe stattfinden. So können durch transiente Transfektion der Virusproduzentenzellen mit rekombinanten lentiviralen Vektoren Titer bis zu 10^6 und mehr infektiöse Partikeln pro ml im Produzentenzellüberstand generiert werden^{34,74}. Bei der Verwendung von stabilen Verpackungszelllinien lagen die erzeugten viralen Titer bislang im allgemeinen deutlich

niedriger, obwohl inzwischen auch hier Fortschritte zu verzeichnen sind. Der virale Produzentenzellüberstand kann dann gegebenenfalls durch physikalische Methoden wie Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration bis zu einer Höhe von ca. 10^9 infektiösen Partikeln pro ml angereichert werden. Aus diesem Grund wurde bei der Etablierung des FIV-Vektorsystems auf die Transfektion der 293T Virusproduzentenzellen gesetzt. Diese humane embryonale Nierenzelllinie wird im allgemeinen aufgrund der höheren Virusproduktionsrate im Vergleich zu anderen Verpackungszelllinien bevorzugt¹⁴⁹. Des Weiteren hat die Verwendung dieser Zelllinie den Vorteil, dass bei einer zukünftigen Gentherapie am Menschen die daraus gewonnenen viralen Vektoren vom humanen Komplementsystem nicht inaktiviert werden, sofern diese kein VSV-G Hüllglykoprotein, sondern ein amphotropes Hüllglykoprotein¹⁴⁹, in ihrer Hülle tragen. Dieser Vorteil besteht vermutlich auch für weitere heterologe Hüllglykoproteine, die im Gegensatz zu dem weit verbreiteten VSV-G Hüllglykoprotein, gegen das in der Regel bereits Antikörper gebildet wurden⁴⁰, vom humanen Komplementsystem nicht erkannt und inaktiviert werden.

Anfänglich konnten mit den Ausgangsplasmiden, die nach CaPO_4 -Transfektion die notwendige Information zur Bildung rekombinanter FIV-Vektoren *in trans* zu Verfügung stellten, nur geringe Titer von $0,8 \times 10^4$ infektiösen Partikeln pro ml Produzentenzellüberstand erzeugt werden. Der Virustiter verbesserte sich zunächst auch nicht, wenn der virushaltige Überstand über einen längeren Zeitraum (80 h) auf den Produzentenzellen gesammelt wurde. Anzunehmen ist, dass sich hier im Überstand ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Zerfall der viralen Vektoren einstellt und daher der Titer sich durch eine längere Sammelzeit nicht maßgeblich erhöhen lässt. Die Zugabe von Natriumbutyrat (NaB) zum Zellkulturmedium steigerte die Virusproduktion in den 293T Zellen allerdings deutlich (siehe Abbildung 4-2), und ermöglichte die Generierung von FIV-Vektoren mit einem reproduzierbaren Titer von ca. 2×10^6 infektiösen Partikeln pro ml Überstand. Dabei stellte sich eine Konzentration von 10 mM NaB als ideal heraus, bei der die Virusproduzentenzellen am wenigsten gestresst wurden.

Der Einfluss von NaB ist auf eine Erhöhung der Genexpression zurückzuführen, die zum einen der „Enhancer“-abhängigen Steigerung der Transkription exogener DNA zuzuschreiben ist⁵⁸, zum anderen aber auch durch die Aktivierung einer Vielzahl von eukaryontischen Promotoren, einschließlich des CMV Promotors^{142,173} und der LTRs von Retro-¹³⁰ und Lentiviren^{19,141}. Das lässt auch auf den Einfluss von NaB auf das FIV-Vektorsystem schließen, besonders da die Expression des proviralen Transfervektors nach Transfektion in die 293T Virusproduzentenzellen von einem CMV-Hybrid-LTR getrieben wird, siehe Abbildung 4-1.

Weitere Modifizierungen des FIV-Transfervektors im Hinblick auf die folgende Pseudotypisierung mit dem heterologen SeV-F wurden vorgenommen. Diese dienen einer deutlich sensitiveren Detektion des Gentransfers mit den Reportergenen *lacZ*, *egfp* oder *dsred2*. *egfp* und *dsred2* ermöglichen zudem eine Beobachtung der Reportergenexpression in den Rezipientenzellen über

einen Zeitraum von mehreren Tagen. Da man mit diesen SeV-F Pseudotypen erwartungsgemäß geringe Titer erhält^{161,162} ist ein sensitiver Nachweis des Gentransfers erforderlich. So wurden singuläre Restriktionsschnittstellen stromaufwärts und stromabwärts von Start- bzw. Stopcodon des *lacZ*-Gens im CTRZLb Transfektor über eine ortsgerichtete Mutagenese eingeführt. Dadurch konnte das *lacZ*-Gen ausgeschnitten und stattdessen das *egfp*- bzw. *dsred2*-Gen *in sense* Richtung inkloniert werden. Mit der Herstellung des CTDSRed2 Transfektors bestand die Möglichkeit, die Transduktionseigenschaften der erzeugten rekombinanten FIV-Vektoren auch mit einem weiteren Reportergen, sicher zu belegen. Zudem kommt es bei dem Nachweis der EGFP-Expression nach der Transduktion der Rezipientenzellen M12 und MDCK zu einer Artefaktbildung, wodurch eine gesicherte Aussage über transduzierte, *egfp*-exprimierende Rezipientenzellen erschwert wird. Diese Artefaktbildung kommt durch einen gerichteten Stoffwechseltransport der M12- bzw. MDCK-Zellen zustande, sodass es im basalen Bereich eines bei Kultivierung ausgebildeten Monolayers zu lokalen Ablösungen vom Untergrund kommt, die durch Stoffwechselprodukte der besagten Zellen aufgefüllt werden. Diese Stoffwechselprodukte haben bei der Fluoreszenzmikroskopie die störende Eigenschaft auf derselben Wellenlänge des EGFPs Licht zu emittieren, womit eine eindeutige Identifizierung *egfp*-exprimierender Zellen erschwert wird. Sehr schön zu sehen ist dieser Sachverhalt in der Abbildung 4-5 bei *egfp*-exprimierenden MDCK-Zellen.

Eine weitere Modifizierung der Transfektoren CTLacZ und CTDSRed2 wurde vorgenommen, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Hierfür wurde (siehe 4.1.4.1) stromaufwärts des CMV-Promotors ein sogenannter *central polypurine tract* (cppt) unmittelbar gefolgt von einer *central termination site* (cts) eingefügt. Aufgrund der eingefügten cppt/cts Sequenz sollten die neu generierten FIV-Partikel - analog zu den bereits gezeigten Ereignissen bei HIV – eine bessere Transduktionsrate haben und die Fähigkeit besitzen, ihr Genom effizienter in den Zellkern der Rezipientenzelle einzuschleusen^{52,199}. Da die Orientierung der cppt/cts Sequenz im rekombinanten Vektor-Genom, wie beispielsweise für HIV-Vektoren gezeigt, für den Vorgang des Kernimportes von entscheidender Bedeutung ist, wurde die cppt/cts Sequenzabfolge, mit einer Länge von 105 bp, jeweils in etwa in die Mitte der beiden Transfektoren des rekombinanten FIV-Genoms kloniert und sollte daher weitestgehend optimal positioniert sein. Weitere Versuche müssen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob diese Vektoren ruhende Zellen effizient transduzieren können. Ihre prinzipielle Funktionalität konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden (4.1.4.2 und 4.4).

Neben den beschriebenen Modifizierungen der FIV-Transfektoren, die in erster Linie einer Steigerung der Detektionssensitivität des lentiviralen Gentransfers dienlich sein sollten, wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, den Virus-Titer zwecks effizienterem Gentransfer zu erhöhen. Da die Möglichkeiten einer größeren Virusproduktion der Verpackungszellen und damit

eine Erhöhung des Virustiters ($2,3 \times 10^6$ CFU/ml) auf „biologischem“ Wege weitestgehend ausgeschöpft waren, wurde auf physikalische Methoden zurückgegriffen, um den Virustiter zu erhöhen. Dies kann zum einen über eine Ultrazentrifugation, bei der die Viren bei hohen Zentrifugalkräfte pelletiert werden, oder zum anderen durch eine Ultrafiltration geschehen, bei der die viralen Partikel auf schonende Weise durch Abtrennen des überflüssigen Überstandes in einem Restvolumen eingengt werden (durch Zentrifugation mit niedrigen g-Zahlen) (4.1.5). Im Hinblick auf die Herstellung zukünftiger FIV-Vektoren, die neben dem VSV-G Hüllglykoprotein auch mit dem SeV-F Hüllglykoprotein, zwecks Hepatotropismus, pseudotypisiert werden sollten, würde die Ultrafiltration bevorzugt werden, weil sich bei zahlreichen vorherigen Ultrazentrifugationen von VSV-G Pseudotypen gezeigt hat, dass das nach der Zentrifugation erhaltene Viruspellet nicht vollständig in einem definiertem Volumen an Medium oder Puffer resuspendiert werden konnte und somit letztlich ein hoher Verlust an generierten VSV-G Pseudotypen aufgetreten ist. Dieses Phänomen tritt bei der Ultrafiltration nicht auf, da es hier nicht zu einer Viruspelletbildung kommt. Stattdessen wird hier durch den Einengungsprozess der in der Filtrationseinheit zurückbleibende Zellkulturüberstand aufkonzentriert, der neben den viralen Partikeln auch Serumproteine enthält, die nicht durch die Membran der Filtrationseinheit entweichen konnten. Der eingengte visköse Überstand lässt sich jedoch problemlos in einem definiertem Volumen von Medium oder Puffer aufnehmen und im Anschluß für Transduktionen einsetzen¹⁴⁴. Zudem kann die Viskosität des eingengten Überstandes auch gezielt gesteuert werden, und zwar insbesondere durch zwei Möglichkeiten: 1. durch die Zeit und Geschwindigkeit des Zentrifugationslaufes, und 2. durch den Zusatz von FCS zu dem Zellkulturmedium. Je weniger FCS (<10%) im Zellkulturmedium enthalten ist, desto leichter bzw. schneller läuft der Einengungsprozess der viralen Partikel ab.

5.2 Hepatozyten restringierter lentiviraler Gentransfer

Für einen Hepatozyten-spezifischen Gentransfer bot sich der ASGP-Rezeptor als Ziel an, da dieser ausschließlich auf Hepatozyten exprimiert wird und für den ASGP-Rezeptor eine spezifische Interaktion mit dem SeV-F Hüllglykoprotein bekannt ist^{7,15,94,105,162}. Diese Spezifität des SeV-F Hüllglykoproteins für den ASGP-R sollte in dieser Arbeit in Analogie zu unterschiedlichen und derzeit bekannten Modellen^{7,8,15,162} auf das lentivirale FI-Virus angewendet werden. Durch eine SeV-F Pseudotypisierung von FIV stände ein ASGP-R- und damit Hepatozyten-spezifisches lentivirales Vektorsystem zur Verfügung, das in der Lage wäre, ausdifferenzierte und teilungsinaktive Hepatozyten sowie Hepatomzellen effizient zu transduzieren und zudem seine therapeutische Information stabil in das Wirtsgenom zu integrieren.

Für einen Transduktionsnachweis der SeV-F pseudotypisierten FI-Viren bedurfte es entsprechender ASGP-R exprimierender Zelllinien, deren ASGP-R Expression zuvor mittels Westernblot verifiziert musste (siehe, Abbildung 4-10). Für die Transduktionsexperimente wurden Zelllinien ausgewählt, die die stärkste ASGP-R Expression im Westernblot aufwiesen, HepG2 und M12. Zusätzlich wurde mittels eines Immunfluoreszenznachweises durch eine Membranfärbung unter Verwendung derselben im Westernblot angewendeten Primärantikörper nachgewiesen, dass der ASGP-R bei diesen Zellen auf der Zelloberfläche präsentiert wird und damit für eine potenzielle Interaktion mit den in die FIV-Hülle eingebauten SeV-F Hüllglykoproteinen zur Verfügung steht, siehe Abbildung 4-11.

Im nächsten Schritt wurden die unter 4.2.3.1 bis 4.2.3.3 beschriebenen SeV-F Hüllglykoproteinvarianten dahingehend überprüft, ob sie nach der Transfektion in die für die Virusproduktion vorgesehenen 293T Verpackungszellen von diesen exprimiert, in die Zellmembran eingebaut und ebenfalls an die Zelloberfläche transportiert wurden. Dies geschah mittels einer anti-SeV-F Immunfluoreszenzmembranfärbung. Es konnte gezeigt werden, dass das native SeV-F (*Fushimi* Stamm), das konstitutive fusionsaktive SeV-F_{mut} und auch das trunkeierte SeV-F_{del} exprimiert und an die Zelloberfläche der transfizierten Zellen transportiert werden (siehe Abbildung 4-16) und somit potenziell für den Einbau in die Virushülle eines ausknospenden Virus zur Verfügung steht. Parallel wurde eine 293T Verpackungszelllinie etabliert, die das native SeV-F stabil exprimiert und ebenfalls an die Zelloberfläche transportiert (siehe Abbildung 4-16). Trotz der Präsentation der SeV-F Varianten auf der Zelloberfläche der 293T Verpackungszellen, unabhängig davon, ob die SeV-F Expression auf stabilen oder transienten Wege erzeugt wurde, konnten keine infektiösen FIV-SeV-F Pseudotypen generiert bzw. ein Transduktionsnachweis der Rezipientenzellen erbracht werden, siehe Tabelle 4-2 und Abbildung 4-17.

Von der Möglichkeit ausgehend, dass eine mangelnde Inkorporation der SeV-F Hüllglykoproteine in die FIV Hülle das Problem war, sollte dieses durch die Konstruktion der unter 4.3.1 beschriebenen chimären SeV-F Hüllglykoproteine gelöst werden, deren ausgetauschte Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen sowohl vom autologen FIV Hüllglykoprotein als auch vom heterologen VSV-G Hüllglykoprotein stammen, für die ein Einbau in die FIV Hülle bereits bekannt war¹⁴⁰. Eine Transfektion dieser chimären Hüllglykoproteine in die 293T Verpackungszelllinie zeigte, dass auch die chimären SeV-F Hüllglykoproteine exprimiert und an die Zelloberfläche transportiert wurden (siehe Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20) und somit ebenfalls für einen möglichen Einbau in die FIV Virushülle verfügbar sind. Eine Überprüfung inwieweit die verschiedenen Varianten der SeV-F und der chimärischen SeV-F Hüllglykoproteine tatsächlich in die FIV Virushülle eingebaut wurden, konnte für die FIV-SeV-F Pseudotypen durch eine Ultrazentrifugation der von den 293T Verpackungszellen produzierten Überstände sowie der anschließenden Lyse der Viruspellets und deren Analyse im Westernblot durchgeführt werden. Hier hatte sich gezeigt, dass

es nur bei der zweiten chimären SeV-F Variante, die sich aus der extrazellulären und der Transmembrandomäne des SeV-F und der zytoplasmatischen Domäne des VSV-G zusammensetzt, zu einem Einbau in die FIV Hülle kommt (siehe Abbildung 4-21). Ein Nachweis für den Einbau der übrigen chimären SeV-F Hüllglykoproteine konnte nicht erbracht werden, obwohl zumindest in Anbetracht des Einbaus der zweiten SeV-F Chimäre auch für deren SeV-F_{mut} Variante ein Einbau erwartet wurde, da deren strukturelle Unterschiede lediglich auf den Austausch von drei Aminosäuren innerhalb der Spaltstelle beruhen, wodurch diese konstitutiv durch zelleigene Proteasen gespalten wird. Demnach schienen auf der einen Seite die Modifizierungen der chimären SeV-F Proteine für deren Expressierung und Transport an die Zelloberfläche der 293T Verpackungszellen auszureichen, auf der anderen Seite sich aber dennoch nachteilig auf deren Einbau in die Virus-hülle von FIV auszuwirken. Dagegen konnte die Inkorporation des nativen SeV-F und deren SeV-F_{mut} Variante in die FIV Hülle gezeigt werden (siehe Abbildung 4-21). Ausgehend davon, dass sich in der zytoplasmatischen Domäne beider SeV-F Varianten keine Cystein-Reste befinden, die palmitoyliert werden können und dadurch ein Sortiersignal zugunsten des Einbaus in die „Lipid Rafts“ - dem Ort der Virusausknospung - bereitsteht, überrascht dieses Ergebnis umso mehr. Die SeV-F_{del} Variante dagegen konnte ebenfalls nicht in der FIV Hülle nachgewiesen werden, obwohl auch hier Gegenteiliges erwartet wurde. Mehrere Studien haben gezeigt^{65,72,103}, dass eine teilweise oder totale Trunkierung der zytoplasmatischen Domäne die Inkorporation von heterologen Hüllglykoproteinen sowohl bei HIV als auch MoMLV verbessern kann. Dieses Phänomen konnten Kowolik und Yee im Jahr 2002 sogar mit der auch in dieser Arbeit verwendeten zytoplasmatisch verkürzten Variante von SeV-F, dem SeV-F_{del} (zytoplasmatische Domäne bestehend aus zwei Aminosäuren), bestätigen, indem sie hergestellte infektiöse Überstände auf HepG2 Zellen titrierten und einen ca. 3-fach höheren Titer für die HIV-SeV-F_{del}-Pseudotypen ($6,3 \times 10^4$ transduzierenden Einheiten (TU)) im Vergleich zu den HIV-SeV-F-Pseudotypen) erhielten. Vermutet wurde eine sterische Hinderung ausgehend von der kompletten zytoplasmatischen Domäne des SeV-F bei Einbau in die Hülle von HIV⁸⁹. Kobayashi *et al.* konnte 2003 für SIV dasselbe Phänomen eines effizienteren Einbaus für SeV-F Hüllglykoproteine zeigen, deren zytoplasmatische Domäne auf 4 oder 14 Aminosäuren von tatsächlichen 47 verkürzt war⁸⁵. Aufgrund der Verwandtschaftsgrade von FIV zu HIV bzw. SIV, wurde in dieser Arbeit das SeV-F_{del} Hüllglykoprotein ebenfalls für die Pseudotypisierung von FIV verwendet. Hierbei konnte aber weder für FIV das von Kowolik und Yee sowie Kobayashi beobachtete Phänomen bestätigt noch konnten infektiöse SeV-F_{del}-Pseudotypen generiert werden (siehe Abbildung 4-21); dass komplette FIV Vektoren generiert und in den Medienüberstand der 293T Verpackungszellen abgegeben wurden, zeigt das durch die Ultrazentrifugationsmethode kopräzipitierte FIV p24-Nukleokapsidprotein, das in allen Virenpellets nachweisbar war.

Parallel zu den Versuchen, einen Einbaunachweis der SeV-F Varianten bzw. chimären SeV-F Varianten in die FIV Hülle zu erbringen, wurden SeV-F pseudotypisierte FIV-Vektorüberstände generiert und diese für die Transduktion der Rezipientenzellen eingesetzt. Hier wurde vorzugsweise mit dem CTDSRed2cppt Transfervektor gearbeitet, der die Beobachtung einer Reporterexpression über die gewöhnlichen 48 h hinaus ermöglichte, um somit auch eine mögliche schwache Expression des *dsred2*-Reportergens sichtbar machen zu können, die erst nach längerer Expressionszeit auftritt. Eine Transduktion der Rezipientenzellen mit diesen viralen Überständen konnte aber nicht nachgewiesen werden und ist unter anderem in der Tabelle 5-1 zusammenfassend dargestellt.

Die bisher generierten, nicht infektiösen FIV-SeV-F Pseudotypen sollten ihrer Bezeichnung entsprechend nur das SeV-F Hüllglykoprotein oder eines der beschriebenen Varianten in der Hülle tragen. Wurde nun zusätzlich für die Herstellung der FIV-SeV-F Pseudotypen bei der Transfektion der 293T Verpackungszellen ein Expressionsplasmid (pI.18-HN) eingesetzt, das für das SeV Hämagglutination Neuraminidase Hüllglykoprotein (HN) kodierte, konnten auf diese Weise FIV-Doppelpseudotypen generiert werden, die anstelle wie bisher, nicht nur das SeV-F, sondern auch das SeV-HN Hüllglykoprotein in seiner Hülle inkorporiert hatten, was durch einen einfachen HA-Test (4.4.1) nachgewiesen werden konnte (siehe auch Abbildung 4-25). Diese neuen FIV-SeV-F/HN Pseudotypen waren in der Lage, alle Rezipientenzellen des bisher verwendeten Zellpanels zu transduzieren und wiesen somit dieselben pantropen Eigenschaften des Sendai Virus auf. Dies konnte mit FIV Vektoren, die für zwei unterschiedliche Reportergene, *egfp* bzw. *dsred2*, kodierten, gezeigt werden (siehe Abbildung 4-24). Die Transduktionsrate der Rezipientenzellen mit den FIV-SeV-F/HN Pseudotyp-haltigen Überständen ist im Vergleich zu FIV-VSV-G Pseudotypen eher als gering einzuschätzen, was zwei Ursachen haben könnte: 1. die SeV-F Aktivierung mit acetyliertem Trypsin ist suboptimal, sodass nur ein geringer fusionsaktiver Prozentsatz an SeV-F für die Fusion von Virushülle mit Zellmembran zur Verfügung steht, und 2. der Einbau der Sendai-viralen Hüllglykoproteine in die FIV-Hülle, trotz eindeutiger Nachweismethoden 4.3.3 und 4.4.1, ist nach wie vor suboptimal. Zur Titeroptimierung bieten sich das etablierte Verfahren der Ultrafiltration bzw. der Austausch des SeV-F durch das SeV-F_{mut} an, bei dem eine Aktivierung des viralen Überstandes unmittelbar vor der Transduktion hinfällig wäre. Ein weiterer Anhaltspunkt, dass für die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran der Rezipientenzelle die alleinige Anwesenheit von SeV-F offensichtlich nicht ausreicht, zeigt eine Beobachtung, bei der ausschließlich MoMLV-Doppelpseudotypen, die neben dem SeV-F zusätzlich ein weiteres Hüllglykoprotein (z.B. das homologe ecotrope Hüllglykoprotein) in ihrer Hülle trugen, unterschiedliche Rezipientenzelllinien (Abbildung 4-26) transduzieren konnten; MoMLV-Einfachpseudotypen, die nur das SeV-F in ihrer Hülle inkorporiert hatten, dagegen nicht. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt könnte darin zu finden sein, dass generell bei den Paramyxoviren, zu denen

auch das Sendai Virus zählt, das Fusions-Protein auf ein weiteres homologes Hüllglykoprotein, das HN-Protein angewiesen ist, um eine Fusion der eigenen Virushülle mit der Zellmembran der zu infizierenden Zelle erst zu ermöglichen^{68,167,195}. Hierbei scheinen beide Hüllglykoproteine über sogenannte “*Heptad Repeats*”, die sich in deren extrazellulären Domäne befinden, zu interagieren^{37,38,111,168}. Tomasi *et al.* haben für die Sendai Virus Hüllglykoproteine ein Modell postuliert, nach dem die extrazelluläre Domäne des HN-Proteins mit der proximal zur Transmembrandomäne des SeV-F Proteins gelegenen HR-Region (HR = Heptad Repeat) interagiert. Bindet die extrazelluläre Domäne des HN-Proteins an seinen Rezeptor (ubiquitäre Sialinsäurereste auf der Membran der Rezipientenzelle), so wird dadurch eine Konformationsänderung des SeV-HN-Proteins induziert. Diese Konformationsänderung erlaubt nun eine Interaktion mit dem SeV-F Protein unabhängig von dessen HR-Region und bewirkt gleichzeitig eine Inhibition der Neuraminidase Aktivität des SeV-HN-Proteins. Dadurch, dass die proximal gelegene HR-Region von SeV-F nicht mehr gebunden ist, kann nun das SeV-F eine Konformationsänderung vollziehen und dadurch sein bisher im Inneren verborgenes Fusionspeptid, das für die Verschmelzung von Virushülle und Rezipientenzellmembran sorgt, präsentieren¹⁷⁶. Dieses Modell könnte somit erklären, warum eine Transduktion von Rezipientenzellen sowohl mit retro- als auch mit lentiviralen SeV-F Einfachpseudotypen ausbleibt, aber unter Hinzunahme von SeV-HN stattfindet. Denkbar wäre auch, dass die SeV-HN Funktion durch die Verwendung von heterologen Hüllglykoproteinen im Rahmen einer Doppelpseudotypisierung mit SeV-F übernommen wird. Beispielhaft hierfür wäre das für die Doppelpseudotypisierung eingesetzte ecotrope Hüllglykoprotein von MoMLV (Abbildung 4-26), das im Bereich der extrazellulären Domäne ebenfalls zwei HR-Regionen trägt und dadurch eine Bindung mit der proximal gelegenen HR-Region des SeV-F eingehen könnte, wodurch wiederum die Fusion von Virusmembran und Membran der Rezipientenzelle eingeleitet würde.

5.3 Zusammenfassung: Retro- und Lentivirale Pseudotypisierung mit dem SeV-F Hüllglykoprotein

Eine abschließende Zusammenstellung der wichtigsten in dieser Arbeit generierten lentiviralen und retroviralen Pseudotypen und deren Transduktionseigenschaften ist in der Tabelle 5-1 gezeigt. So konnte FIV jeweils mit dem Hüllglykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) und des Ross River Virus (RRV-G) pseudotypisiert werden. Diese Pseudotypen zeigten pantrope Transduktionseigenschaften dadurch, dass alle Zelllinien des Rezipientenzellpanels transduzierbar waren. Auch mit dem endogenen FIV Hüllglykoprotein ließen sich rekombinante FIV-Partikel herstellen, allerdings mit dem Unterschied, dass deren Transduktionspotential im Vergleich zu VSV- und RRV-G Pseudotypen deutlich eingeschränkt war und sich damit lediglich HepG2- und

CrFK-Zellen transduzieren lassen. Wie bereits unter 4.3.3 und 4.3.4 beschrieben, konnten mit den nativen SeV-F und den chimären SeV-F Hüllglykoproteinen nur bedingt Pseudotypen hergestellt werden. Dies war nur möglich für SeV-F, SeV-F_{mut} und für die 2.SeV-F Chimäre. Mit diesen SeV-F-Pseudotypen war jedoch keine Transduktion der Rezipientenzellen möglich. Dieses Ziel konnte auch nicht mit FIV, das anstelle eines SeV-F das SeV-HN Hüllglykoprotein in seiner Hülle integriert hat, erreicht werden. Wurden dagegen FIV-SeV-F/HN-Doppelpseudotypen erzeugt, siehe auch 4.4, war wiederum eine Transduktion aller Rezipientenzellen möglich. Dies deutet somit auch auf eine pantrope Eigenschaft des generierten Pseudotyps hin. Sowohl bei FIV als auch bei MoMLV konnte beobachtet werden, dass das SeV-F Fusionsprotein vermutlich ein weiteres Hüllglykoprotein in der Virushülle benötigt, um funktionell aktiv zu sein und dadurch seinem Träger neue, womöglich ebenfalls pantrope Transduktionseigenschaften zu vermitteln. Im Gegensatz dazu war das MoMLV-Virus, das nur das homologe ecotrope Hüllglykoprotein in seiner Hülle trägt lediglich zur Transduktion von murinen Zellen (NIH 3T3) fähig. Trägt aber das MoMLV-Virus neben dem ecotropen Hüllglykoprotein auch noch das native SeV-F Fusionsprotein in seiner Hülle, können alle Rezipientenzellen des Panels mit Ausnahme von BHK-Zellen ebenfalls transduziert werden.

Transduktion von Rezipienten-Zelllinien							
Pseudotypen	HepG2	M12	MDCK	BHK	CrFK	293T	NIH 3T3
FIV VSV-G	+	+	+	+	+	+	n.d.
FIV RRV	+	+	+	+	+	+	n.d.
FIV Envelope _{autolog}	+	-	-	-	+	-	n.d.
FIV SeV-F	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV SeV-Fmut	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV SeV-Fdel	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 1.-6.SeV-F Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV 1.-6.SeV-F _{mut} Chimäre	-	-	-	-	-	-	n.d.
FIV SeV-F+HN	+	+	+	+	+	+	n.d.
FIV SeV-HN	-	-	-	-	-	-	n.d.
MoMLV + SeV-F	-	-	-	-	-	-	n.d.
MoMLV eco ENV+SeV-F	+	+	+	-	+	+	+
MoMLV eco ENV	-	-	-	-	-	-	+

Tabelle 5-1: Vergleichende Darstellung der Transduktionseigenschaften von FIV- und MoMLV-Pseudotypen.

Blau hinterlegte Zelllinien stellen ASGP-R exprimierende Zelllinien dar, rot hinterlegte Zelllinien exprimieren keinen ASGP-R. Mit den in der linken Spalte angegebenen FIV- und MoMLV-Pseudotypen transduzierbare Zelllinien wurden mit einem (+), nicht-transduzierbare Zelllinien mit einem (-) markiert.

5.4 SeV-F kodierende RCRs

Replikationskompetente Viren sind ausgehend von den Sicherheitsbestrebungen, die in dem Feld der viralen Gentherapie unternommen wurden, nicht die bevorzugte Art von gentherapeutischem Vektor für den zukünftigen therapeutischen Einsatz. Aber diese Klasse von Vektor hat bedeutende Vorteile für gewisse Anwendungsbereiche zu bieten, die replikationsdefiziente Vektoren hier nicht erbringen können, beispielsweise bei der Therapie des HCC (2.1.4.1).

Daher wurde hier versucht, durch den Austausch des amphotropen endogenen *env*-Hüllglykoproteingenes eines replikationskompetenten MoMLV-Virus gegen das SeV-F, unter Beibehaltung der Leadersequenz des *env*-Hüllglykoproteingenes, die für eine Integration in das Endoplasmatische Reticulum und folglich für den Einbau des SeV-F in die Zellmembran der Verpackungszellen sorgt, hepatotrope RCRs herzustellen, deren Zielrezeptor der ASGP-R ist. Neben dem WT-SeV-F des *Fushimi* Stammes wurde eine weitere Variante von RCR hergestellt, die das SeV-F_{mut} enthielt, ebenfalls wieder unter Beibehaltung der Leadersequenz des *env*-Hüllglykoproteingenes. Mit diesen beiden neuen rekombinanten Genomen eines RCR-Vektors konnte außerdem die Frage, ob eine gezielte Ansteuerung des ASGP-R durch die alleinige SeV-F Pseudotypisierung retroviraler Vektoren möglich ist, definitiv geklärt werden. Denn eine Besonderheit dieser Vektoren ist darin zu sehen, dass in dem rekombinanten Genom das Gen für das Hüllglykoprotein, hier SeV-F bzw. SeV-F_{mut}, integriert ist. Dies wiederum gewährleistet, dass jede 293T-Verpackungszelle, die mit dem rekombinanten RCR-Genom transfiziert wurde, auch die Information für das heterologe SeV-F Hüllglykoprotein erhält. Dadurch kann eine Doppeltransfektion der Verpackungszellen mit dem rekombinanten RCR-Vektorgenom und Hüllglykoprotein-Expressionsplasmid umgangen werden, die nicht so effizient ablaufen dürfte wie eine Einfach-Transfektion. Hierfür wurden die neu konstruierten rekombinanten RCR-Vektorgenome in 293T Verpackungszellen transfiziert, um die Expression der unter der Kontrolle der *env*-Leadersequenz stehenden SeV-F und SeV-F_{mut} Varianten zu überprüfen, zu sehen in der Abbildung 4-28. Sowohl eine SeV-F bzw. SeV-F_{mut} Expression als auch deren Einbau in die Zellmembran konnte mit einer Membranimmunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Trotz der replizierenden Natur der neu konstruierten RCR-Vektoren war eine Durchinfektion der 293T Verpackungszellen aufgrund der Substitution des amphotropen Hüllglykoproteins mit dem SeV-F bzw. SeV-F_{mut} nicht nachweisbar; denn, wie bereits postuliert wurde^{15,94}, interagiert SeV-F mit dem ASGP-R, der von 293T Verpackungszellen nicht exprimiert wird, siehe Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11.

Ein SeV-F- bzw. ein SeV-F_{mut}-Einbau in die Virushülle des MoMLV konnte im Anschluß an eine Ultrazentrifugation des SeV-F bzw. SeV-F_{mut} pseudotypisierten RCR-haltigen Zellüberstandes mittels Westernblot (Abbildung 4-29) nachgewiesen werden. Dass es sich bei dem SeV-F Nachweis im Westernblot um in das MoMLV-Virus inkorporierte SeV-F Hüllglykoproteine handelt, ist am kopräzipitiertem Nukleokapsid p30 gezeigt, siehe Abbildung 4-29. Die SeV-F und SeV-F_{mut} pseudotypisierten RCR-Überstände wurden für die Transduktion des Rezipientenzellpanels eingesetzt. Ein Transduktionsnachweis mittels eines Immunperoxidase Assays, der auf einem immunhistochemischen Expressionsnachweis des MoMLV Nukleokapsidproteins p30 in den transduzierten Rezipientenzellen beruht, konnte nicht erbracht werden. Dies belegt die Ergebnisse, die bei den Transduktionsassays mit SeV-F einfachpseudotypisierten replikationsdefizienten FIV- und MoMLV-Vektoren erhalten wurden, siehe Tabelle 5-1.

5.5 Suizidgen kodierende RCRs

Viren stellen hoch entwickelte natürliche Vektoren für den Transfer fremder genetischer Information in Zellen dar. Diese Eigenschaft hat zu umfassenden Forschungsaktivitäten im Bereich der Erzeugung rekombinanter viraler Vektoren für den Transfer therapeutischer Gene in krankhaft veränderte Zellen bzw. Gewebe geführt.

Der gentherapeutische Ansatz beschränkt sich nicht nur auf den Versuch, genetische Defekte zu korrigieren. Insbesondere für den Bereich der Krebstherapie sind bereits zahlreiche klinische Protokolle entwickelt worden, die zumeist auf eine Verstärkung der tumorspezifischen Immunantwort oder auf eine selektive Abtötung der Hepatomzellen durch Erzeugung toxischer Metaboliten abzielen. Ein in die Hepatomzellen eingebrachtes Gen macht diese für eine sogenannte „*prodrug*“ empfindlich, die durch das Genprodukt in der Zelle zu einem cytotoxischen Wirkstoff umgesetzt wird^{1,77}.

Studien erwiesen, dass eine hohe Sensitivität humaner oder rodenter Hepatomzellen gegenüber der „*prodrug*“ 5-FC durch Transduktion dieser Zellen mit dem Cytosin-Desaminase (CD) Gen aus *E. coli*, *codA*, erreicht wird^{4,48,69,120}. In ähnlichen Studien wurde gezeigt, dass humane und murine Hepatomzellen, die mit dem YCD-Gen aus Hefe transduziert wurden, *in vitro* und *in vivo* signifikant sensitiver gegenüber 5-FC waren als mit dem bakteriellen *codA*-Gen transduzierte Zellen. Unter Verwendung gereinigter Enzyme wurde beobachtet, dass YCD und bakterielle CD vergleichbare K_m und V_{max} -Werte für Cytosin, aber YCD im Vergleich zur bakteriellen CD einen 22-fach niedrigeren K_m und einen 4-fach höheren V_{max} -Wert bezüglich der Umsetzung des Substrates 5-FC aufweist⁸¹.

Gegenwärtige Suizidtherapiestrategien auf der Basis replikationsdefizienter Retroviren (RDR) sind von einer limitierten Effizienz des *in vivo* Gentransfers geprägt¹⁸⁴. Dagegen stellen replikationskompetente Retroviren (RCR) eine neuartige erfolgversprechende Variante dar, diesem Problem zu begegnen, da jede transduzierte Zelle zu einer neuen Virus-Produzentenzelle wird und somit auch im Falle einer initial niedrigen Transduktionsrate eine nahezu komplette Durchinfektion solider Tumorknoten erreicht werden kann^{98,187}. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die durch das replikationskompetente Retrovirus MoMLV-YCD vermittelte Suizidgenwirkung im Kontext humaner Hepatomzellen *in vitro* untersucht.

Um Vektoren für adäquate Infektionen von Zielzellen auf der Grundlage analoger moi-Werte einsetzen zu können, war eine Titerung der durch RCR-Virus-Produzentenzellen erzeugten Überstände nötig. Zur Evaluierung retroviraler Titer im Kulturüberstand RCR-Virus-produzierender Zellen wurde die Methode der RTQ-PCR etabliert. Die Quantifizierung viraler Genome durch RTQ-PCR war reproduzierbar. Unter Verwendung einer Plasmidstandardkurve (pACE-YCD) mit der entsprechenden Zielsequenz der PCR, dem retroviralen Verpackungssignal Ψ , konnten absolute Kopienzahlen viraler Genome in unbekanntem Proben festgestellt werden.

Nachteil bei der Bestimmung sogenannter RNA-Titer ist die Tatsache, dass diese nicht akkurat funktionelle Titer widerspiegeln, zurückzuführen auf die Anwesenheit defekter (und somit nicht-infektiöser) Partikel, störender Transduktionsinhibitoren und von der Vektorproduktion herrührender Plasmidkontaminationen⁸³. Das Problem der Plasmidkontamination bezüglich einer aussagekräftigen Titerung konnte durch Applikation eines DNaseI-Verdau gelöst werden.

Durch Analyse der Vektorexpression in transduzierten Zellen mittels des Nachweises des p30-Nucleocapsidproteins von MoMLV (IP-Assay) wurden funktionelle Titer abgeschätzt und mit den durch RTQ-PCR ermittelten verglichen.

Durch antikörperspezifischen Nachweis des von MoMLV exprimierten Nucleocapsidproteins p30 wurde über die Zahl an tatsächlich infizierten Rezipientenzellen (NIH 3T3) ein auf Funktionalität basierender viraler Titer berechnet. Problem dieser funktionellen Titerung war der Umstand, dass die antikörperspezifische Färbung nicht sehr intensiv war. Außerdem wurde bei der ausgeführten Dreifachbestimmung eine große Abweichung der Einzelwerte festgestellt. Um eine statistisch signifikante Aussage zu erzielen, sollten vermutlich mehr als nur drei Bestimmungen durchgeführt werden. Zudem war bei der ausgewählten 10^{-5} -Verdünnung aufgrund der sehr niedrigen Zahl an zu verzeichnenden Kolonien (<10 cfu/well) die Standardabweichung der Einzelwerte groß.

Limitationen dieser Methode bestehen in weiterer Hinsicht: Erstens wird vorausgesetzt, dass das Expressionsniveau aller integrierten Vektoren über der Detektionsgrenze des Assays liegt. Zweitens können mehrfach infizierte Zellen nicht von einfach infizierten unterschieden werden.

Gezielte Infektionen erfolgten im Rahmen dieser Arbeit auf Basis der RNA-Titerung, was evtl. einen gewissen Unsicherheitsfaktor in sich birgt, da der Anteil defekter Partikel an der ermittelten

Gesamtzahl an Viren nicht bekannt ist. Die durch RTQ-PCR erhaltenen Titer korrespondierten allerdings annähernd mit den biologischen Titern des IP-Assays, sodass der Beitrag defekter Partikel und Inhibitoren bei allen in dieser Studie getesteten Vektoren als vergleichbar angesehen werden konnte¹⁴⁷.

Sämtliche Methoden zur Titerung viraler Vektoren weisen Vor- und Nachteile auf. Als Resümee kann festgehalten werden, dass RNA-Titer naturgemäß die Zahl an funktionellen Viren überschätzen, da hierbei auch nicht-infektiöse/defekte Viruspartikel mit erfasst werden, während Assays, die auf dem Nachweis der Genexpression in transduzierten Zellen beruhen, diese Zahl unterschätzen, da hierbei erfolgreich transduzierte Rezipientenzellen mit für den jeweiligen Proteinnachweis zu niedriger Transgen-Expression nicht mit erfasst werden.

Die genaueste, jedoch zeitintensivste Titerungsmethode ist die Detektion integrierter Vektor-DNA in transduzierten Zellen durch RTQ-PCR. Diese Methode ist nicht von der Vektorexpression abhängig und detektiert multiple Vektorintegrationen¹⁴⁸.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass der retroviral vermittelte Transfer des YCD-Gens Hepatomzellen gegenüber 5-FC sensibilisierte und deren Wachstum inhibierte. YCD kodiert für ein Polypeptid aus 158 Aminosäuren, welches Homologien zu Cytosin-Nucleosid-(Cytidin und Desoxycytidin) und Cytosin-Nucleotid-Desaminasen aufweist. Mit der *E. coli*-Cytosindeaminase besteht jedoch keine Sequenzhomologie⁴⁷. YCD ist ein Homodimer, das aus zwei 17 kDa-Untereinheiten aufgebaut ist¹⁵³.

Gewisse Hepatomzellen können wegen einer nur mäßigen Umsetzung von 5-FU in die eigentlich toxischen Metaboliten relativ resistent gegenüber 5-FU werden⁶³. In *E. coli* und Hefe existiert das Enzym Uracilphosphoribosyltransferase, das spezifisch Uracil zu UMP umwandelt. Aus Studien ist bekannt, dass der Transfer dieser Gene in Hepatomzellen eine effizientere Konversion von 5-FU in 5-FUMP induzierte⁷⁶. Weiterhin wurde ein bifunktionelles chimäres Fusionsprotein, SuperCD, das die enzymatischen Aktivitäten von YCD und YUPRT vereinigt, als ein hochwirksames Instrument beschrieben, die Reaktion des 5-FC zu 5-FUMP zu bündeln⁴⁸.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiger RCR-Vektor auf MoMLV-Basis, der für dieses SuperCD-Suizidgen kodiert, generiert und *in vitro* funktionell analysiert.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine äußerst effektive „*prodrug*“-Metabolisierung sowohl durch RCR-YCD- als auch durch RCR-SuperCD-Vektoren vermittelt werden konnte. Bei dem hier erstmals erfolgten Vergleich der beiden Transgene im Kontext replikationskompetenter Retroviren (RCR) wurden jedoch keine empirischen Differenzen hinsichtlich der jeweils induzierten 5-FC gestützten Cytotoxizität beobachtet. Das SuperCD-Fusionsprotein zeigte nicht die bislang lediglich für den Kontext replikationsdefekter adenoviraler Vektoren im Vergleich zu YCD vorbeschriebene höhere Effizienz in der Toxifizierung der „*prodrug*“ 5-FC⁴⁸.

Vor diesem Hintergrund muss angemerkt werden, dass die besondere Eigenschaft der Replikationskompetenz der verwendeten retroviralen Vektoren die Berechnungsgrundlage für einen quantitativen Vergleich des Suizidgeneffekts der Gene YCD und SuperCD kompliziert. Da es sich bei den in dieser Studie verwendeten viralen Vektoren um replikationskompetente Retroviren handelt, kann auch auf den Rezipientenzellen (HepG2) Virussynthese stattfinden, was wiederum das weitere Infektions- und damit Absterbeverhalten erheblich zu beeinflussen vermag, sodass SuperCD-/YCD-vermittelte Cytotoxizitäts-Unterschiede in den Hintergrund gedrängt werden können.

Es wurde festgestellt, dass MoMLV-YCD im Vergleich zu MoMLV-SuperCD eine deutlich gesteigerte Replikationsrate in HepG2-Zellen aufweist. Die langsamere Replikation von MoMLV-SuperCD dürfte u.a. auf der Tatsache des um 0,7 kb längeren Genoms basieren. Dieser Umstand sollte in einer weniger effizienten Verpackung des viralen Vektors resultieren¹⁵⁵. Inwieweit die initiale Transduktionsrate durch das Phänomen der Replikationskompetenz der verwendeten Viren noch angehoben wird, ist unklar. Im Hinblick auf die schnellere Replikationskinetik von MoMLV-YCD muss jedoch angenommen werden, dass eine höhere Effizienz von MoMLV-SuperCD-Vektoren bezüglich der Toxifizierung der „*prodrug*“ 5-FC durch die schnellere Replikationskinetik von MoMLV-YCD-Vektoren kompensiert wird und deshalb das Abtötungspotenzial dieser beiden Vektoren in der Gesamtsumme der beobachteten Effekte weitgehend vergleichbar ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei den hier vorgestellten RCR-Vektoren die für eine effiziente Lyse solider Tumoren wichtigen Eigenschaften „Replikationskompetenz“ und „hochwirksamer Suizidgeneffekt“, gebündelt wurden, was diese für zukünftige Gentherapie-strategien zur Heilung des HCC prädestiniert.

5.6 Ausblick

Für einen effizienten Gentransfer in ruhende, das heisst mitose-inaktive Zellen, haben sich Lentiviren bzw. die von ihnen abstammenden Vektoren als besonders geeignet erwiesen, da sie eine Vielzahl an Zielzellen (z.B. Hepatozyten) effizient transduzieren und ihre therapeutischen Gene stabil in das Zielzellgenom integrieren können. Dies gewährleistet eine stabile Expression des therapeutischen Genes in den Zielzellen, wie es beispielsweise für die Korrektur von monogenetischen Lebererkrankungen notwendig ist. Für den *in vivo* Gentransfer in die Leber bedarf es aber eines spezifischen Tropismus, der dafür sorgt, dass ausschließlich Hepatozyten angesteuert und transduziert werden. In Anlehnung an die SeV-F Pseudotypisierungen von MoMLV zur Ansteuerung des ausschließlich von Hepatozyten exprimierten ASGP-R sollte dieses Prinzip auf das nicht human-pathogene Feline Immundefizienz Virus übertragen werden. Die alleinige SeV-F

Inkorporation in das FIV Partikel ist realisierbar, hat jedoch zur Folge, dass diese Pseudotypen nicht funktionell sind. Dies ändert sich, wenn das SeV-HN Protein ebenfalls in die FIV Hülle inkorporiert wird.

Die entstandenen Partikel weisen dann jedoch pantrope Eigenschaften auf. Die Inkorporation der Hüllglykoproteine einzeln in die Hülle des FIV-Vektors verleihen diesem jedoch keine infektiösen Eigenschaften, was auf ein unmittelbares Zusammenwirken der beiden Hüllglykoproteine hinweist. Dies deutet gleichzeitig darauf hin, dass die beiden SeV-Hüllglykoproteine in der Mikroumgebung der FIV-Hülle miteinander interagieren^{60,111,167,168,171,176}.

Es gibt allerdings Hinweise, dass die SeV-F aktivierende Funktion des SeV-HN Proteins durch endogene Hüllglykoproteine des jeweiligen zu pseudotypisierenden Virus komplementiert werden können. Gezeigt wurde dies für die SeV-F Pseudotypisierung von ecotropen MoMLV^{161,162} sowie auch in dieser Arbeit, hier allerdings ohne die postulierte ASGP-R Spezifität und den damit verbundenen Hepatotropismus. Um dennoch eine Spezifität für Hepatozyten zu generieren, könnte das SeV-HN Protein ein Target für weitere Experimente sein. Durch gezielte Mutationen in der für die Bindung an ubiquitäre Sialinsäurereste vermittelnden Region des SeV-HN Proteins könnte dessen Funktion soweit verändert werden, dass zwar der für die Interaktion mit dem SeV-F verantwortliche Bereich nach wie vor die Fusionseigenschaften des SeV-F triggert, aber nicht mehr für eine eigene Rezeptor-Bindung funktionell ist. So würde der SeV-HN-SeV-F-Komplex weiterhin für die Bindung an den ASGP-R von Hepatozyten zu Verfügung stehen, würde aber keine pantropen Eigenschaften mehr aufweisen.

Dieses Prinzip des zusätzlichen Einbaus eines modifizierten, bindungsunfähigen SeV-HN in hepatotrope RCR-Vektoren für eine zukünftige Suizidgentherapie des HCC stellt eine große Herausforderung dar, da der Verpackungskapazität einer RCR-Hülle schon aufgrund des Suizidgen kodierenden Überlänge genomes Grenzen gesetzt sind, die es im Rahmen der weiteren Forschung zu evaluieren gilt.

Die Entwicklung Leber-/Hepatom-spezifischer RCR-Vektoren würde eine signifikante Verbesserung in der Vektortechnologie zur gentherapeutischen Behandlung des HCC darstellen.

Für eine breite klinische Anwendung bestehen allerdings noch gravierende Hindernisse. Aufgrund einer gezielten Forschungsarbeit insbesondere im Bereich der Entwicklung verbesserter Vektorsysteme wird die Gentherapie bei der Behandlung zahlreicher Krankheiten in Zukunft mit großer Wahrscheinlichkeit eine entscheidende Rolle spielen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aghi, M., F. Hochberg, and X. O. Breakefield.** 2000. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J. Gene Med.* **2**:148-164.
2. **Albritton, L. M., L. Tseng, D. Scadden, and J. M. Cunningham.** 1989. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* **57**:659-666.
3. **Andrews, J. L., M. J. Kadan, M. I. Gorziglia, M. Kaleko, and S. Connelly.** 2001. Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII. *Mol. Ther.* **3**:329-336.
4. **Austin, E. A. and B. E. Huber.** 1993. A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Mol. Pharmacol.* **43**:380-387.
5. **Ausubel, F. M.** 1989. *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley, New York.
6. **Bachmann, M. H., C. Mathiason-Dubard, G. H. Learn, A. G. Rodrigo, D. L. Sodora, P. Mazzetti, E. A. Hoover, and J. I. Mullins.** 1997. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *J. Virol.* **71**:4241-4253.
7. **Bagai, S. and D. P. Sarkar.** 1993. Reconstituted Sendai virus envelopes as biological carriers: dual role of F protein in binding and fusion with liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1152**:15-25.
8. **Bagai, S. and D. P. Sarkar.** 1994. Fusion-mediated microinjection of lysozyme into HepG2 cells through hemagglutinin neuraminidase-depleted Sendai virus envelopes. *J. Biol. Chem.* **269**:1966-1972.
9. **Becker, S., M. Spiess, and H. D. Klenk.** 1995. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J. Gen. Virol.* **76 (Pt 2)**:393-399.
10. **Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**:1320-1323.
11. **Bi, W. L., L. M. Parysek, R. Warnick, and P. J. Stambrook.** 1993. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **4**:725-731.
12. **Bilbao, R., M. Bustos, P. Alzuguren, M. J. Pajares, M. Drozdik, C. Qian, and J. Prieto.** 2000. A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds. *Gene Ther.* **7**:1824-1832.
13. **Birnboim, H. C.** 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**:243-255.

14. **Bischoff, J., S. Libresco, M. A. Shia, and H. F. Lodish.** 1988. The H1 and H2 polypeptides associate to form the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells. *J. Cell Biol.* **106**:1067-1074.
15. **Bitzer, M., U. Lauer, C. Baumann, M. Spiegel, M. Gregor, and W. J. Neubert.** 1997. Sendai virus efficiently infects cells via the asialoglycoprotein receptor and requires the presence of cleaved F0 precursor proteins for this alternative route of cell entry. *J. Virol.* **71**:5481-5486.
16. **Bitzer, M. and U. M. Lauer.** 2003. [Oncolytic viruses for genetic therapy of gastrointestinal tumors]. *Z. Gastroenterol.* **41**:667-674.
17. **Blackburn, P.** 1979. Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay. *J. Biol. Chem.* **254**:12484-12487.
18. **Blaese, R. M., K. W. Culver, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J. J. Greenblatt, S. A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C. A. Mullen, W. J. Ramsey, L. Muul, R. A. Morgan, and W. F. Anderson.** 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**:475-480.
19. **Bohan, C. A., R. A. Robinson, P. A. Luciw, and A. Srinivasan.** 1989. Mutational analysis of sodium butyrate inducible elements in the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *Virology* **172**:573-583.
20. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
21. **Branchereau, S., D. Calise, and N. Ferry.** 1994. Factors influencing retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Hum. Gene Ther.* **5**:803-808.
22. **Briggs, J. A., T. Wilk, and S. D. Fuller.** 2003. Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? *J. Gen. Virol.* **84**:757-768.
23. **Brown, W. C., L. Bissey, K. S. Logan, N. C. Pedersen, J. H. Elder, and E. W. Collisson.** 1991. Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.* **65**:3359-3364.
24. **Buchholz, C. J., J. Stitz, and K. Cichutek.** 1999. Retroviral cell targeting vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1**:613-621.
25. **Burnette, W. N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**:195-203.
26. **Burns, J. C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, and J. K. Yee.** 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:8033-8037.
27. **Cardoso, J. E., S. Branchereau, P. R. Jeyaraj, D. Houssin, O. Danos, and J. M. Heard.** 1993. In situ retrovirus-mediated gene transfer into dog liver. *Hum. Gene Ther.* **4**:411-418.

28. **Carter, P. J. and R. J. Samulski.** 2000. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int. J. Mol. Med.* **6**:17-27.
29. **Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. Saint-Basile, F. Le Deist, and A. Fischer.** 2000. [Gene therapy of severe combined immunodeficiencies]. *Transfus. Clin. Biol.* **7**:259-260.
30. **Chapman, B. S., R. M. Thayer, K. A. Vincent, and N. L. Haigwood.** 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19**:3979-3986.
31. **Collins, J. C., E. Paietta, R. Green, A. G. Morell, and R. J. Stockert.** 1988. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J. Biol. Chem.* **263**:11280-11283.
32. **Condiotti, R., M. A. Curran, G. P. Nolan, H. Giladi, M. Ketzinel-Gilad, E. Gross, and E. Galun.** 2004. Prolonged liver-specific transgene expression by a non-primate lentiviral vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**:998-1006.
33. **Cotten, M. and E. Wagner.** 1993. Non-viral approaches to gene therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**:705-710.
34. **Curran, M. A., S. M. Kaiser, P. L. Achacoso, and G. P. Nolan.** 2000. Efficient transduction of nondividing cells by optimized feline immunodeficiency virus vectors. *Mol. Ther.* **1**:31-38.
35. **Danos, O. and R. C. Mulligan.** 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**:6460-6464.
36. **de Parseval, A. and J. H. Elder.** 1999. Demonstration that orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) protein and characterization of a unique gene product with partial rev activity. *J. Virol.* **73**:608-617.
37. **Deng, R., Z. Wang, P. J. Mahon, M. Marinello, A. Mirza, and R. M. Iorio.** 1999. Mutations in the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein in the promotion of fusion. *Virology* **253**:43-54.
38. **Deng, R., Z. Wang, A. M. Mirza, and R. M. Iorio.** 1995. Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike. *Virology* **209**:457-469.
39. **Deonarain, M. P. and A. A. Epenetos.** 1994. Targeting enzymes for cancer therapy: old enzymes in new roles. *Br. J. Cancer* **70**:786-794.
40. **DePolo, N. J., J. D. Reed, P. L. Sheridan, K. Townsend, S. L. Sauter, D. J. Jolly, and T. W. Dubensky, Jr.** 2000. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.* **2**:218-222.
41. **Dillon, P. J., J. Lenz, and C. A. Rosen.** 1991. Construction of a replication-competent murine retrovirus vector expressing the human immunodeficiency virus type 1 tat transactivator protein. *J. Virol.* **65**:4490-4493.
42. **Domin, B. A., W. B. Mahony, and T. P. Zimmerman.** 1993. Transport of 5-fluorouracil and uracil into human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **46**:503-510.

43. **Donaldson, L. J., J. Rankin, and S. Proctor.** 1994. Is it possible to catch leukaemia from a cat? *Lancet* **344**:971-972.
44. **Duan, D., P. Sharma, J. Yang, Y. Yue, L. Dudus, Y. Zhang, K. J. Fisher, and J. F. Engelhardt.** 1998. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J. Virol.* **72**:8568-8577.
45. **Duan, D., Z. Yan, Y. Yue, and J. F. Engelhardt.** 1999. Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology* **261**:8-14.
46. **Duan, D., Y. Yue, Z. Yan, and J. F. Engelhardt.** 2000. A new dual-vector approach to enhance recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression through intermolecular cis activation. *Nat. Med.* **6**:595-598.
47. **Erbs, P., F. Exinger, and R. Jund.** 1997. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* FCY1 gene encoding cytosine deaminase and its homologue FCA1 of *Candida albicans*. *Curr. Genet.* **31**:1-6.
48. **Erbs, P., E. Regulier, J. Kintz, P. Leroy, Y. Poitevin, F. Exinger, R. Jund, and M. Mehtali.** 2000. In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res.* **60**:3813-3822.
49. **Ferry, N., O. Duplessis, D. Houssin, O. Danos, and J. M. Heard.** 1991. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:8377-8381.
50. Fischer, S. Herstellung von Verpackungszelllinien zur Trans-Komplementation der drei viralen Hüllproteine bei der Erzeugung rekombinanter replikationsdefizienter Sendai-Viren. 1998. Ref Type: Thesis/Dissertation
51. **Foecking, M. K. and H. Hofstetter.** 1986. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene* **45**:101-105.
52. **Follenzi, A., L. E. Ailles, S. Bakovic, M. Geuna, and L. Naldini.** 2000. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat. Genet.* **25**:217-222.
53. **Fuhrer, C., I. Geffen, K. Huggel, and M. Spiess.** 1994. The two subunits of the asialoglycoprotein receptor contain different sorting information. *J. Biol. Chem.* **269**:3277-3282.
54. **Gaush, C. R., W. L. Hard, and T. F. Smith.** 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**:931-935.
55. **Geyer, H., C. Will, H. Feldmann, H. D. Klenk, and R. Geyer.** 1992. Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. *Glycobiology* **2**:299-312.
56. **Girod, A., M. Ried, C. Wobus, H. Lahm, K. Leike, J. Kleinschmidt, G. Deleage, and M. Hallek.** 1999. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat. Med.* **5**:1052-1056.

57. **Goff, S., P. Traktman, and D. Baltimore.** 1981. Isolation and properties of Moloney murine leukemia virus mutants: use of a rapid assay for release of virion reverse transcriptase. *J. Virol.* **38**:239-248.
58. **Gorman, C. M., B. H. Howard, and R. Reeves.** 1983. Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate. *Nucleic Acids Res.* **11**:7631-7648.
59. **Graham, F. L. and A. J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456-467.
60. **Gravel, K. A. and T. G. Morrison.** 2003. Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus. *J. Virol.* **77**:11040-11049.
61. **Hamra, F. K., J. Gatlin, K. M. Chapman, D. M. Grellhesl, J. V. Garcia, R. E. Hammer, and D. L. Garbers.** 2002. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:14931-14936.
62. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
63. **Harris, J. D., A. A. Gutierrez, H. C. Hurst, K. Sikora, and N. R. Lemoine.** 1994. Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation. *Gene Ther.* **1**:170-175.
64. **Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**:986-994.
65. **Hohne, M., S. Thaler, J. C. Dudda, B. Groner, and B. S. Schnierle.** 1999. Truncation of the human immunodeficiency virus-type-2 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of murine leukemia virus retroviral vector particles. *Virology* **261**:70-78.
66. **Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:7276-7280.
67. **Hosaka, M., M. Nagahama, W. S. Kim, T. Watanabe, K. Hatsuzawa, J. Ikemizu, K. Murakami, and K. Nakayama.** 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**:12127-12130.
68. **Hu, X. L., R. Ray, and R. W. Compans.** 1992. Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *J. Virol.* **66**:1528-1534.
69. **Huber, B. E., E. A. Austin, S. S. Good, V. C. Knick, S. Tibbels, and C. A. Richards.** 1993. In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res.* **53**:4619-4626.
70. **Huber, B. E., C. A. Richards, and E. A. Austin.** 1994. Virus-directed enzyme/prodrug therapy (VDEPT). Selectively engineering drug sensitivity into tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **716**:104-114.

71. **Ido, A., H. Uto, A. Moriuchi, K. Nagata, Y. Onaga, M. Onaga, T. Hori, S. Hirono, K. Hayashi, T. Tamaoki, and H. Tsubouchi.** 2001. Gene Therapy Targeting for Hepatocellular Carcinoma: Selective and Enhanced Suicide Gene Expression Regulated by a Hypoxia-inducible Enhancer Linked to a Human α -Fetoprotein Promoter. *Cancer Res* **61**:3016-3021.
72. **Indraccolo, S., S. Minuzzo, F. Feroli, F. Mammano, F. Calderazzo, L. Chieco-Bianchi, and A. Amadori.** 1998. Pseudotyping of Moloney leukemia virus-based retroviral vectors with simian immunodeficiency virus envelope leads to targeted infection of human CD4+ lymphoid cells. *Gene Ther.* **5**:209-217.
73. **Jainchill, J. L., S. A. Aaronson, and G. J. Todaro.** 1969. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* **4**:549-553.
74. **Johnston, J. C., M. Gasmi, L. E. Lim, J. H. Elder, J. K. Yee, D. J. Jolly, K. P. Campbell, B. L. Davidson, and S. L. Sauter.** 1999. Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. *J. Virol.* **73**:4991-5000.
75. **Kafri, T., U. Blomer, D. A. Peterson, F. H. Gage, and I. M. Verma.** 1997. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genet.* **17**:314-317.
76. **Kanai, F., T. Kawakami, H. Hamada, A. Sadata, Y. Yoshida, T. Tanaka, M. Ohashi, K. Tateishi, Y. Shiratori, and M. Omata.** 1998. Adenovirus-mediated transduction of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil. *Cancer Res.* **58**:1946-1951.
77. **Kay, M. A., J. C. Glorioso, and L. Naldini.** 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* **7**:33-40.
78. **Kay, M. A., C. S. Manno, M. V. Ragni, P. J. Larson, L. B. Couto, A. McClelland, B. Glader, A. J. Chew, S. J. Tai, R. W. Herzog, V. Arruda, F. Johnson, C. Scallan, E. Skarsgard, A. W. Flake, and K. A. High.** 2000. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* **24**:257-261.
79. **Kay, M. A., S. Rothenberg, C. N. Landen, D. A. Bellinger, F. Leland, C. Toman, M. Finegold, A. R. Thompson, M. S. Read, K. M. Brinkhous, and .** 1993. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* **262**:117-119.
80. **Kemler, I., R. Barraza, and E. M. Poeschla.** 2002. Mapping the encapsidation determinants of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **76**:11889-11903.
81. **Kievit, E., E. Bershad, E. Ng, P. Sethna, I. Dev, T. S. Lawrence, and A. Rehemtulla.** 1999. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res.* **59**:1417-1421.
82. **Kim, J. W., E. I. Closs, L. M. Albritton, and J. M. Cunningham.** 1991. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* **352**:725-728.
83. **Kirkwood, T. B. and C. R. Bangham.** 1994. Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:8685-8689.

84. **Knowles, B. B., C. C. Howe, and D. P. Aden.** 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**:497-499.
85. **Kobayashi, M., A. Iida, Y. Ueda, and M. Hasegawa.** 2003. Pseudotyped lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus SIVagm with envelope glycoproteins from paramyxovirus. *J. Virol.* **77**:2607-2614.
86. **Kochanek, S., P. R. Clemens, K. Mitani, H. H. Chen, S. Chan, and C. T. Caskey.** 1996. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:5731-5736.
87. **Kohgo, Y., J. Kato, R. Nakaya, Y. Mogi, H. Yago, Y. Sakai, H. Matsushita, and Y. Niitsu.** 1993. Production and characterization of specific asialoglycoprotein receptor antibodies. *Hybridoma* **12**:591-598.
88. **Kotin, R. M., M. Siniscalco, R. J. Samulski, X. D. Zhu, L. Hunter, C. A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi, and K. I. Berns.** 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**:2211-2215.
89. **Kowolik, C. M. and J. K. Yee.** 2002. Preferential transduction of human hepatocytes with lentiviral vectors pseudotyped by Sendai virus F protein. *Mol. Ther.* **5**:762-769.
90. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
91. **Lal, S., U. M. Lauer, D. Niethammer, J. F. Beck, and P. G. Schlegel.** 2000. Suicide genes: past, present and future perspectives. *Immunol. Today* **21**:48-54.
92. **Lamb, R. A.** 1993. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* **197**:1-11.
93. **Lawrence, T. S., A. Rehemtulla, E. Y. Ng, M. Wilson, J. E. Trosko, and P. L. Stetson.** 1998. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-flucytosine. *Cancer Res.* **58**:2588-2593.
94. **Leyrer, S., M. Bitzer, U. Lauer, J. Kramer, W. J. Neubert, and R. Sedlmeier.** 1998. Sendai virus-like particles devoid of haemagglutinin-neuraminidase protein infect cells via the human asialoglycoprotein receptor. *J. Gen. Virol.* **79 (Pt 4)**:683-687.
95. **Li, L., J. M. Olvera, K. E. Yoder, R. S. Mitchell, S. L. Butler, M. Lieber, S. L. Martin, and F. D. Bushman.** 2001. Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J.* **20**:3272-3281.
96. **Lieber, A., M. J. Vrancken Peeters, L. Meuse, N. Fausto, J. Perkins, and M. A. Kay.** 1995. Adenovirus-mediated urokinase gene transfer induces liver regeneration and allows for efficient retrovirus transduction of hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:6210-6214.
97. **Logg, C. R., A. Logg, R. J. Matusik, B. H. Bochner, and N. Kasahara.** 2002. Tissue-specific transcriptional targeting of a replication-competent retroviral vector. *J. Virol.* **76**:12783-12791.

98. **Logg, C. R., C. K. Tai, A. Logg, W. F. Anderson, and N. Kasahara.** 2001. A uniquely stable replication-competent retrovirus vector achieves efficient gene delivery in vitro and in solid tumors. *Hum. Gene Ther.* **12**:921-932.
99. **Logg, C. R., C. K. Tai, A. Logg, W. F. Anderson, and N. Kasahara.** 2001. A uniquely stable replication-competent retrovirus vector achieves efficient gene delivery in vitro and in solid tumors. *Hum. Gene Ther.* **12**:921-932.
100. **Lois, C., E. J. Hong, S. Pease, E. J. Brown, and D. Baltimore.** 2002. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**:868-872.
101. **Lusky, M., M. Christ, K. Rittner, A. Dieterle, D. Dreyer, B. Mouro, H. Schultz, F. Stoeckel, A. Pavirani, and M. Mehtali.** 1998. In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J. Virol.* **72**:2022-2032.
102. **Malik, P., S. A. McQuiston, X. J. Yu, K. A. Pepper, W. J. Krall, G. M. Podsakoff, G. J. Kurtzman, and D. B. Kohn.** 1997. Recombinant adeno-associated virus mediates a high level of gene transfer but less efficient integration in the K562 human hematopoietic cell line. *J. Virol.* **71**:1776-1783.
103. **Mammano, F., F. Salvatori, S. Indraccolo, A. De Rossi, L. Chieco-Bianchi, and H. G. Gottlinger.** 1997. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4⁺ cells. *J. Virol.* **71**:3341-3345.
104. **Mann, R., R. C. Mulligan, and D. Baltimore.** 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**:153-159.
105. **Markwell, M. A., A. Portner, and A. L. Schwartz.** 1985. An alternative route of infection for viruses: entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a Sendai virus mutant lacking its attachment protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**:978-982.
106. **Markwell, M. A., L. Svennerholm, and J. C. Paulson.** 1981. Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**:5406-5410.
107. **Marshall, E.** 1999. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* **286**:2244-2245.
108. **Martin, F., S. Neil, J. Kupsch, M. Maurice, F. Cosset, and M. Collins.** 1999. Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells. *J. Virol.* **73**:6923-6929.
109. **Mastromarino, P., C. Conti, P. Goldoni, B. Hauttecoeur, and N. Orsi.** 1987. Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J. Gen. Virol.* **68 (Pt 9)**:2359-2369.
110. **Matukonis, M., M. Li, R. P. Molina, B. Paszkiet, M. Kaleko, and T. Luo.** 2002. Development of second- and third-generation bovine immunodeficiency virus-based gene transfer systems. *Hum. Gene Ther.* **13**:1293-1303.

111. **Melanson, V. R. and R. M. Iorio.** 2004. Amino acid substitutions in the F-specific domain in the stalk of the newcastle disease virus HN protein modulate fusion and interfere with its interaction with the F protein. *J. Virol.* **78**:13053-13061.
112. **Miao, C. H., R. O. Snyder, D. B. Schowalter, G. A. Patijn, B. Donahue, B. Winther, and M. A. Kay.** 1998. The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat. Genet.* **19**:13-15.
113. **Miller, A. D. and C. Buttimore.** 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell Biol.* **6**:2895-2902.
114. **Miller, A. D., D. G. Miller, J. V. Garcia, and C. M. Lynch.** 1993. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.* **217**:581-599.
115. **Miller, D. G., M. A. Adam, and A. D. Miller.** 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell Biol.* **10**:4239-4242.
116. **Mitrophanous, K., S. Yoon, J. Rohll, D. Patil, F. Wilkes, V. Kim, S. Kingsman, A. Kingsman, and N. Mazarakis.** 1999. Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther.* **6**:1808-1818.
117. **Miyazawa, T., Y. Kawaguchi, M. Kohmoto, J. Sakuragi, A. Adachi, M. Fukasawa, and T. Mikami.** 1992. Production of feline immunodeficiency virus in feline and non-feline non-lymphoid cell lines by transfection of an infectious molecular clone. *J. Gen. Virol.* **73 (Pt 6)**:1543-1546.
118. **Moolten, F. L.** 1994. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* **1**:279-287.
119. **Morsy, M. A. and C. T. Caskey.** 1999. Expanded-capacity adenoviral vectors--the helper-dependent vectors. *Mol. Med. Today* **5**:18-24.
120. **Mullen, C. A., M. Kilstrup, and R. M. Blaese.** 1992. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:33-37.
121. **Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato.** 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**:3858-3863.
122. **Nakai, H., Y. Iwaki, M. A. Kay, and L. B. Couto.** 1999. Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J. Virol.* **73**:5438-5447.
123. **Neda, H., C. H. Wu, and G. Y. Wu.** 1991. Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity. *J. Biol. Chem.* **266**:14143-14146.
124. **Nicklin, S. A. and A. H. Baker.** 2002. Tropism-modified adenoviral and adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **2**:273-293.
125. **Nowotny, N., A. Uthman, O. A. Haas, A. Borkhardt, K. Lechner, H. F. Egberink, K. Mostl, and M. C. Horzinek.** 1995. Is it possible to catch leukemia from a cat? *Lancet* **346**:252-253.

126. **O'Neal, W. K., H. Zhou, N. Morral, E. Aguilar-Cordova, J. Pestaner, C. Langston, B. Mull, Y. Wang, A. L. Beudet, and B. Lee.** 1998. Toxicological comparison of E2a-deleted and first-generation adenoviral vectors expressing alpha1-antitrypsin after systemic delivery. *Hum. Gene Ther.* **9**:1587-1598.
127. **Oberste, M. S. and M. A. Gonda.** 1992. Conservation of amino-acid sequence motifs in lentivirus Vif proteins. *Virus Genes* **6**:95-102.
128. **Olmsted, R. A., V. M. Hirsch, R. H. Purcell, and P. R. Johnson.** 1989. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:8088-8092.
129. **Olsen, J. C.** 1998. Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. *Gene Ther.* **5**:1481-1487.
130. **Pages, J. C., N. Loux, D. Farge, P. Briand, and A. Weber.** 1995. Activation of Moloney murine leukemia virus LTR enhances the titer of recombinant retrovirus in psi CRIP packaging cells. *Gene Ther.* **2**:547-551.
131. **Pandya, S., K. Boris-Lawrie, N. J. Leung, R. Akkina, and V. Planelles.** 2001. Development of an Rev-independent, minimal simian immunodeficiency virus-derived vector system. *Hum. Gene Ther.* **12**:847-857.
132. **Papworth, C., Bauer J.C., J. Braman, and D. A. Wright.** 1996. Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies*3-4.
133. **Parks, R. J., L. Chen, M. Anton, U. Sankar, M. A. Rudnicki, and F. L. Graham.** 1996. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:13565-13570.
134. **Pedersen, N. C., E. W. Ho, M. L. Brown, and J. K. Yamamoto.** 1987. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* **235**:790-793.
135. **Peng, K. W. and S. J. Russell.** 1999. Viral vector targeting. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**:454-457.
136. **Phillips, T. R., C. Lamont, D. A. Konings, B. L. Shacklett, C. A. Hamson, P. A. Luciw, and J. H. Elder.** 1992. Identification of the Rev transactivation and Rev-responsive elements of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **66**:5464-5471.
137. **Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed.** 2001. Lipid rafts and pseudotyping. *J. Virol.* **75**:7175-7183.
138. **Plank, C., F. Scherer, U. Schillinger, C. Bergemann, and M. Anton.** 2003. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J. Liposome Res.* **13**:29-32.
139. **Plank, C., U. Schillinger, F. Scherer, C. Bergemann, J. S. Remy, F. Krotz, M. Anton, J. Lausier, and J. Rosenecker.** 2003. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol. Chem.* **384**:737-747.

140. **Poeschla, E. M., F. Wong-Staal, and D. J. Looney.** 1998. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* **4**:354-357.
141. **Quivy, V., E. Adam, Y. Collette, D. Demonte, A. Chariot, C. Vanhulle, B. Berkhout, R. Castellano, Y. de Launoit, A. Burny, J. Piette, V. Bours, and C. Van Lint.** 2002. Synergistic activation of human immunodeficiency virus type 1 promoter activity by NF-kappaB and inhibitors of deacetylases: potential perspectives for the development of therapeutic strategies. *J. Virol.* **76**:11091-11103.
142. **Radsak, K., R. Fuhrmann, R. P. Franke, D. Schneider, A. Kollert, K. H. Brucher, and D. Drenckhahn.** 1989. Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells. *Arch. Virol.* **107**:151-158.
143. **Reik, W., H. Weiher, and R. Jaenisch.** 1985. Replication-competent Moloney murine leukemia virus carrying a bacterial suppressor tRNA gene: selective cloning of proviral and flanking host sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**:1141-1145.
144. **Reiser, J.** 2000. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther.* **7**:910-913.
145. **Rettinger, S. D., S. C. Kennedy, X. Wu, R. L. Saylor, D. G. Hafenrichter, M. W. Flye, and K. P. Ponder.** 1994. Liver-directed gene therapy: quantitative evaluation of promoter elements by using in vivo retroviral transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:1460-1464.
146. **Sambrook, J. and E. F. & M. T. Fritsch.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
147. **Sanburn, N. and K. Cornetta.** 1999. Rapid titer determination using quantitative real-time PCR. *Gene Ther.* **6**:1340-1345.
148. **Sastry, L., T. Johnson, M. J. Hobson, B. Smucker, and K. Cornetta.** 2002. Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther.* **9**:1155-1162.
149. **Sauter, S. L. and M. Gasmi.** 2001. FIV vector systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* **26**:99-129.
150. **Schlegel, R., M. C. Willingham, and I. H. Pastan.** 1982. Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells. *J. Virol.* **43**:871-875.
151. **Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-529.
152. **Schwartz, A. L., S. E. Fridovich, B. B. Knowles, and H. F. Lodish.** 1981. Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *J. Biol. Chem.* **256**:8878-8881.
153. **Senter, P. D., P. C. Su, T. Katsuragi, T. Sakai, W. L. Cosand, I. Hellstrom, and K. E. Hellstrom.** 1991. Generation of 5-fluorouracil from 5-fluorocytosine by monoclonal antibody-cytosine deaminase conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2**:447-451.
154. **Shenk, T.** 1996., p. 2111-2148. *In* B. N. Fields, Knipe D.M., and P. M. Howley (eds.), *Fields Virology.* Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.

155. **Shin, N. H., D. Hartigan-O'Connor, J. K. Pfeiffer, and A. Telesnitsky.** 2000. Replication of lengthened Moloney murine leukemia virus genomes is impaired at multiple stages. *J. Virol.* **74**:2694-2702.
156. **Simons, K. and E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572.
157. **Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, and M. R. Boyd.** 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**:1107-1112.
158. **Somia, N. and I. M. Verma.** 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* **1**:91-99.
159. **Somia, N. V., M. Zoppe, and I. M. Verma.** 1995. Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to in vivo gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:7570-7574.
160. **Sparger, E. E., B. L. Shacklett, L. Renshaw-Gegg, P. A. Barry, N. C. Pedersen, J. H. Elder, and P. A. Luciw.** 1992. Regulation of gene expression directed by the long terminal repeat of the feline immunodeficiency virus. *Virology* **187**:165-177.
161. Spiegel, M. Etablierung und Charakterisierung eines pseudotypisierten retroviralen Gentransfer-Systems mit Selektivität für den Hepatocyten-spezifisch exprimierten Asialoglycoprotein-Rezeptor. 2000.
Ref Type: Thesis/Dissertation
162. **Spiegel, M., M. Bitzer, A. Schenk, H. Rossmann, W. J. Neubert, U. Seidler, M. Gregor, and U. Lauer.** 1998. Pseudotype formation of Moloney murine leukemia virus with Sendai virus glycoprotein F. *J. Virol.* **72**:5296-5302.
163. **Spieß, M.** 1990. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry* **29**:10009-10018.
164. **Springett, G. M., R. C. Moen, S. Anderson, R. M. Blaese, and W. F. Anderson.** 1989. Infection efficiency of T lymphocytes with amphotropic retroviral vectors is cell cycle dependent. *J. Virol.* **63**:3865-3869.
165. **Stitz, J., C. J. Buchholz, M. Engelstadter, W. Uckert, U. Bloemer, I. Schmitt, and K. Cichutek.** 2000. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273**:16-20.
166. **STOKER, M. and I. MACPHERSON.** 1964. SYRIAN HAMSTER FIBROBLAST CELL LINE BHK21 AND ITS DERIVATIVES. *Nature* **203**:1355-1357.
167. **Stone-Hulslander, J. and T. G. Morrison.** 1997. Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. *J. Virol.* **71**:6287-6295.
168. **Stone-Hulslander, J. and T. G. Morrison.** 1999. Mutational analysis of heptad repeats in the membrane-proximal region of Newcastle disease virus HN protein. *J. Virol.* **73**:3630-3637.

169. **Stuhlmann, H., R. Jaenisch, and R. C. Mulligan.** 1989. Construction and properties of replication-competent murine retroviral vectors encoding methotrexate resistance. *Mol. Cell Biol.* **9**:100-108.
170. **Summerford, C. and R. J. Samulski.** 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* **72**:1438-1445.
171. **Takimoto, T., G. L. Taylor, H. C. Connaris, S. J. Crennell, and A. Portner.** 2002. Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion. *J. Virol.* **76**:13028-13033.
172. **Talbott, R. L., E. E. Sparger, K. M. Lovelace, W. M. Fitch, N. C. Pedersen, P. A. Luciw, and J. H. Elder.** 1989. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:5743-5747.
173. **Tanaka, J., H. Sadanari, H. Sato, and S. Fukuda.** 1991. Sodium butyrate-inducible replication of human cytomegalovirus in a human epithelial cell line. *Virology* **185**:271-280.
174. **Tashiro, M., Y. Yokogoshi, K. Tobita, J. T. Seto, R. Rott, and H. Kido.** 1992. Tryptase Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J. Virol.* **66**:7211-7216.
175. **Tatum, E. L.** 1966. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect. Biol. Med.* **10**:19-32.
176. **Tomasi, M., C. Pasti, C. Manfrinato, F. Dallochio, and T. Bellini.** 2003. Peptides derived from the heptad repeat region near the C-terminal of Sendai virus F protein bind the hemagglutinin-neuraminidase ectodomain. *FEBS Lett.* **536**:56-60.
177. **Tomonaga, K., T. Miyazawa, J. Sakuragi, T. Mori, A. Adachi, and T. Mikami.** 1993. The feline immunodeficiency virus ORF-A gene facilitates efficient viral replication in established T-cell lines and peripheral blood lymphocytes. *J. Virol.* **67**:5889-5895.
178. **Tomonaga, K., J. Norimine, Y. S. Shin, M. Fukasawa, T. Miyazawa, A. Adachi, T. Toyosaki, Y. Kawaguchi, C. Kai, and T. Mikami.** 1992. Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. *J. Virol.* **66**:6181-6185.
179. **Towbin, H. and J. Gordon.** 1984. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J. Immunol. Methods* **72**:313-340.
180. **Treichel, U., K. H. Meyer zum Buschenfelde, R. J. Stockert, T. Poralla, and G. Gerken.** 1994. The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J. Gen. Virol.* **75 (Pt 11)**:3021-3029.
181. **Trinh, Q. T., E. A. Austin, D. M. Murray, V. C. Knick, and B. E. Huber.** 1995. Enzyme/prodrug gene therapy: comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res.* **55**:4808-4812.
182. **Veit, M., M. F. Schmidt, and R. Rott.** 1989. Different palmitoylation of paramyxovirus glycoproteins. *Virology* **168**:173-176.

183. **Verma, I. M. and M. D. Weitzman.** 2004. Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. *Annu. Rev. Biochem.*
184. **Vile, R. G., K. Sunassee, and R. M. Diaz.** 1998. Strategies for achieving multiple layers of selectivity in gene therapy. *Mol. Med. Today* **4**:84-92.
185. **Wagner, E., R. Kircheis, and G. F. Walker.** 2004. Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* **58**:152-161.
186. **Wang, H., M. P. Kavanaugh, R. A. North, and D. Kabat.** 1991. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* **352**:729-731.
187. **Wang, W. J., C. K. Tai, N. Kasahara, and T. C. Chen.** 2003. Highly efficient and tumor-restricted gene transfer to malignant gliomas by replication-competent retroviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **14**:117-127.
188. **Weiss, P., G. Ashwell, A. G. Morell, and R. J. Stockert.** 1994. Modulation of the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells: effect of glucose. *Hepatology* **19**:432-439.
189. **Weiss, R. A.** 2002. HIV receptors and cellular tropism. *IUBMB. Life* **53**:201-205.
190. **Wessels, H. P., I. Geffen, and M. Spiess.** 1989. A hepatocyte-specific basolateral membrane protein is targeted to the same domain when expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **264**:17-20.
191. **Whitwam, T., M. Peretz, and E. Poeschla.** 2001. Identification of a central DNA flap in feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **75**:9407-9414.
192. **Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, G. Urlaub, and L. Chasin.** 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**:1373-1376.
193. **Yago, H., Y. Kohgo, J. Kato, N. Watanabe, S. Sakamaki, and Y. Niitsu.** 1995. Detection and quantification of soluble asialoglycoprotein receptor in human serum. *Hepatology* **21**:383-388.
194. **Yamamoto, J. K., H. Hansen, E. W. Ho, T. Y. Morishita, T. Okuda, T. R. Sawa, R. M. Nakamura, and N. C. Pedersen.** 1989. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **194**:213-220.
195. **Yao, Q., X. Hu, and R. W. Compans.** 1997. Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. *J. Virol.* **71**:650-656.
196. **Yoshima, H., M. Nakanishi, Y. Okada, and A. Kobata.** 1981. Carbohydrate structures of HVJ (Sendai virus) glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **256**:5355-5361.
197. **Yu, S. F., T. von Ruden, P. W. Kantoff, C. Garber, M. Seiberg, U. Ruther, W. F. Anderson, E. F. Wagner, and E. Gilboa.** 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**:3194-3198.
198. **Zavada, J.** 1982. The pseudotypic paradox. *J. Gen. Virol.* **63 (Pt 1)**:15-24.

199. **Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau.** 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-185.

SeV-Fmut

1 atggcagcatatataccagaggtccacagtcacatctcaacatacactactggtgtctccacc
 1 M A A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T
 61 acattggtctcgtgctcagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
 21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D
 121 gaagggaatcactgaagatagctggatccacagatcgaggtacatagtagtgcata
 41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L
 181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagccaggttatccaagtaacaagagc
 61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S
 241 ctactgaacagctgtaataccatggaggtgctcttagatcttcaggaggtctcgata
 81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I
 301 actgtcaccatgatacagacacaatccggctcgctcagaagagattcttcggtgct
 101 T V T N D T T Q N A G R Q K R F F G A
 361 gtgattggtactatcgcaactggagtgccagatcagcacagatcaccgagggatgca
 121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
 421 ctgaccgaagcaggaggcccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaa
 141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K
 481 acacacaagtctatagaactgctgaaacgctgtgggggaacaaattctgctctaaag
 161 T H K S I E L P A N A V G E Q I L A L K
 541 acactccaggtttcgtgaatgagatcaaaccccaataagcgaattagctgtgag
 181 T L Q D F V N D E I K F A I S E L G C E
 601 actgctccttaagactgggtataaaattgacacagcattaccggctgttaactgog
 201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A
 661 ttcgctgaatttcggacacatcgagagaagagcctcagctgcagcgcgtctctca
 221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S
 721 cttaactctgatacaactagattgacacacaatcaggagcagctcaaacatc
 241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I
 781 tatgatgctttatacagacagatcaaaagcaggtgagatggtgctagagaga
 261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R
 841 tacatggtaccctgctggaagatccctattcttctgaagtcaccaggtgctcata
 281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I
 901 caaaggcactgcttattcttcaaacatagacggggaggaatggtatgactgtcccc
 301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P
 961 agccatatactcagctgctcttctttaggggtgcagacataaccgattggtgag
 321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E
 1021 tccagattgactatataccccaagggatccgcacaactgatacctgacaccagcaa
 341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q
 1081 aagtgtatctcggggacacacaaggtgctctgcacaaaagttggagacgcttacc
 361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I
 1141 cccaagttgcttttggatgggggctgttcttaactgcatagcatccaatgacc
 381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T
 1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggtcgtctcaaaaggtgtagtattcctaacc
 401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T
 1261 catgacaactggtgcttattaggtgcaatgggtgagattgctacaccggagagg
 421 H D N C G L I A G V N G V E L Y A N R R G
 1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctgctgcaattgctatcagacc
 441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P
 1381 gttgatattctcacaacttctgctgctacgaattctctgcaagactcaaggctgag
 461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E
 1441 cttgagaagcagcaaatcctctctgaggtagtaggtgtaacaactcaagagagact
 481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E T
 1501 gtgattacatagtagtattatgctgtaaatatgggtgctattatagtagctcact
 501 V I T I I V V M V V I L V V I I V I V I
 1561 gtgctttatagactcaaaaggtcaatgctaatgggtaatccagatgaccgtataccgag
 521 V L Y R L K R S M L M G N P D D R I P R
 1621 gacacatacattagagccgaagatcagacatgtacacaaacgggtggtttagtgcg
 541 D T Y T L E P K I R H M Y T N G G F D A
 1681 atggctgagaaaagatga
 561 M A E K R *

CD4 (human)

1 atgaacggggagtcctcttttagcacttctctggtgctgcaactggcgtctccca
 60 M N R G V P F R H L L L V L Q L A L L P
 61 gcagccactcaggaagaaggtgctgctgggcaaaaaggggatacagtggaactgacc
 80 A A T Q G K K V V L G K K G D T V E L T
 121 tgtacagcttcccagaagaagacatacaattccaactgaaaaaactcaaccagataag
 100 C T A S Q K K S I Q F H W K N S N Q I K
 181 atctgggaaatcagggtctcttcttaactaaaggtccaactcaagctgaatgatcgct
 120 I L G N Q G S F L T R K G P S K L N D R A
 241 gactcaagaagaagccttgggaccaaggaactccccctgatacagaatcttaag
 140 D S R R S L W D Q G N F P L I I K N L K
 301 atagaagactcagatcactcatctgtagtggaggaccagaagggaggtgcaattg
 160 I E D S D T Y I C E V E D Q K E E V Q L
 361 ctatggttcggatgactgcaactctgcaaccctcctcagggcagagctgacc
 180 L V F G L T A N S D T H L L Q G Q S L T
 421 ctgaccttggagagccccctgtagtaccctcagtcgaatgtagggtccaaggggt
 200 L T L E S P P G S S P S V Q C R S P R G
 481 aaaaacatacaggggggaagcctctcctgctcagctggagctccagatgagtg
 220 K N I Q G G K T L S V Q L E L Q D S G
 541 acctggacatgcaactgtcttgcagaaccagaaggtggagtcaaatagacatcgtg
 240 F W T C T V L Q N Q K K V E F K I D I V
 601 gtgctagctttccagaagcctccagcagctataagaagaagggggaacaggtggag
 260 V L A F Q K A S S I V Y K K E G E Q V E
 661 tctccttcccactgcttcaactgaaagctcagggcagtgagtgctgctggg
 280 F S F P L A F T V E K L T G S G E L W W
 721 cagggcagaggggtctcctcctcaagctctggatcacccttgcctgagacaagaa
 300 Q A E R A S S S K S W I T F D L K N K E
 781 gtgtctgtaaatgggtaccaggaacctcaagctcagatgggcaagctcccgctc
 320 V S V R W V T Q D P K L Q M G K K L P L
 841 cacctcaccctcccagggccttgcctcagtagtctgctcggaaacctcaccctggc
 340 H L T L P Q A L P Q Y A G S G N L T L A
 901 ctgaaagcaaaaacaggaaggtgcatcaaggtgaacctggtgtagtagagcact
 360 L E A K T G K L H Q E V N L V V M R A T
 961 cagctccagaaaaattgacctgaggtgggggaccacctcccccaagctgctg
 380 Q L Q K N L T C E V W G P T S P K L M L
 1021 agcttgaactggagaacaagggcaaaagctcgaagcgggagaagcgggtgaggg
 400 S L K L E N K E A K V S K R E K A V W V
 1081 ctgaacctgagggggatggtggcagtgctgctgagctcgggacagctcgtcgtg
 420 L N P E A G M W Q C L L S D S G Q V L L
 1141 gaatccaacataaggttctgcccacatgctccaccctggcaaccatggcctgatt
 440 E S N I K V L P T W S T P V Q P M A L I
 1201 gtgctggggcctgcccgcctcctgctttcattgggctaggaatctctctgctg
 460 V L G G V A G L L L F I G L G I F F C V
 1261 aggtcggcaccgaagggccaagcagagcggatgctcagatcagagactcctcag
 480 R C R H R R R Q A E R M S Q I K R L L S
 1321 gagaagaagcctgctgctcaccggttcagaagacatgtagccccattga
 500 E K K T C Q C P H R F Q K T C S P I *

VSV glykoprotein (strain Indiana)

1 atgaagtgcctttgtacttagcctttttattcattggggtgaattgcaagttcaccata
60 M K C L L Y L A F L F I G V N C K F T I
61 gttttccacacaacaaaaggaaactggaaatgttcttcaattaccattatgct
80 V F F H N Q K G N W K N V P S N Y H Y C
121 ccgtcaagctcagatttaattggcataatgacttaatagccacagcctacaagtcaaa
100 P S S S D L N W H N D L I G T A I Q V K
181 atgcccagagtcacaaggctattcaagcagcgggtggatgtgctgcttccaaatg
120 M P K S H K A I Q A D G W M C H A S R W
241 gtcactactgtgtattccgctggatggaccgaagtataatacacagtcacatccgatcc
140 V T T C D F R W Y G P K Y I T Q S I R S
301 ttcactccatctgtagaacaatgcaaggaaagcattgacaacaagaacgaagcattgg
160 F T F S V E Q C K E S I E Q T K Q G T W
361 ctgactcagccttccctcctcaagtgtggaatgcaactgtgacggatgccaaga
180 L N P G F P P Q S C G Y A T V T D A E A
421 gtgattgctcaggtgactcctcaccatgctggttgatgaatcacagaggaatgggt
200 V I V Q V T P H H V L V D E Y T G E W V
481 gattcacagttcatcaacggaaatgcaagcaatcatatgcccactgtccatcaactg
220 D S Q F I N G K C S N Y I C P T V H N S
541 acaactcgtcattctgactataagctcaaaaggctatgacttcaactcattccatg
240 T T W H S D Y K V K G L C D S N L I S M
601 gacatcacttctcagagcagcagatcatccctgggaaggaggccacaggg
260 D I T F F S E D G E L S S L G K E G T G
661 ttcagaagtaactcttctatgaactcagaagcagcctgcaaaatgcaatcagc
280 F R S N Y F A F E T G G K A C K M Q Y C
721 aagcattggggagtcacactccactcaggtgctgctgctgagatgctgataagatctc
300 K H W G V R L P S G V W F E M A D K D L
781 tttgctcagccagattccctgaatgcccagaaggtcaagatctctgctccatctcag
320 F A A A R F P E C P E G S S I S A P S Q
841 acctcagtgatgaagctcaatcaggcgttgagaggtctggatttccctctgc
340 T S V D V S L I Q D V E R I L D Y S L C
901 caagaacctggagcaaaatcagagcgggtctccaactcctccagtgatctcagctat
360 Q E T W S K I R A G L P I S P V D L S Y
961 cttgctcctaaaaaccaggaacggctgcttccaccataatcaatggtaccctaaaa
380 L A P K N P G T G P A F T I I N G T L K
1021 taactttgagaccagatacatcagagctgataatgctcctcctcctcaagaatgct
400 Y F E T R Y I R V D I A A P I L S R M V
1081 ggaatcagtggaactaccacagaaggaactgctggatgactggcaccatagaa
420 G M I S G T T T E R E L W D D W A P Y E
1141 gacgtgaaattgaccacatgagctgctgagcagcctgcaagataagtttccctta
440 D V E I G P N G V L R T S S G Y K F P L
1201 tacatgattggacatggtatgctgactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
460 Y M I G H G M L D S D L H L S S K A Q V
1261 ttcgaacatcctcactcagagcgtgcttgcactcctcctcctcctcctcctcctcct
480 F E H P H I Q D A A S Q L P D D E S L F
1321 tttggtgatactggcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
500 F G D T G L S K N P I E L V E G W F S S
1381 tggaaaagcctctatcctccttcttcttctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
520 W K S S I A S F F F I I G L I I G L F L
1441 gttctccagatggtatccatccttgcataaataaagcaccacaagaagacagat
540 V L R V G I H L C I K L K H T K R K Q I
1501 tatacagacatagatgaaccgacttggaaagtaa
560 Y T D I E M N R L G K *

FIV envelope (strain: Petaluma, clone: 34TF10)

1 atggcagaaggtttgcagccaatagacatgtaggactagaagaagctgaagagttta
60 M A E G F A A N R Q W I G L E E A E E L
61 ttgatattgatagcaacacaatgagtgagaagaccactaaatccaggagtaaac
80 L D F D I A T Q M S E E G P L N P G V N
121 ccatttagggtacctggataaacagaaaagaacaaactctgtaacattacaa
100 P F R V P G I T E K E K Q N Y C N I L Q
181 cctaagttacaagatctcaagcaagaatctcaagaggttaaaactggaagaagaatgca
120 P K L Q D L R N E I Q E V K L E E G N A
241 ggtaagtttagaagcaagatttttaaggtattctgtagaaggtgattgctccgtggt
140 G K F R R A R F L R Y S D E S V L S L V
301 catgcttcatagatattgtatatttttaggttaacgaataaagttaggatctttaaga
160 H A F I G Y C I Y L G N R N K L G S L R
361 catgacattgataagaagcaccacaagaaggtgtaataatagagaagaaggtaca
180 H D I D I E A P Q E E C Y N N R E K G T
421 actgacaataaaaatgtagacatgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
200 T D N I K Y G R R C C L G T V T L Y I
481 ttattataggaataataatatttccagacacccaacgctcaggtagttggaagct
220 L F I G I I I Y S Q T T N A Q V V W R L
541 ccacattagtagtcccagtagaagaatcagaataaattttggagttggtggcacc
240 P P L V V P V E E S E I I F W D C W A P
601 gaagaaccgctgctcaggaactttctgggcaatgatacctaaagctagaacaa
260 E E P A C Q D F L G A M I H L K A R T N
661 ataagatagcagagacactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
280 I S I R E G P T L G N W A R E I W A T L
721 tcaaaaagcctactagacaatgtagaagcagaatggaagaatggaatgagact
300 P K K A T R Q C R R G R I W K R W N E T
781 ataacagaccatcaggtgctgtaatacaacatgtaataatgctcagtaaatcct
320 I T G P S G C A N N T C Y N V S V I V P
841 gattatcagttatttagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
340 D Y Q C Y L D R V D T W L Q G K I N I S
901 ttatgctcagcaggaagaaatgtagacataaagttcaacaacatgtaagctattg
360 L C L T G G K M L Y N K V T K Q L S Y C
961 acagaccctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
380 T D P L Q I P L I N Y T F G P N Q T C M
1021 tggaaacttcaacaatcagaccctgaaatcaacaatggaatggaatggaatggaat
400 W N T S Q I Q D P E I P K C G W W N Q M
1081 gctattatacagttgtaaatggagagcaaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaat
420 A Y Y N S C K W E E A K V K F H C Q R T
1141 cagatcagcctgtagcattgtagagcaatctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
440 Q S Q P G S W F R A I S S W K R N R W
1201 gaggtagcagatgtagaagtaaaaggtgaaatctcctcagctcagtagcagcagca
460 E W R P D F E S K K V K I S L Q C N S T
1261 aaaaactaaccttgcagtagaagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
480 K N L T F A M R S S G D Y G E V T G A W
1321 atagattgtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
500 I E F G C H R N K S K L H A E A R F R I
1381 agatgtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
520 R C R W N V G S N T S L I D T C A G N T Q
1441 aaagttcagctcagcactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
540 K V S G A N P V D C T M Y S N K M Y N C
1501 tcttcaaaaaggggttacttagaagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
560 S L Q N G F T M K V D D L I M H F N M K
1561 aagctgtagaagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
580 K A V E M Y N I A G N W S C T S D L P S
1621 tcatggggtatagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
600 S W G Y M N C N C T N S S S S Y S G T K
1681 atggcatgctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcag
620 M A C P S N R G I L R N W Y N P V A G L
1741 cgaactccttagaacagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
640 R Q S L E Q Y Q V V K Q P D Y L V V P E
1801 gaagctaggaataaaacctagaaggaagggcagcattctcctcctcctcctcctcctcct
660 E V M E Y K P R R K R A A I H V M L A L
1861 gcagcagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
680 A A V L S I A G A C T G A T A I G M V T
1921 caatacccaagttctgcaacccatcaagaagctgtagaagaaggtgactgaagcctta
700 Q Y H Q V L A T H Q E A V E K V T E A L
1981 aagataacaactaagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
720 K I N N L R L V T L E H Q V L V I G L K
2041 gtagaagctaggaataatgtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtag
740 V E A M E K F L Y T A F A M Q E L G C N
2101 caaaaatcaattttctgcaaaatcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
760 Q N Q F F C K I P P E L W T R Y N M T I
2161 aatcaacaatggaatcaggaataataacttggggaatggtataaccaacaaaa
780 N Q T I W N H G N I T L G E W Y N Q T K
2221 gatttacacaagaattttatgaataaataagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcag
800 D L Q Q K F Y E I I M D I E Q N N V Q G
2281 aagaagggatcaacaatacaaaagtggaagattgggtagtagtagtagtagtagtagtag
820 K K G I Q Q L Q K W E D W V G W I G N I
2341 ccacaatatttaagggacttggaggtatttgggaatgagtagtagtagtagtagtagtag
840 P Q Y L K G E L G G I L G I G L G V L L
2401 ttgatttttagttactcactcctggtgattgataagaatgtagtagtagtagtagtagtag
860 L I L C L P T L V D C I R N C I H K I L

3.F-Chimäre

1 atgcagcatatataccagaggtccacagtgcatctcaacatacactactggtgttctcacc
 1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T

61 acattggtctcgtgtagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
 21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D

121 gaagggaaatcactgaagtagctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtactgata
 41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L

181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagcccaggttaccagtaacaagagc
 61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S

241 ctactgaacagctgtaataccatgagggatgctcttagatctccagggagctctgata
 81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I

301 actgtcaccaatgatagcacaacaaatgcccgtgtccacagtcgagattctcgggtct
 101 T V T N D T T Q N A G V P Q S R F F G A

361 gtgattggtactatcgcaactggagtgccagacatcagcagatcaccgagggattgca
 121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A

421 ctgcccgaagcggaggcccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaaa
 141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K

481 acacacaagtctatagaactgctgcaaacgctgtgggggacaacaaatcttctctaaag
 161 T H K S I E L Q N A V G E Q I L A L K

541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
 181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E

601 actgctgcttaagactgggtataaaattgacacagcattaccgggctgttaactgog
 201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A

661 ttccgctgaatttcggaaacctggagagaagagcctcagctgcagggcgtctctca
 221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S

721 ctctactctgtaacattactgagattgacacaaatcaggacagggcagctcaacatc
 241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I

781 tatgatgctatttatacagaacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
 261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R

841 tacatggtaccctgctggaagatccctattctctgaagtcaccaggtgtgctcata
 281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I

901 cacaaagcactgcttattcttacaacatagacggggaggaatggtatgactgtcccc
 301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P

961 agccatatactcagctgctctctcttagggggcgagacataaccgattggtgtgag
 321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E

1021 tccagattgactatataatgcccagggatcccgcacaactgatcctgacagccagcaa
 341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q

1081 aagtgtatctctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttgggacagcctatc
 361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I

1141 cccaagtttcttttggatgggggctgtgttcttaactgcatagatccaatgtacc
 381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T

1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggatcgctcaaaaggtgtagtattcctaacc
 401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T

1261 catgacaactgtggtcttataggtgctcaatgggtgagattgtagtctaacccggaggg
 421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G

1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctcgctcgaattgctatcagacc
 441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P

1381 gttgatattctctcaacctgctgactgactcaatctctgcaagactcaaggctgag
 461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E

1441 cttgagaagcagcgaataatcctctcaggtgagtagtggtacaactcaagagagagc
 481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E T

1501 ctattggagatctctgggaataggatgattatattgatttatgatttaccct
 501 L L G G I L G I G L G V L L L I L C L P

1561 acattggttattgataagaattgtatccacaagatactagatcacacagtaattgca
 521 T L V D C I R N C I H K I L G Y T V I A

1621 atgctgaagtgaaggaagaataacaaccacaatggaatgaggagaatggtagg
 541 M P E V E G E E I Q P Q M E L R R N G R

1681 caatgtggcatgctgaaaagaggaggaatga
 561 Q C G M S E K E E *

4.F-Chimäre

1 atgcagcatatataccagaggtccacagtgcatctcaacatacactactggtgttctcacc
 1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T

61 acattggtctcgtgtagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
 21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D

121 gaagggaaatcactgaagtagctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtactgata
 41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L

181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagcccaggttaccagtaacaagagc
 61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S

241 ctactgaacagctgtaataccatgagggatgctcttagatctccagggagctctgata
 81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I

301 actgtcaccaatgatagcacaacaaatgcccgtgtccacagtcgagattctcgggtct
 101 T V T N D T T Q N A G V P Q S R F F G A

361 gtgattggtactatcgcaactggagtgccagacatcagcagatcaccgagggattgca
 121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A

421 ctgcccgaagcggaggcccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaaa
 141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K

481 acacacaagtctatagaactgctgcaaacgctgtgggggacaacaaatcttctctaaag
 161 T H K S I E L Q N A V G E Q I L A L K

541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
 181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E

601 actgctgcttaagactgggtataaaattgacacagcattaccgggctgttaactgog
 201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A

661 ttccgctgaatttcggaaacctggagagaagagcctcagctgcagggcgtctctca
 221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S

721 ctctactctgtaacattactgagattgacacaaatcaggacagggcagctcaacatc
 241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I

781 tatgatgctatttatacagaacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
 261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R

841 tacatggtaccctgctggaagatccctattctctgaagtcaccaggtgtgctcata
 281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I

901 cacaaagcactgcttattcttacaacatagacggggaggaatggtatgactgtcccc
 301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P

961 agccatatactcagctgctctctcttagggggcgagacataaccgattggtgtgag
 321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E

1021 tccagattgactatataatgcccagggatcccgcacaactgatcctgacagccagcaa
 341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q

1081 aagtgtatctctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttgggacagcctatc
 361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I

1141 cccaagtttcttttggatgggggctgtgttcttaactgcatagatccaatgtacc
 381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T

1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggatcgctcaaaaggtgtagtattcctaacc
 401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T

1261 catgacaactgtggtcttataggtgctcaatgggtgagattgtagtctaacccggaggg
 421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G

1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctcgctcgaattgctatcagacc
 441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P

1381 gttgatattctctcaacctgctgactgactcaatctctgcaagactcaaggctgag
 461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E

1441 cttgagaagcagcgaataatcctctcaggtgagtagtggtacaactcaagagagagc
 481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E T

1501 gtgattacgatcattgattgattgattgattgattgattgattgattgattgattgattc
 501 V I T I I V V M V M V I I L V V I I V I V I

1561 gtgctttatgattgataagaattgtatccacaagatactagatcacacagtaattgca
 521 V L Y D C I R N C I H K I L G Y T V I A

1621 atgctgaagtgaaggaagaataacaaccacaatggaatgaggagaatggtagg
 541 M P E V E G E E I Q P Q M E L R R N G R

1681 caatgtggcatgctgaaaagaggaggaatga
 561 Q C G M S E K E E *

5.F-Chimäre

1 atgcagcatatataccagaggtccacagtcacatctcaacatacactactggtgtctccacc
1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T
61 acattggtctcgtgtagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D
121 gaagggaaatcactgaagtagctggatcccaacgaatcgaggtacatagtagtactgacta
41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L
181 gttccggggtagaccttgagaatgggtcggaacagccaggttaccagtaacaagagc
61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S
241 ctactgaacagctgtaataccatgagggatgctcttagatctccaggagctctgata
81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I
301 actgtcaccaatgatacagacacaaaatcgcggtttccacagtcgagattctcgggtct
101 T V T N D T T Q N A G V P Q S R F F G A
361 gtgattggtactatcgcaacttgaggtggcgacatcagcacagatcaccgagggattgca
121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
421 ctgcccgaagcaggaggccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaaa
141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K
481 acacacaagtctatagaactgctgcaaacgctgtgggggacaaaatcttctcctaaag
161 T H K S I E L L Q N A V G E Q I L A L K
541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E
601 actgctgcttaagactgggtataaaaattgacacagcattactccggctgttaactgog
201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A
661 ttccgctgaatttcggaaacctggagagaagagcctcagctgcagcggctgtcttca
221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S
721 cttaactctgtaacattactgagattgacacacacagcagcagctcctaaactc
241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I
781 tatgatgctatttatacagacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R
841 tacatggttaccctgctggaagatccctattcttctgaagtcaccaggtgtgctcata
281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I
901 caaaggtcctcttattcttcaaacatagacggggaggaatggtatgtagtctcccc
301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P
961 agccataactcagctgctcttcttcttaggggtgcagacataaccgattggttgag
321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E
1021 tccagattgactatataatgcccagggatcccgcaactgatacctgacagccagcaa
341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q
1081 aagtgtatcctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttgagcagccttacc
361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I
1141 cccaagttgcttttggatgggggctgttcttaactgcatagatcccaatgacc
381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T
1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggtcgtctaaaggtgtagtattcctaacc
401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T
1261 catgacaactggtgcttataggtgctcaatgggtgagattgtagtaccagggaggg
421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G
1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctcgtcctgcaattgctatcagacc
441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P
1381 gttgatattctctcaacttctgtagctgacgaattctctgcaagactcaagctgag
461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E
1441 cttgagaagcagcgaataatcctctctgaggtagtagtggtaacaactcaagagagatg
481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E M
1501 gcccattgctgctgggggctcggcggcctctctctttcattggcctaggcattctc
501 A L I V L G G V A G L L L F I G L G I F
1561 ttcgagttggtatccatcttggcattaaataaagcacaccaaaaagacagattat
521 F R V G I H L C I K L K H T K K R Q I Y
1621 acagacatagatgaaccgacttggaaagtaa
541 T D I E M N R L G K *

6.F-Chimäre

1 atgcagcatatataccagaggtccacagtcacatctcaacatacactactggtgtctccacc
1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T
61 acattggtctcgtgtagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D
121 gaagggaaatcactgaagtagctggatcccaacgaatcgaggtacatagtagtactgacta
41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L
181 gttccggggtagaccttgagaatgggtcggaacagccaggttaccagtaacaagagc
61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S
241 ctactgaacagctgtaataccatgagggatgctcttagatctccaggagctctgata
81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I
301 actgtcaccaatgatacagacacaaaatcgcggtttccacagtcgagattctcgggtct
101 T V T N D T T Q N A G V P Q S R F F G A
361 gtgattggtactatcgcaacttgaggtggcgacatcagcacagatcaccgagggattgca
121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
421 ctgcccgaagcaggaggccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaaa
141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K
481 acacacaagtctatagaactgctgcaaacgctgtgggggacaaaatcttctcctaaag
161 T H K S I E L L Q N A V G E Q I L A L K
541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E
601 actgctgcttaagactgggtataaaaattgacacagcattactccggctgttaactgog
201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A
661 ttccgctgaatttcggaaacctggagagaagagcctcagctgcagcggctgtcttca
221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S
721 cttaactctgtaacattactgagattgacacacacagcagcagctcctaaactc
241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I
781 tatgatgctatttatacagacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R
841 tacatggttaccctgctggaagatccctattcttctgaagtcaccaggtgtgctcata
281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I
901 caaaggtcctcttattcttcaaacatagacggggaggaatggtatgtagtctcccc
301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P
961 agccataactcagctgctcttcttcttaggggtgcagacataaccgattggttgag
321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E
1021 tccagattgactatataatgcccagggatcccgcaactgatacctgacagccagcaa
341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q
1081 aagtgtatcctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttgagcagccttacc
361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I
1141 cccaagttgcttttggatgggggctgttcttaactgcatagatcccaatgacc
381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T
1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggtcgtctaaaggtgtagtattcctaacc
401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T
1261 catgacaactggtgcttataggtgctcaatgggtgagattgtagtaccagggaggg
421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G
1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctcgtcctgcaattgctatcagacc
441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P
1381 gttgatattctctcaacttctgtagctgacgaattctctgcaagactcaagctgag
461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E
1441 cttgagaagcagcgaataatcctctctgaggtagtagtggtaacaactcaagagagatg
481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E M
1501 gcccattgctgctgggggctcggcggcctctctctttcattggcctaggcattctc
501 A L I V L G G V A G L L L F I G L G I F
1561 ttcgagttggtatccatcttggcattaaataaagcacaccaaaaagacagattat
521 F D C I R N C I H K I L G Y T V I A M P
1621 gaagtgaaggaagaataacaaccacaatggaattgaggagaatggtaggaatg
541 E V E G E E I Q P Q M E L R R N G R Q C
1681 ggcagctgtaaaaagaggaggaatga
561 G M S E K E E E *

1.Fmut-Chimäre

1 atgcagcatatataccagaggtccacagtgcatctcaacatacactactggtgttctcacc
1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T
61 acattggttctcgttcagattcccagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D
121 gaagggaaatcactgaagatagctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtactgacta
41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L
181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagcccaggttaccagtaacaagagc
61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S
241 ctactgaacagctgtaataccatggaggtgctcttagatcttcaggaggtctctgata
81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I
301 actgtcaccatgatagcagacacaaaatccgggtctctctgacgactcttcgggtct
101 T V T N D T T Q N A G S L L T T F F G A
361 gtgattggtactatcgcaactggatggcgacatcagcagatcaccgagggattgca
121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
421 ctgcccgaagcggaggccaaaagagacatagcgtctcaaaagatcgatgacaaaa
141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K
481 acacacaagtctatagaactgctgaaacgctgtgggggacaaaatcttgcctctaaag
161 T H K S I E L L Q N A V G E Q I L A L K
541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E
601 actgctgcttaagactgggtataaaattgacacagcattactccggctgttaactgog
201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A
661 ttccgctgaatttcggaacatcggagagaagagcctcagctgacggcgtctctca
221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S
721 cttaactctgtaacattactgagattatgacacacatcaggacagggcagctcaacatc
241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I
781 tatgatgctattatagacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R
841 tacatggtaccctgctggaagatccctattcttgaagtcaccaggtgtgctcata
281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I
901 caaaggcatcgtctattcttcaacatagacggggaggaatggtatgactgtcccc
301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P
961 agccataactcagctgctctcttcttaggggtgacagacataaccgattggtgag
321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E
1021 tccagattgactatataatgcccagggatcccgcacaactgatacctgacagccagcaa
341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q
1081 aagtgtatcctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttggagacgcttctc
361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I
1141 cccaagtttcttttggatgggggctgttcttaactgcatagatccaatgacc
381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T
1201 tgcgggacagccgaagaccaatcagtcaggatcgctcaaaaggtgtagtattcctaacc
401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T
1261 catgacaactggtgcttataggtgctcaatgggtgagattgtatgtaaccggaggg
421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G
1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctgctgcaattgctatcagacc
441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P
1381 gttgatattctctcaactctgctgactgactcaatctctgcaagactcctgaagctgag
461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E
1441 cttgagaagcagcaaaatcctctctgaggtagtagtggtaacaactcaagagagaa
481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E K
1501 agctctatgctctttttcttctatcaggtgtaatactggaactatcttggtctc
501 S S I A S F F I I G L I I G L F L V L
1561 cgagttggtatccatcttgcattaaataaagcacacaaagaaagacagattatataca
521 R V G I H L C I K L K H T K K R Q I Y T
1621 gacatagagatgaaccgacttggaaagtaa
541 D I E M N R L G K *

2.Fmut-Chimäre

1 atgcagcatatataccagaggtccacagtgcatctcaacatacactactggtgttctcacc
1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T
61 acattggttctcgttcagattcccagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D
121 gaagggaaatcactgaagatagctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtactgacta
41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L
181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagcccaggttaccagtaacaagagc
61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S
241 ctactgaacagctgtaataccatggaggtgctcttagatcttcaggaggtctctgata
81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I
301 actgtcaccatgatagcagacacaaaatccgggtctctctgacgactcttcgggtct
101 T V T N D T T Q N A G R R Q K R F F G A
361 gtgattggtactatcgcaactggatggcgacatcagcagatcaccgagggattgca
121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
421 ctgcccgaagcggaggccaaaagagacatagcgtctcaaaagatcgatgacaaaa
141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K
481 acacacaagtctatagaactgctgaaacgctgtgggggacaaaatcttgcctctaaag
161 T H K S I E L L Q N A V G E Q I L A L K
541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E
601 actgctgcttaagactgggtataaaattgacacagcattactccggctgttaactgog
201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A
661 ttccgctgaatttcggaacatcggagagaagagcctcagctgacggcgtctctca
221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S
721 cttaactctgtaacattactgagattatgacacacatcaggacagggcagctcaacatc
241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I
781 tatgatgctattatagacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R
841 tacatggtaccctgctggaagatccctattcttgaagtcaccaggtgtgctcata
281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I
901 caaaggcatcgtctattcttcaacatagacggggaggaatggtatgactgtcccc
301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P
961 agccataactcagctgctctcttcttaggggtgacagacataaccgattggtgag
321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E
1021 tccagattgactatataatgcccagggatcccgcacaactgatacctgacagccagcaa
341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q
1081 aagtgtatcctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttggagacgcttctc
361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I
1141 cccaagtttcttttggatgggggctgttcttaactgcatagatccaatgacc
381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T
1201 tgcgggacagccgaagaccaatcagtcaggatcgctcaaaaggtgtagtattcctaacc
401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T
1261 catgacaactggtgcttataggtgctcaatgggtgagattgtatgtaaccggaggg
421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G
1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctgctgcaattgctatcagacc
441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P
1381 gttgatattctctcaactctgctgactgactcaatctctgcaagactcctgaagctgag
461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E
1441 cttgagaagcagcaaaatcctctctgaggtagtagtggtaacaactcaagagagaa
481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E T
1501 gtgattacgatcagtagtattggtgctaatatggtgctcattatgactgactcctc
501 V I T I I V V M V M V I I L V V I I V I V I
1561 gtgctttatcgagttggtatccatcttgcattaaataaagcacacaaagaaagacag
521 V L Y R V G I H L C I K L K H T K K R Q
1621 atttatacagacatagagatgaaccgacttggaaagtaa
541 I Y T D I E M N R L G K *

3. Fmut-Chimäre

1 atgcagcatatataccagaggtccacagtgcatctcaacatacactactggtgttctcacc
1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T
61 acattggtctcgtgtagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D
121 gaagggaaatcactgaagtagctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtactgacta
41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L
181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagcccaggttaccagtaacaagagc
61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S
241 ctactgaacagctgtaataccatggaggtgctcttagatctccaggagctctgata
81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I
301 actgtcaccatgatagcagacacaaaatccggctgctcagaagagattctcgggtct
101 T V T N D T T Q N A G R R Q K R F F G A
361 gtgattggtactatcgcaactggaggtggcagatcagcagatcaccgagggattgca
121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
421 ctgcccgaagcggaggccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaaa
141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K
481 acacacaagtctatagaactgctgcaaacgctgtgggggacaaaatcttctcctaaag
161 T H K S I E L Q N A V G E Q I L A L K
541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E
601 actgctgcttaagactgggtataaaattgacacagcattaccggctgtaactgog
201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A
661 ttccgctgaatttcggaaacctggagagaagacctcagctgacggcgtctctca
221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S
721 ctctactctgtaacattactgagattatgacacaaatcaggacagggcagctcaacatc
241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I
781 tatgatgctatttatacagaacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R
841 tacatggtaccctgctggaagatccctattcttctgaagtcaccaggtgtgctcata
281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I
901 caaagcactgctctattcttcaaacatagacggggaggaatggtatgactgtcccc
301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P
961 agccatatactcagctgctctcttcttaggggtgacagacataaccgattggtgtgag
321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E
1021 tccagattgactatataatgcccagggatcccgcacaactgatacctgacagccagcaa
341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q
1081 aagtgtatctctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttggagacgcttacc
361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I
1141 cccaagttgcttttggatgggggctgtgtgtaactgcatagatcccaatgacc
381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T
1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggatcgctcaaaaggtgtagtattcctaacc
401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T
1261 catgacaactgtggtcttataggtgctcaatgggtgagaattgtatgtaaccggagagg
421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G
1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctgctgcaattgctatcagacc
441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P
1381 gttgatattctctcaacctgctgactgactgacttcttgcgaagactcaaggctgag
461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E
1441 cttgagaagcagcgaataatcctctcaggtgagtagtggtacaactcaagagagagc
481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E T
1501 ctattggaggtatcttgggaataggatgattatattgatttatgatttaccct
501 L L G G I L G I G L G V L L L I L C L P
1561 acattggttattgataagaattgtatccacaagatactagatcacacagtaattgca
521 T L V D C I R N C I H K I L G Y T V I A
1621 atgctgaagtagaaggagaagaatacaaccacaatggaattgaggagaatggtagg
541 M P E V E G E E I Q P Q M E L R R N G R
1681 caatgtggcatgctgaaaagaggaggaatga
561 Q C G M S E K E E *

4. Fmut-Chimäre

1 atgcagcatatataccagaggtccacagtgcatctcaacatacactactggtgttctcacc
1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T
61 acattggtctcgtgtagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D
121 gaagggaaatcactgaagtagctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtactgacta
41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L
181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagcccaggttaccagtaacaagagc
61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S
241 ctactgaacagctgtaataccatggaggtgctcttagatctccaggagctctgata
81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I
301 actgtcaccatgatagcagacacaaaatccggctgctcagaagagattctcgggtct
101 T V T N D T T Q N A G R R Q K R F F G A
361 gtgattggtactatcgcaactggaggtggcagatcagcagatcaccgagggattgca
121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
421 ctgcccgaagcggaggccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaaa
141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K
481 acacacaagtctatagaactgctgcaaacgctgtgggggacaaaatcttctcctaaag
161 T H K S I E L Q N A V G E Q I L A L K
541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E
601 actgctgcttaagactgggtataaaattgacacagcattaccggctgtaactgog
201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A
661 ttccgctgaatttcggaaacctggagagaagacctcagctgacggcgtctctca
221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S
721 ctctactctgtaacattactgagattatgacacaaatcaggacagggcagctcaacatc
241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I
781 tatgatgctatttatacagaacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R
841 tacatggtaccctgctggaagatccctattcttctgaagtcaccaggtgtgctcata
281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I
901 caaagcactgctctattcttcaaacatagacggggaggaatggtatgactgtcccc
301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P
961 agccatatactcagctgctctcttcttaggggtgacagacataaccgattggtgtgag
321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E
1021 tccagattgactatataatgcccagggatcccgcacaactgatacctgacagccagcaa
341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q
1081 aagtgtatctctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttggagacgcttacc
361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I
1141 cccaagttgcttttggatgggggctgtgtgtaactgcatagatcccaatgacc
381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T
1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggatcgctcaaaaggtgtagtattcctaacc
401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T
1261 catgacaactgtggtcttataggtgctcaatgggtgagaattgtatgtaaccggagagg
421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G
1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctgctgcaattgctatcagacc
441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P
1381 gttgatattctctcaacctgctgactgactgacttcttgcgaagactcaaggctgag
461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E
1441 cttgagaagcagcgaataatcctctcaggtgagtagtggtacaactcaagagagagc
481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E T
1501 gtgattacgatcatagtagtattggtgataatggtgctcattatgattgattcctc
501 V I T I I V V M V V I L V V I I V I V I
1561 gtgcttatgattgataagaattgtatccacaagatactagatcacacagtaattgca
521 V L Y D C I R N C I H K I L G Y T V I A
1621 atgctgaagtagaaggagaagaatacaaccacaatggaattgaggagaatggtagg
541 M P E V E G E E I Q P Q M E L R R N G R
1681 caatgtggcatgctgaaaagaggaggaatga
561 Q C G M S E K E E *

5. Fmut-Chimäre

1 atgacagcatatccagaggtccacagtgcatctcaacatacactactggtgtctccacc
 1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T

61 acattggtctcgtgtagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
 21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D

121 gaagggaaatcactgaagtagctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtactgata
 41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L

181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagcccaggttaccagtaacaagagc
 61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S

241 ctactgaacagctgtaataccatgagggatgctcttagatctccagggagctctgata
 81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I

301 actgtcaccatgatagcagacacaaaatccggctcgtcgtcagaagagattctcgggtct
 101 T V T N D T T Q N A G R R Q K R F F G A

361 gtgattggtactatcgcaacttggagtgggacatcagcagatcaccgagggattgca
 121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A

421 ctgcccgaagcaggaggccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaaa
 141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K

481 acacacaagtctatagaactgctgcaaacgctgtgggggacaaaatcttctcctaaag
 161 T H K S I E L L Q N A V G E Q I L A L K

541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
 181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E

601 actgctgccttaagactgggtataaaaattgacacagcattactccggctgttaactgog
 201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A

661 ttccgctgaatttcggaaacctcggagagaagagcctcagctcagcggctgctctca
 221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S

721 ctctactctgtaacattactgagattgacacacaaatcaggacagggcagctcaaacatc
 241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I

781 tatgatgctatttatacagacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
 261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R

841 tacatggtaccctgctcgtgaagatccctattctctgaagtcaccaggtgtgctcata
 281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I

901 caaaggtcctcttattcttacaacatagacggggaggaatggtatgtaactgtcccc
 301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P

961 agccataactcagctgctctcttcttagggggtgacagacataaccgattggttgag
 321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E

1021 tccagattgacctatataatgcccagggatcccgcacaactgatacctgacagccagcaa
 341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q

1081 aagtgtatcctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttgagacagcctatc
 361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I

1141 cccaagtttcttttggatgggggctgtgttcttaactgcatagatccaatgtacc
 381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T

1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggatcgtctaaaggtgtagtattcctaacc
 401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T

1261 catgacaactgtggtcttataggtgtcaatgggtgagattgtatgtaaccggagagg
 421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G

1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctcgtcctgcaattgctatcagacc
 441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P

1381 gttgatattctctcaacttctgtagctacgaattctctgcaagactcctgaagctgag
 461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E

1441 cttgagaagcagcgaataatcctctctgaggtagtagtgtaacaactcaagagagatg
 481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E M

1501 gccctgattgctgggggctcggccgctcctctctttcattggcctaggcattctc
 501 A L I V L G G V A G L L L F I G L G I F

1561 ttccgagttggtatccatcttggcattaaataaagcaccacaaagaaagacagattat
 521 F R V G I H L C I K L K H T K K R Q I Y

1621 acagacatagatgaaccgacttggaaagtaa
 541 T D I E M N R L G K *

6. Fmut-Chimäre

1 atgacagcatatccagaggtccacagtgcatctcaacatacactactggtgtctccacc
 1 M T A Y I Q R S Q C I S T S L L V V L T

61 acattggtctcgtgtagattccaagggatagctctcaacataggggtcatagtcgat
 21 T L V S C Q I P R D R L S N I G V I V D

121 gaagggaaatcactgaagtagctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtactgata
 41 E G K S L K I A G S H E S R Y I V L S L

181 gttccggggtagacctgagaatgggtcggaacagcccaggttaccagtaacaagagc
 61 V P G V D L E N G C G T A Q V I Q Y K S

241 ctactgaacagctgtaataccatgagggatgctcttagatctccagggagctctgata
 81 L L N R L L I P L R D A L D L Q E A L I

301 actgtcaccatgatagcagacacaaaatccggctcgtcgtcagaagagattctcgggtct
 101 T V T N D T T Q N A G R R Q K R F F G A

361 gtgattggtactatcgcaacttggagtgggacatcagcagatcaccgagggattgca
 121 V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A

421 ctgcccgaagcaggaggccaaaagagacatagcctcatcaagaatcgatgacaaaa
 141 L A E A R E A K R D I A L I K E S M T K

481 acacacaagtctatagaactgctgcaaacgctgtgggggacaaaatcttctcctaaag
 161 T H K S I E L L Q N A V G E Q I L A L K

541 acactccaggtattcgtgaatgatgagatcaaacccgcaataagcgaattaggctgtgag
 181 T L Q D F V N D E I K P A I S E L G C E

601 actgctgccttaagactgggtataaaaattgacacagcattactccggctgttaactgog
 201 T A A L R L G I K L T Q H Y S G L L T A

661 ttccgctgaatttcggaaacctcggagagaagagcctcagctcagcggctgctctca
 221 F G S N F G T I G E K S L T L Q A L S S

721 ctctactctgtaacattactgagattgacacacaaatcaggacagggcagctcaaacatc
 241 L Y S A N I T E I M T I R T G Q S N I

781 tatgatgctatttatacagacagatcaaaagcaggtgatagatggtgatagagaga
 261 Y D V I Y T E Q I K G T V I D V D L E R

841 tacatggtaccctgctcgtgaagatccctattctctgaagtcaccaggtgtgctcata
 281 Y M V T L S V K I P I L S E V P G V L I

901 caaaggtcctcttattcttacaacatagacggggaggaatggtatgtaactgtcccc
 301 H K A S S I S Y N I D G E E W Y V T V P

961 agccataactcagctgctctcttcttagggggtgacagacataaccgattggttgag
 321 S H I L S R A S F L G G A D I T D C V E

1021 tccagattgacctatataatgcccagggatcccgcacaactgatacctgacagccagcaa
 341 S R L T Y I C P R D P A Q L I P D S Q Q

1081 aagtgtatcctgggggacacacaaggtgctctgacaaaagttgagacagcctatc
 361 K C I L G D T T R C P V T K V V D S L I

1141 cccaagtttcttttggatgggggctgtgttcttaactgcatagatccaatgtacc
 381 P K F A F V N G G V V A N C I A S T C T

1201 tgcgggacagccgaagccaatcagtcaggatcgtctaaaggtgtagtattcctaacc
 401 C G T G R R P I S Q D R S K G V V F L T

1261 catgacaactgtggtcttataggtgtcaatgggtgagattgtatgtaaccggagagg
 421 H D N C G L I G V N G V E L Y A N R R G

1321 cacgatgccacttgggggtccagaactgacagctcgtcctgcaattgctatcagacc
 441 H D A T W G V Q N L T V G P A I A I R P

1381 gttgatattctctcaacttctgtagctacgaattctctgcaagactcctgaagctgag
 461 V D I S L N L A D A T N F L Q D S K A E

1441 cttgagaagcagcgaataatcctctctgaggtagtagtgtaacaactcaagagagatg
 481 L E K A R K I L S E V G R W Y N S R E M

1501 gccctgattgctgggggctcggccgctcctctctttcattggcctaggcattctc
 501 A L I V L G G V A G L L L F I G L G I F

1561 ttcgattgtataagaattgtatccacaagatacagtagacacagtaattgcaatgctc
 521 F D C I R N C I H K I L G Y T V I A M P

1621 gaagtgaaggaagaatacaaccacaatggaattgaggagaatggtggaatg
 541 E V E G E E I Q P Q M E L R R N G R Q C

1681 ggcagctgtaaaaagaggaggaatga
 561 G M S E K E E E *

Abkürzungsverzeichnis

5-FC	5-Fluor-Cytosin
5-FU	5-Fluor-Uracil
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Ad	Adenovirus
ASGP-R	Asialoglykoprotein-Rezeptor
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CD	bakterielle Cytosin Deaminase
cDNA	Komplementäre DNA
cfu	<i>colony forming unit</i>
CMV	Cytomegalovirus
cppt	central polypurine tract
cts	central termination sequence
DMEM	Dublecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSRed	<i>Discosoma coral</i> red
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
ECACC	<i>European Collection of Animal Cell Cultures</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EIAV	<i>Equine Infectious Anemia Virus</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FIV	Felines Immundefizienz Virus
F-Protein	Fusionsprotein des SeV
G418	Geneticin (ein Neomycin-Analogen)
HA	Hämagglutination
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HFV	<i>Human Foamy Virus</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase Protein des SeVV
HSV-1 TK	Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidin Kinase
IPA	Immunperoxidase Assay
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MBG	Marburg Virus
MEM	Minimal essential medium
MOI	Multiplicity of infection
MoMLV	Moloney Maus Leukämie Virus
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RCR	replikationskompetentes Retrovirus
RDR	replikationsdefizientes Retrovirus
RRE	<i>rev response element</i>
RT	Reverse Transkription
RTQ-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
SAP	Alkalische Phosphatase aus Tiefseegarnelen
SRB	Sulforhodamin B
SeV	Sendai Virus
SIV	Simian Immundefizienz Virus
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TB-Medium	Terrific-broth-Medium
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure (trichloro acetic acid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
vif	<i>viral infectivity factor</i>
VSV	Vesikuläres Stromatitis Virus
WT	Wildtyp
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside
YCD	Cytosin Deaminase der Hefe
YUPRT	Uracilphosphoribosyltransferase der Hefe

7.2 Firmenverzeichnis

Abbott, Wiesbaden, BR Deutschland
Air Liquide-D.M.C., Marne-la-Vallée, Frankreich
Amersham Buchler, Braunschweig, BR Deutschland
Appligene Oncor, Heidelberg, BR Deutschland
Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, BR Deutschland
Beckman Instruments GmbH, München, BR Deutschland
Becton Dickinson and Company, Oxnard CA, USA
Bio 101 Inc., Vista CA, USA
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BR Deutschland
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BR Deutschland
B. Braun AG, Melsungen, BR Deutschland
Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, BR Deutschland
Charles River, Sulzfeld, BR Deutschland
Clean Air, Woerden, Niederlande
Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, BR Deutschland
Costar GmbH, Bodenheim, BR Deutschland
Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf, BR Deutschland
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BR Deutschland
Fedegari Autoclavi SPA, Albuzzano PV, Italien
Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm, BR Deutschland
FMC BioProducts, Rockland ME, USA
Forma Scientific, Division of Mallinckrodt Inc., Marietta OH, USA
Fresenius AG, Bad Homburg, BR Deutschland
Greiner Kunststoffwerke GmbH, Nürtingen, BR Deutschland
Heraeus GmbH, Hanau, BR Deutschland
Invitrogen, Groningen, Niederlande
E. Merck, Darmstadt, BR Deutschland
Millipore GmbH, Eschborn, BR Deutschland
New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA
New England Biolabs, Schwalbach/Taunus, BR Deutschland
Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Olympus Optical Co. (Europa) GmbH, Hamburg, BR Deutschland
Owl Scientific Inc., Woburn MA, USA
Pharmacia Biotech, Freiburg, BR Deutschland
Polaroid Corporation, Cambridge MA, USA
Qiagen GmbH, Hilden, BR Deutschland
Roche, Mannheim, BR Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BR Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht, BR Deutschland
Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, BR Deutschland
Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, BR Deutschland
Stratagene, La Jolla CA, USA
Tropix Inc., Bedford MA, USA
USB, Cleveland OH, USA

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Somatische Lebergentherapie von PD Dr. Ulrich M. Lauer an der Medizinischen Klinik, Abteilung Innere Medizin I, der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die diese Doktorarbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn PD Dr. Jörg Bartsch, ehemals am Institut für Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie in Bielefeld und jetzt am Kings College in London, UK, danke ich ganz herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und sein Engagement, die Arbeit in Bielefeld zu einem guten Ende zu bringen. Auch danke ich Frau Prof. Dr. Ursula Eichenlaub-Ritter sehr herzlich für ihre große Hilfsbereitschaft und die bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens dieser Arbeit, die mir die Promotion an der Universität Bielefeld erlaubt.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Gregor, Ärztlicher Direktor der Abteilung Innere Medizin I der Medizinischen Klinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in die Gastroenterologischen Forschungslabore.

Meinem Betreuer PD Dr. Ulrich M. Lauer danke ich für das stete Interesse an meiner Arbeit. Seine Vorschläge und Hilfestellungen waren ein entscheidender Beitrag zu meiner Arbeit; wichtig für mich war, dass mir jederzeit großzügig Freiräume gewährt wurden, eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor danke ich für die gute Zusammenarbeit und die sehr nette und entspannte Arbeitsatmosphäre, insbesondere sei hier Andrea Schenk, Irina Smirnow und Ulrike Schmidt für deren zuverlässige technische Assistenz und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit genannt, sowie Herrn Dr. Guy Ungerechts und Frau Dr. Barbara Verbeek für die schöne und abwechslungsreiche Zeit in und auch außerhalb des Labors.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Spiegel für seine praktische Einarbeitung, seine unerschöpfliche Geduld, seine wissenschaftlichen Anregungen und fachkundige Hilfe bei allen Fragen zu Beginn meiner Arbeit. Ihm und besonders auch Herrn Dr. Wolfgang Wybraniec möchte ich für das äußerst aufmerksame Korrekturlesen der Dissertation danken.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Christian Buchholz und seinen Mitarbeitern vom Paul-Ehrlich-Institut in Langen für ihre praktische Hilfestellung beim Einbaunachweis viraler Hüllglykoproteine in die Virushülle.

Mein ganz besonderer Dank gilt hier Susan Donath für Ihre immerwährende liebevolle Unterstützung in den Hochs und Tiefs im gesamten Entstehungsprozess dieser Arbeit, sowie meinen Eltern, die mich während meines Studiums unterstützt und einen sehr wichtigen Teil dazu beigetragen haben, dass die Doktorarbeit ein glückliches Ende gefunden hat.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Würzburg, 10. Januar 2006

Kai Hauschulz