

NEUE LENTIVIRALE VEKTOREN

FÜR DIE HIV-GENTHERAPIE

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ulrike Mock

aus Hamburg

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. B. FEHSE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 28. Juni 2013

Hamburg, den 17. Juni 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse wurde in folgender Fachzeitschrift publiziert:

Mock, U, Thiele, R, Uhde, A, Fehse, B, and Horn, S. **Efficient lentiviral transduction and transgene expression in primary human B cells**. *Human Gene Therapy Methods* 23, (2012), 408–415.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
1. Einleitung.....	3
1.1. Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) und AIDS	3
1.1.1. Aufbau.....	3
1.1.2. Replikation.....	5
1.1.3. Eintritt in die Zielzelle.....	8
1.1.4. cART und Limitationen	9
1.2. HIV-Gentherapie.....	10
1.2.1. Klassifizierung antiviraler Gene	10
1.2.2. Eintrittsinhibitoren	11
1.2.3. Gentherapeutische Alternativen zu Enfuvirtid	13
1.2.4. Gentherapeutische Alternativen zu Maraviroc	14
1.2.5. Designer-Nukleasen	15
1.3. HIV-abgeleitete lentivirale Vektoren für die Gentherapie.....	19
1.3.1. Entwicklung lentiviraler Vektorsysteme	19
1.3.2. Lentivirale Vektoren für die transiente Expression	22
1.4. Fragestellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Material	25
2.1.1. Laborausstattung und Geräte	25
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3. Reagenzien, Puffer und Medien	26
2.1.4. Plasmide	28
2.1.5. Oligonukleotide	29
2.1.6. Enzyme	30
2.1.7. Kits	31
2.1.8. Antikörper.....	31
2.1.9. Stimulantien.....	32
2.1.10. HIV-Eintrittsinhibitoren.....	32
2.1.11. Materialien für tierexperimentelles Arbeiten	32
2.1.12. Software.....	32
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1. Agarosegelelektrophorese	33
2.2.2. Plasmidpräparationen.....	33
2.2.3. Präparation genomischer DNA	33
2.2.4. Verwendung von Restriktionsendonukleasen	33
2.2.5. Modifikationen der DNA-Enden.....	33
2.2.6. Isolierung von DNA-Fragmenten	34
2.2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.2.8. Aufreinigung der PCR-Fragmente	36
2.2.9. Klonierungsstrategien	36

2.2.10.	Isolierung viraler RNA aus Lentiviren	38
2.2.11.	DNA-Synthese aus viraler RNA.....	38
2.2.12.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	38
2.2.13.	Verwendung des CloneJET PCR Cloning Kit.....	38
2.2.14.	Verwendung des TOPO TA Cloning Kits	39
2.2.15.	Endonukleaseassay.....	39
2.3.	Arbeiten mit Bakterien	40
2.3.1.	Transformation kompetenter Bakterien	40
2.3.2.	Sequenzierungen.....	41
2.4.	Methoden der Zellkultur	41
2.4.1.	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	41
2.4.2.	Bestimmung der Zellzahl.....	41
2.4.3.	Kryokonservierung von Zellen.....	41
2.4.4.	Kultivierung von Mammalia-Zellen	42
2.4.5.	Isolation und Stimulation von Lymphozyten.....	43
2.4.6.	Durchflusszytometrie.....	45
2.4.7.	Einzelzellablage.....	46
2.4.8.	Transfektion über Calciumphosphat	47
2.4.9.	Titration lentiviraler Partikel.....	49
2.4.10.	Transduktion mittels lentiviraler Partikel	50
2.5.	Proteinbiochemische Methoden	51
2.5.1.	Detektion des sC46-Peptids in Zellüberständen	51
2.6.	Tierexperimentelles Arbeiten.....	52
2.6.1.	Transplantation humaner primärer B-Zellen.....	53
2.6.2.	Organentnahme und Aufarbeitung	53
2.7.	Statistische Analyse	54
3.	Ergebnisse	55
3.1.	Lentivirale Vektoren für die Expression des Eintrittsinhibitors sC46 in primären B-Zellen	55
3.1.1.	Auswirkungen des Pseudotyps auf Titer und Morphologie.....	55
3.1.2.	Transduktion primärer humaner B-Zellen mit GALV-pseudotypisierten Lentiviren (GALV-LVV)	56
3.1.3.	Optimierung des Transduktionsprotokolls für GALV-LVV	57
3.1.4.	Ausbeute transduzierter Zellen	59
3.1.5.	Steigerung der Expression durch B-Zell-spezifischen <i>enhancer</i>	61
3.1.6.	B-Zell Phänotyp und Engraftment im Mausmodell nach Transduktion.....	63
3.1.7.	Generierung des lentiviralen sC46-Expressionskonstrukts.....	65
3.1.8.	Sekretion des Eintrittsinhibitors sC46 durch Zelllinien	66
3.1.9.	Geringe sC46-Sekretion durch transduzierte B-Zellen.....	66
3.2.	Lentivirale Vektoren für den Knock-out des HIV-Korezeptors CCR5 über sequenzspezifische Nukleasen.....	68
3.2.1.	Transduktion mit TALE-Nukleasen über integrierende und nicht-integrierende Lentiviren	68

3.2.2.	Untersuchung der proviralen DNA und viralen RNA in TALEN-kodierenden Lentiviren.....	70
3.2.3.	Generierung nicht-revers transkribierender Lentiviren.....	72
3.2.4.	Validierung des NRTLTV-Systems und Optimierung durch Hypothermie.	74
3.2.5.	Expression von TALE-Nukleasen über NRTLTV.....	75
4.	Diskussion	78
4.1.	HIV-Gentherapie durch Expression therapeutischer Proteine in B-Zellen	78
4.1.1.	Optimierung der lentiviralen B-Zell Transduktion	79
4.1.2.	Optimierung der Transgenexpression in primären B-Zellen	81
4.1.3.	Anwendung auf die Expression des HIV-Eintrittsinhibitors	84
4.2.	HIV-Gentherapie durch Knock-out essentieller Gene.....	86
4.2.1.	Problematik der lentiviralen Transduktion mit TALEN	86
4.2.2.	Entwicklung und Anwendung der NRTLTV	88
5.	Ausblick	93
	Abkürzungsverzeichnis	94
	Literatur	98
	Eidesstattliche Versicherung.....	120
	Danksagung.....	121

ZUSAMMENFASSUNG

Trotz enormer Verbesserungen der Lebensqualität und -erwartung ist eine Heilung der HIV-Infektion durch die kombinierte antiretrovirale Therapie (cART) nicht möglich. Die dauerhafte Einnahme der Wirkstoffe führt zwar zu einem Wiederanstieg der CD4⁺-T-Zellzahl und zu einer Reduktion der Viruslast, eine vollständige Eradikation der Reservoirs wird aber nicht erreicht. Zusätzlich ist cART mit Nebenwirkungen und Langzeittoxizitäten verbunden. Die Gentherapie stellt eine vielversprechende, potentiell kurative Behandlungsoption für die HIV-Infektion dar. Lentivirale Vektoren (LVV) gelten als interessante Option für die effiziente und stabile genetische Modifikation mit therapeutischen Genen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung lentiviraler Vektoren für die HIV-Gentherapie.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob humane primäre B-Zellen sich als körpereigene „Fabriken“ für antivirale Wirkstoffe eignen. Hierfür wurde ein Protokoll für die effiziente Transduktion von B-Lymphozyten mit lentiviralen Partikeln etabliert, die mit den Glykoproteinen des *Gibbon ape leukemia virus* (GALV) pseudotypisiert waren. Dieses zeichnet sich im Vergleich zu existierenden Protokollen durch eine schonende Prozedur und deutlich höhere Ausbeuten transduzierter Zellen aus. Der Einbau einer B-Zell-spezifischen *enhancer*-Kassette vor dem hier verwendeten Promotor des *Spleen Focus Forming Virus* konnte zudem zu signifikanten Expressionssteigerungen in den Zielzellen führen. Zugleich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der potentielle Therapiekandidat sC46 (ein HIV-Eintrittsinhibitor) von primären Zellen nicht effizient sezerniert wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein lentivirales System für den Transport von Designer-Nukleasen entwickelt. Diese sequenzspezifischen Nukleasen können resistenzvermittelnde Mutationen (z.B. der Knock-out des HIV-Korezeptors CCR5) induzieren. Der Transport der hier verwendeten TAL-Effektor-Nukleasen (TALEN) war aber aufgrund ihrer Struktur bislang problematisch. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass angesichts repetitiver Sequenzen der Transport über revers transkribierende lentivirale Systeme nicht möglich ist. Die Herstellung einer enzymatisch inaktiven reversen Transkriptase gestattete jedoch die direkte Translation der viralen RNA in der Zielzelle. Die Einführung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle und eines starken Polyadenylierungssignals in die hier entwickelten nicht-revers transkribierenden lentiviralen Vektoren (NRTLTV) resultierte zusätzlich in einer deutlich verstärkten Expression. In Kombination mit optimierten Kulturbedingungen war es so erstmals möglich, TALEN über Lentiviren zu transportieren. Im Gegensatz zu DNA-basierten Vektoren ist durch das hier entwickelte System zusätzlich das Risiko der Insertionsmutagenese minimiert.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit zwei Vektorsysteme entwickelt, deren Anwendung nicht auf die HIV-Gentherapie beschränkt ist. Sie könnten unter anderem bei der Expression anderer therapeutischer Proteine in B-Zellen bzw. bei der transienten Expression problematischer (repetitiver, toxischer etc.) Transgene eingesetzt werden.

ABSTRACT

Although the combined antiretroviral therapy (cART) has markedly improved prognosis and quality of life of HIV-patients, it does not constitute a cure. Moreover, the lifelong application of antiviral drugs has been associated with adverse effects due to drug-related toxicities. Therefore, gene therapy has been considered as a promising alternative.

Lentiviral vectors (LVV) have been established as high-efficiency gene transfer vehicles for a large number of target cells, namely primary cells. Moreover, their relatively well established safety profile makes LVV an attractive choice for gene therapy applications.

The goal of the first part of this work was to develop a strategy to use B lymphocytes for the delivery of antiviral proteins or peptides. It was shown that pseudotyping of LVV with glycoproteins of the Gibbon ape leukaemia virus (GALV) resulted in high titres and efficient transduction. Furthermore, when compared to the currently favoured glycoproteins of measles virus (MV) it revealed a significantly improved total yield of transduced cells for the protocol established here. Additionally, the combination of a B-cell specific enhancer with the spleen focus forming virus promoter (SFFV) resulted in a considerably higher transgene expression in primary human B cells. The present work also showed that secretion of the potential therapeutic gene sC46 by various primary cells is highly inefficient.

The goal of the second part of this study was to develop a lentiviral system for the efficient delivery of designer nucleases. Transient expression of sequence-specific designer nucleases (e.g., TAL effector nucleases (TALENs)) is an attractive option to induce knock-outs *in vitro* and in future gene therapy applications. In fact, knock-out of the receptor CCR5 can lead to a resistance towards HIV. However, to date lentiviral delivery of TALENs has not been feasible. The present work revealed that this was due to multiple recombination events during reverse transcription induced by the repetitive structure of TALEN-genes. To overcome this problem, novel non-reverse transcribable lentiviral vectors (NRTLTV) with an enzymatically inactive reverse transcriptase were developed. Thus a novel lentiviral system based on RNA-delivery was established that circumvents the problem of recombination of repetitive sequences. Inclusion of RNA elements (internal ribosome entry site and polyadenylation signals) resulted in significantly improved expression levels. After optimising the culture conditions, it could for the first time be shown that TALEN delivery by lentiviral vectors is indeed possible. Importantly, this is a purely RNA-based system avoiding the risk of insertional mutagenesis.

In conclusion, two lentiviral vector systems were successfully established, the potential applications of which are not solely limited to HIV gene therapy. In fact, B cells represent interesting vehicles for the expression of various therapeutic genes, while NRTLTV should be useful for the transient expression of a variety of “problematic” (repetitive, toxic etc.) transgenes.

1. EINLEITUNG

1.1. Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) und AIDS

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) wurde in den frühen 1980er Jahren als Auslöser des erworbenen Immunschwächesyndroms (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrom*) identifiziert [1–3]. Der Verlauf einer HIV-Infektion wird in 3 Phasen eingeteilt: akute Phase, chronische Phase und AIDS [4]. Die akute HIV-Infektion ist durch eine hohe Replikationsrate, ein Abfallen der CD4⁺-T-Zellen und eine Expansion der Virus-spezifischen Immunantwort geprägt [5]. Auftretende Symptome sind häufig grippeartig und werden meist nur bei bekanntem Expositionsrisiko mit einer HIV-Infektion in Verbindung gebracht. Nach der Serokonversion (dem Zeitpunkt des ersten Auftretens HIV-spezifischer Antikörper) geht die Viruslast stark zurück und die CD4⁺-T-Zellzahl steigt wieder an [6]. Die Ausgangswerte können normalerweise aber nur durch eine kombinierte antiretrovirale Therapie (cART, siehe 1.1.4) wieder hergestellt werden. Es folgt die chronische Phase (oder auch Latenzphase), in der die Patienten meist über mehrere Jahre klinisch asymptomatisch sind. In dieser Zeit steigt in untherapierten Patienten die Viruslast langsam an, während die CD4⁺-T-Zellzahl bis zu einem kritischen Punkt abfällt (ca. < 200 CD4⁺-T-Zellen/ μ l), ab dem eine ausreichende Immunantwort nicht mehr möglich ist. In der folgenden Phase (AIDS) treten sogenannte opportunistische Infektionen sowie daraus resultierende maligne Erkrankungen (AIDS-assoziierte Lymphome/Sarkome) auf. Opportunistische Erreger können sich bei immunkompetenten Menschen normalerweise nicht vermehren und führen nur bei immundefizienten Patienten zu schweren Erkrankungen. Ohne Therapie sterben AIDS-Patienten meist innerhalb von 2 bis 4 Jahren.

Laut UNAIDS (*The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*) [7] waren Ende 2011 34 Millionen Menschen HIV-positiv. 1,7 Millionen Menschen starben an den Folgen der HIV-Infektion; 2,5 Millionen wurden neuinfiziert.

1.1.1. Aufbau

HIV gehört zur Gattung der Lentiviren innerhalb der Familie der *Retroviridae*. Weitere Viren innerhalb dieser Familie sind die α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren sowie die Spumaviren. Retroviren sind einzelsträngige (ss) RNA-Viren, bei denen die RNA direkt als mRNA verwendet werden kann (positives Genom (+)). Im Laufe des Replikationszyklus (1.1.2) erfolgt ein Umschreiben (reverse Transkription) der viralen RNA zu komplementärer DNA, welche stabil ins Wirtsgenom integriert wird. Es gibt zwei Arten des Humanen Immundefizienz Virus (HIV-1 und HIV-2) mit einer Sequenzhomologie von ca. 50 % [8]. HIV-2 verfügt neben einer geringeren Transmissionsrate auch über eine längere

asymptomatische Phase und macht nur einen Bruchteil der weltweiten HIV-Infektionen/ AIDS-Erkrankungen aus [9]. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war HIV-1.

Ein virales Partikel enthält zwei Kopien des RNA-Genoms. Die RNA des HIV-1 ist ca. 9,7 kb groß und kodiert für 15 Proteine (Abbildung 1) [10]. Flankiert wird der kodierende Bereich der RNA durch die sogenannten *long terminal repeats* (LTRs). Diese Bereiche enthalten unter anderem den viralen Promotor, das Polyadenylierungssignal (p(A)-Signal) und weitere regulatorische Elemente, die für die Integration und reverse Transkription bedeutend sind.

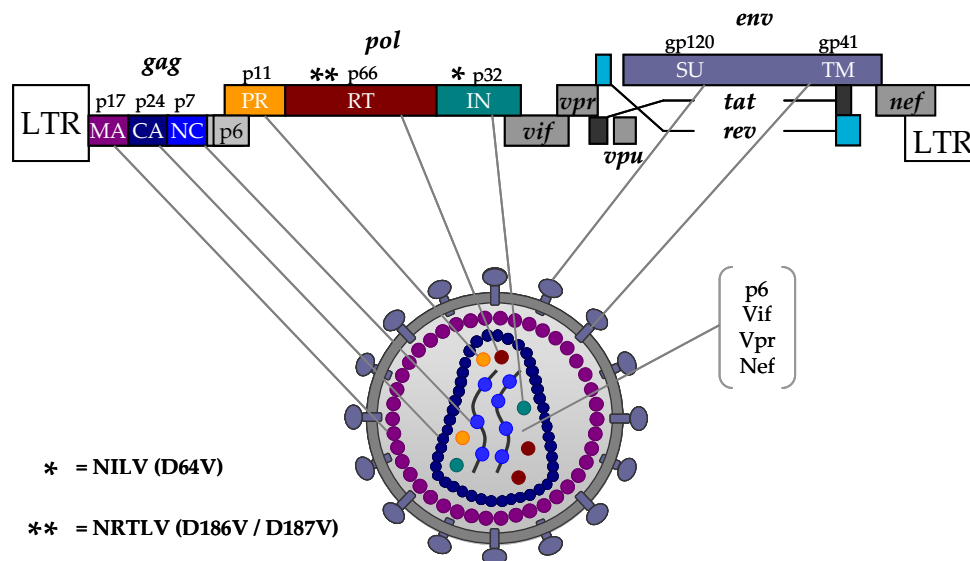


Abbildung 1 - Genomischer und struktureller Aufbau von HIV-1. Oben: Genomische Organisation. Die virale RNA kodiert die essentiellen Gene *gag*, *pol* und *env*, die regulatorischen *tat* und *rev* sowie die akzessorischen *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*. Flankiert wird der kodierende Bereich von den *long terminal repeats* (LTR). Unten: Strukturelle Organisation. Das HI-Virus ist umhüllt und von innen mit einer Matrix ausgekleidet (p17). Die Hüllproteine (gp120/gp41) sind in der Membran verankert. Das konische Kapsid im Inneren des Partikels wird durch p24 gebildet und enthält 2 Kopien der viralen RNA (komplexiert durch p7), die viralen Enzyme p11, p66, p32, sowie akzessorische Proteine. Schematische Darstellung modifiziert nach Frankel & Young (1998) [10]. Nicht maßstabsgetreu. Sterne markieren die in dieser Arbeit hergestellten/verwendeten reverse Transkriptase (RT)- bzw. Integrase (IN)-Mutanten (siehe unten).

Die Gene *gag*, *pol* und *env* sind essentieller Bestandteil aller Retroviren. HIV-1 verfügt zusätzlich noch über regulatorische Gene (*tat*, *rev*) und akzessorische Gene (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) (Funktion siehe Abschnitt 1.1.2). Letztere werden akzessorisch genannt, da sie für eine Replikation *in vitro* redundant sind. Sie dienen unter anderem der Inaktivierung zellulärer, antiviraler Mechanismen und erhöhen so die Virulenz der HI-Viren.

Für die Strukturproteine der viralen Partikel kodieren sowohl *env* (gp120, gp41) als auch *gag* (p17, p24, p7 und p6). Die viralen Hüllproteine gp120 (SU, Oberflächenprotein) und gp41 (TM, Transmembranprotein) liegen eingebettet in der zellulären Plasmamembran vor, welche das Virus umgibt. p17 (MA, Matrix) kleidet die Innenseite der zellulären Membran aus, während p24 (CA, Kapsid) das Viruskapsid bildet [11]. Das Kapsid enthält neben den

viralen RNAs (gebunden durch p7 (NC, Nukleokapsid)) auch die viralen Enzyme p11 (PR, Protease), p66 (RT, reverse Transkriptase) und p32 (IN, Integrase) [12]. Letztere werden vom *pol*-Gen kodiert. Die Vielzahl der Proteine ergibt sich durch alternatives Spleißen und posttranslationale Prozessierung durch die virale Protease (PR) [13–15].

1.1.2. Replikation

Die Infektion der Zelle bzw. die Replikation der Viren beginnt mit der Bindung der viralen Partikel an die Zellmembran (Abbildung 2). Dies geschieht durch die Interaktion der HIV-1 Hüllproteine gp120 und gp41 mit den zellulären Rezeptoren CD4 [16, 17] bzw. einem der Korezeptoren CCR5 [18–20] oder CXCR4 [20–22]. Auf den Eintrittsmechanismus wird noch einmal gesondert in Abschnitt 1.1.3 eingegangen. Bei der Fusion des viralen Partikels mit der Wirtszelle wird das Kapsid freigesetzt. Der genaue Zeitpunkt der Auflösung des viralen Kapsids ist bislang nicht vollständig geklärt [23]. Es konnte aber gezeigt werden, dass die reverse Transkription innerhalb des Kapsids stattfindet und das sogenannte *uncoating* erst bei vollständiger Bildung der proviralen DNA an der Kernpore erfolgt [24–26]. Bei der reversen Transkription werden die einzelsträngigen viralen RNAs als Vorlage für die Entstehung der doppelsträngigen (ds) DNA verwendet [27]. Die reverse Transkriptase (RT, p66) fungiert hierbei als DNA-Polymerase (DNA-Synthese) und RNase (anschließender Abbau der viralen RNA). Im nächsten Schritt wird die DNA (von viralen und zellulären Proteinen in einem Präintegrationskomplex gebunden [28]) zum Kern transportiert. Der Transport der gebildeten DNA zum und in den Nukleus wird unter anderem durch das akzessorische Protein Vpr vermittelt [29, 30]. Im Gegensatz zu z.B. γ -Retroviren, bei denen eine Integration nur nach Auflösung der Kernmembran stattfinden kann [31, 32], ist bei Lentiviren über den aktiven Transport durch Kernporen auch eine Infektion postmitotischer Zellen möglich [33–36]. Innerhalb des Nukleus erfolgt über die Integrase (IN, p32) die Integration der viralen DNA in das zelluläre Genom als Provirus. Die Transkription erfolgt über den HIV-1 Promotor in der U3-Region des 5'LTR mithilfe des viralen Proteins Tat (Bindung des *trans-activating response elements* auf RNA-Ebene) und zellulärer Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B; Bindung auf DNA-Ebene) durch die zelluläre RNA-Polymerase II [37]. Die mRNA enthält verschiedene Spleißdonoren und Spleißakzeptoren, wodurch mehrere mRNAs gebildet werden können [10, 13]. Ein frühes Transkript (2 kb) kodiert für Rev, Tat und Nef. Die späteren Transkripte (4 kb bzw. 9 kb) kodieren für Env, Vpu, Vpr, Tat und Vif bzw. Gag und Gag-Pol [15, 38]. Das größere Transkript wird bei der Zusammenlagerung auch als virale RNA in die neugebildeten viralen Partikel inkorporiert. Der Export der einfach-gespleißten 4 kb- sowie der ungespleißten 9 kb-mRNA wird durch das akzessorische Protein Rev vermittelt, welches an das *Rev response element* (RRE) im 5' Bereich bindet [39]. Die Translation erfolgt im Zytoplasma. Das Hüllprotein gp160 (gp120 + gp41) und Vpu werden jedoch kotranslational ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert, von wo aus sie über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert werden. Im Trans-

Golgi findet hierbei die Prozessierung des gp160 zu gp120 und gp41 mithilfe zellulärer Proteasen statt [40–42]. Innerhalb des ER und Golgi-Apparates werden gp160/CD4-Komplexe über Vpu degeneriert, um eine genügende Expression funktionaler Hüllproteine auf der Zelloberfläche zu gewährleisten [43]. Um außerdem eine Bindung der Hüllproteine an CD4-Moleküle auf der Zelloberfläche zu vermeiden, wird bereits exprimiertes CD4 über das akzessorische Protein Nef internalisiert und degradiert [44]. Dieses verhindert zusätzlich noch eine Superinfektion der Zelle mit weiteren HI-Viren [45]. Eine weitere Aufgabe von Nef ist die Internalisierung des *major histocompatibility complex class I* (MHC I), worüber die Erkennung infizierter Zellen durch zytotoxische CD8⁺-T-Zellen verhindert wird [46].

Die Zusammenlagerung der neuen Partikel findet an der Zellmembran statt [47]. Die virale RNA enthält ein Verpackungssignal (ψ), welches durch die p7-Domäne (NC) des Gag-Polypeptids erkannt und gebunden wird [48, 49]. Durch Komplexierung der RNA mit p7 dimerisieren bis trimerisieren die Gag-Proteine [50, 51], welche im nächsten Schritt über Internalisierung des N-Terminus (MA, p17) mit der Zellmembran assoziiert werden [52, 53]. Durch die Interaktion der p24-(CA)-Domänen der Gag-Proteine lagern sich die Gag-Polypeptide zu einem Gitter zusammen, welches im Zusammenspiel mit zellulären Proteinen zu einer Ausstülpung der Membran führt [54, 55].

Die Protease, reverse Transkriptase und Integrase werden durch ein „Stottern“ des Ribosomens zusammen mit Gag als Polyprotein gebildet (Gag-Pol) [56]. Diese geschieht nur in etwa 5 % der Fälle und sorgt dafür, dass bei der Zusammensetzung der viralen Partikel Gag deutlich überwiegt [14, 15].

Auf der Zellmembran befinden sich neben den viralen Hüllproteinen gp120 und gp41, welche mithilfe von p17 rekrutiert werden [10], auch zelluläre Komponenten [57–59]. Diese können, wie z.B. für das Adhäsionsprotein ICAM-1 beschrieben, zur Anheftung an andere Zielzellen und zur Erhöhung der Infektiosität führen [60–62]. Das Abschnüren der viralen Partikel von der zellulären Membran erfolgt, ähnlich wie bei der Zellteilung, über den sogenannten *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT-Komplex) [63]. Eine wichtige Rolle bei der endgültigen Freisetzung der viralen Partikel spielt auch die Interaktion des zellulären Tetherin mit dem viralen akzessorischen Protein Vpu [64, 65]. Tetherin ist ein doppelt-verankertes Glykoprotein [66], welches bei der Ausstülpung in die neu gebildeten Viren inkorporiert werden kann [67–69]. Verbleibt jeweils ein Anker in der zellulären Membran und einer im viralen Partikel, werden diese an der Zelle zurückgehalten, internalisiert und lysosomal degradiert [70, 69]. Bindet zuvor Vpu an Tetherin, kommt es zu dem beschriebenen Abbau des Tetherins, bevor es in die viralen Partikel inkorporiert werden kann [71, 72]. So ermöglicht Vpu die Freisetzung der viralen Partikel.

Eine weitere Rolle bei der Blockierung zellulärer, antiviraler Mechanismen spielt außerdem das akzessorische Protein Vif. Es bindet das zelluläre *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G* (APOBEC3G) und verhindert, dass es bei der Zusammenlagerung in virale Partikel aufgenommen wird. APOBEC3G gehört zu den Deaminasen, welche die

Umwandlung von Cytosin zu Uracil katalysieren [73]. Bei der reversen Transkription in der neuen Zielzelle kommt es dadurch zu Hypermutationen, wodurch die virale Fitness stark beeinträchtigt wird [74, 75].

Schließlich erfolgt die Reifung der Partikel durch die virale Protease (PR, p11) [15, 76]. Mittels proteolytischer Spaltung der Polyproteine Gag und Gag-Pol bilden sich das konische Kapsid und die viralen Enzyme [14, 15, 55].

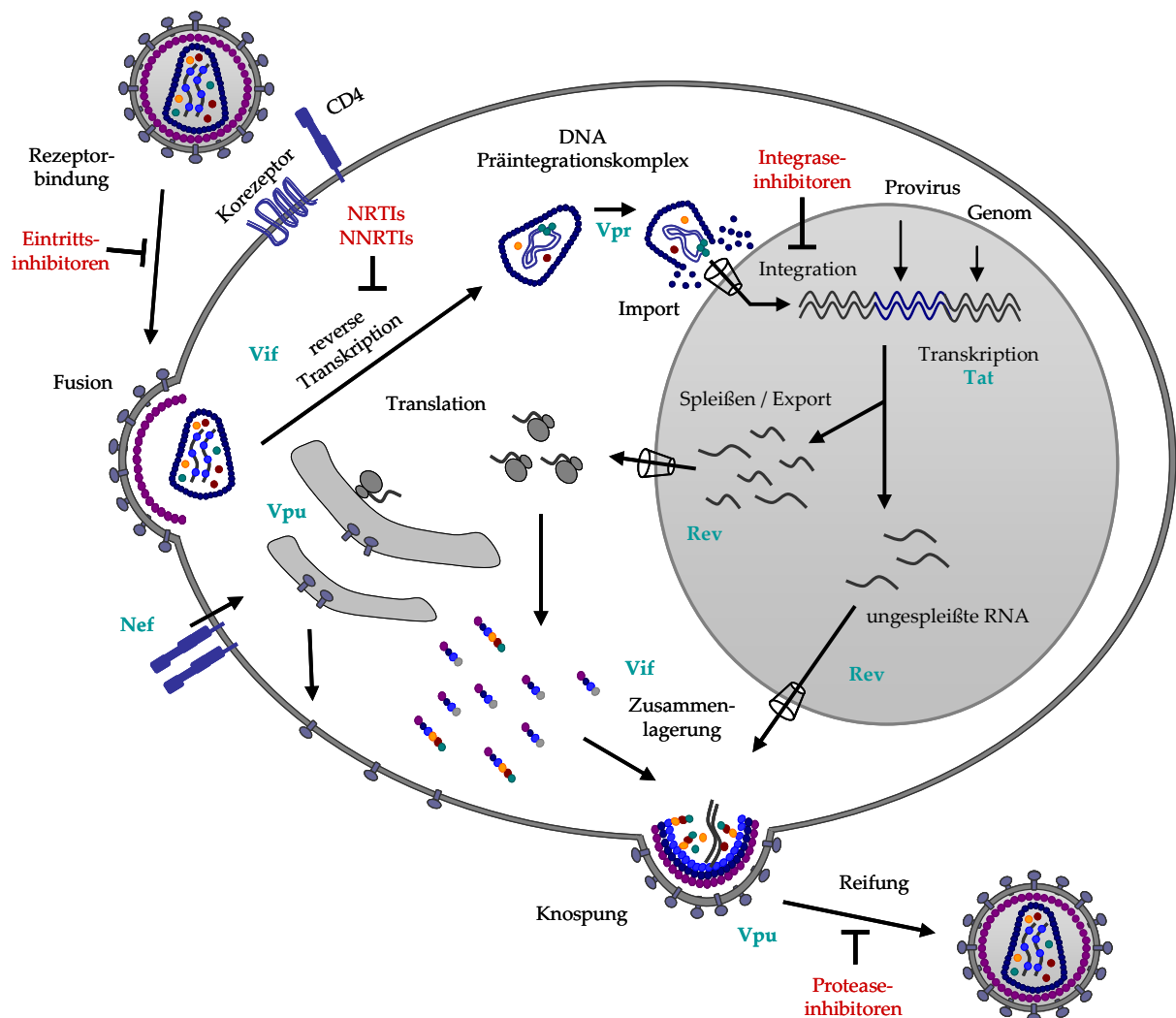


Abbildung 2 - HIV-1 Replikationszyklus und Wirkungsorte antiretroviraler Substanzen. HIV-1 fusioniert nach Rezeptorbindung mit der Wirtszelle und setzt das Kapsid ins Zytoplasma frei. Dort finden die reverse Transkription und die Bildung des Präintegrationskomplexes statt, welcher aktiv in den Nukleus importiert wird. Im Nukleus wird die gebildete DNA als Provirus ins zelluläre Genom integriert, von wo aus die Transkription stattfindet. Die RNA wird ins Zytoplasma exportiert und translatiert. Die gebildeten Proteine, sowie ebenfalls transkribierte virale RNA lagern sich an der Zellmembran zusammen und bilden neue virale Partikel. Die Reifung erfolgt durch die Prozessierung der Proteine durch die virale Protease. Rot dargestellt sind die Wirkstoffklassen der kombinierten antiretroviralen Therapie, grün die Wirkungsorte regulatorischer und akzessorischer HIV-1-Proteine. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

1.1.3. Eintritt in die Zielzelle

Der Eintritt von HIV-1 in die Zielzelle erfolgt, wie bereits im vorhergehenden Absatz erwähnt, über die Bindung der viralen Hüllproteine gp120 und gp41 an CD4 [16, 17] und CCR5 [18–20] bzw. CXCR4 [20–22]. Es gibt noch weitere Korezeptoren – jedoch spielen die hier genannten die größte Rolle bei der HIV-Pandemie [77–79]. Die Mehrheit der übertragenen Viren verwendet CCR5 als Korezeptor (R5 HIV; M-trop). Viren, welche CXCR4 (X4 HIV; T-trop) oder beide Rezeptoren (R5X4 HIV; dualtrop) verwenden, treten bei ca. 50 % der HIV-Infizierten erst nach einer Latenzphase von 5-7 Jahren auf. Die Gründe hierfür sind noch unklar – es ist aber möglich, dass das CCR5-Ziellzellreservoir erschöpft ist oder auch stochastisch X4 HI-Viren entstehen und durch einen Selektionsvorteil die R5-tropen Stämme überwachsen [79, 80]. Der Wechsel des Tropismus ist häufig ein schlechtes prognostisches Zeichen [80].

Ein funktionelles HIV-1 Hüllprotein besteht aus jeweils drei gp41 und gp120-Proteinen (Abbildung 3). Diese Trimere aus Heterodimeren werden durch proteolytische Spaltung im Trans-Golgi gebildet [40–42]. gp120 ist für die (Ko-)Rezeptor-Erkennung zuständig, während gp41 die Fusion des viralen Partikels mit der Zellmembran initiiert.

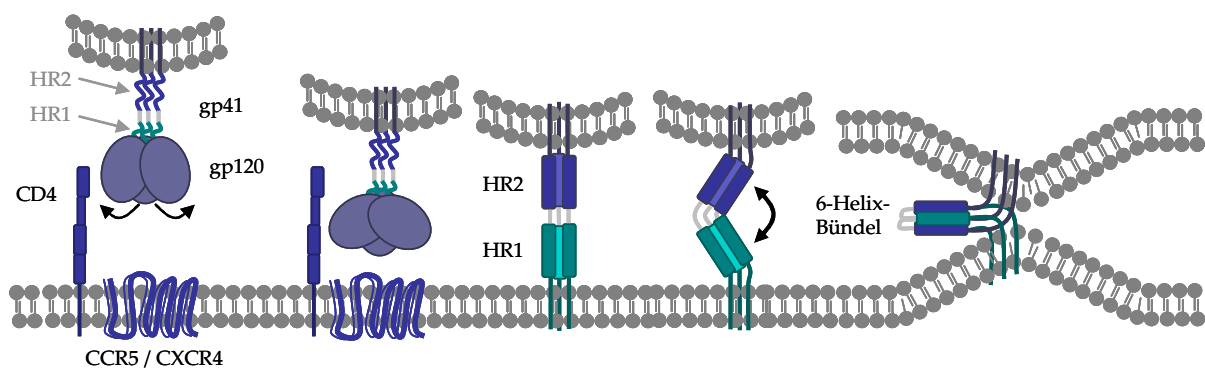


Abbildung 3 - Eintritt des HIV-1 in die Zielzelle. Das virale Hüllprotein besteht aus jeweils drei gp120- und gp41-Glykoproteinen. Durch die Erkennung der zellulären Rezeptoren CD4 sowie CCR5 oder CXCR4 findet eine Konformationsänderung des gp120 statt, wodurch der fusionsaktive Zustand des gp41 gebildet werden kann. Dabei integriert der N-Terminus der *heptad repeat 1* (HR1)-Domäne, welche zuvor von gp120 geschützt war, in die zelluläre Membran. Durch die Interaktion der beiden HR-Domänen entsteht ein sogenanntes 6-Helix-Bündel, welches die Membranen in räumliche Nähe bringt und die Fusion ermöglicht. Schematische Darstellung modifiziert nach Chan & Kim (1998) [81] und Wilen *et al.* (2012) [79]. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

Durch die Bindung des gp120 an CD4 erfolgt eine Konformationsänderung des gp120 [82–84], wodurch die Bindungsstelle für den jeweiligen Korezeptor freigelegt wird [85, 86]. Die Bindung der Korezeptoren führt daraufhin zu einer weiteren Änderung der Konformation [81], durch welche der N-Terminus des gp41 in der Zellmembran verankert werden kann [81, 87]. gp41 verfügt über zwei Leucin-Zipper ähnliche Domänen, die sogenannten *heptad repeats* (HR). HR1 liegt N-terminal und ist mit dem C-terminalen HR2 über eine

Gelenkregion verbunden [88, 89]. Im nächsten Schritt erfolgt durch die Aneinanderlagerung der *heptad repeats* die Ausbildung des sogenannten 6-Helix-Bündels [87, 90, 91]. Hierbei werden die Membran des viralen Partikels und die zelluläre Membran in räumliche Nähe gebracht, wodurch eine Fusion der Membranen stattfinden kann [92, 93]. Die Öffnung der Fusionspore ist zunächst zu klein für das HIV-1 Kapsid. Der genaue Mechanismus zur Erweiterung der Pore, die eine Freisetzung des Kapsids ins Zytoplasma und eine Fortsetzung des Replikationszyklus (siehe 1.1.2.) ermöglicht, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden [94].

1.1.4. cART und Limitationen

Erste Therapien der HIV-Infektion basierten auf der Gabe einzelner antiretroviraler Proteine. Durch die beträchtliche Replikationsrate der HI-Viren (Bildung von 10^8 - 10^9 Viren pro Tag) [95–97] kombiniert mit der hohen Fehlerrate [98–100] und Rekombinationsfrequenz während der reversen Transkription [101, 102] entstanden allerdings innerhalb kürzester Zeit resistente Virusstämme, sodass die sogenannte Monotherapie kaum Wirksamkeit zeigte.

Erst die Kombination von mind. 3 antiretroviralen Wirkstoffen (kombinierte antiretrovirale Therapie (cART)) konnte die Prognose für HIV-positive Patienten enorm verbessern. Durch die Einführung der cART wurde aus der bis dahin tödlichen HIV-Infektion eine kontrollierbare, chronische Krankheit [103] mit einer normalen Lebenserwartung für Patienten mit einer ansonsten gesunden Lebensweise [104].

2012 waren in Deutschland 30 Einzel- und Kombinationspräparate in folgenden 5 Wirkstoffklassen zugelassen [105]:

- 1.) Nukleosidische bzw. nukleotidische reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)
- 2.) Nicht-nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)
- 3.) Proteaseinhibitoren (PIs)
- 4.) Eintrittsinhibitoren (siehe 1.2.2)
- 5.) Integraseinhibitoren.

Die Angriffspunkte der einzelnen Wirkstoffklassen sind in Abbildung 2 dargestellt. Bei cART werden diese antiretroviralen Substanzen kombiniert eingesetzt, um nicht nur einen Schritt sondern gleichzeitig mehrere Schritte des HIV-Replikationszyklus zu blockieren. Bei den meisten Patienten kann während der Einnahme der cART-Medikamente die Viruslast im peripheren Blut unter die Nachweisgrenze gedrückt werden. Dennoch kann aufgrund der Persistenz von HIV in zellulären Reservoirs nicht von einer Heilung gesprochen werden [106, 107]. Bei Absetzen der antiretroviralen Substanzen kommt es schnell zu einem erneuten Anstieg der Viruslast (*rebound*) [108–110]. In einer Hochrechnung heißt es, dass eine vollständige Eradikation der HI-Viren erst nach 60-70 Jahren cART zu erwarten ist [111]. Für die meisten Patienten bedeutet dies demnach eine lebenslange cART-Einnahme. Dabei ist cART mit einer Reihe von Nebenwirkungen und Langzeittoxizitäten assoziiert. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören gastrointestinale Beschwerden, welche oftmals zu

einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität und zu einem Therapieabbruch führen [112, 113], wodurch wiederum Resistenzbildung gefördert wird. Aber auch Hepatotoxizität, Lipodystrophien und Polyneuropathien werden beschrieben [114–116]. Gründe für diese Nebenwirkungen sind unter anderem mitochondriale Toxizität und Hypersensitivität [113]. Da cART erst seit Mitte der 1990er Jahre im großen Maßstab angewendet wird und man somit nur auf einen ca. 15-jährigen Erfahrungsschatz zurückgreifen kann, ist es außerdem möglich, dass weitere Komplikationen durch die Langzeiteinnahme auftreten können.

Die Therapiekosten betragen pro Patient zwischen 8 – 15.000 Euro p.a. für Kombinationspräparate bzw. 700 – 28.500 Euro p.a. pro Einzelpräparat zur individuellen Therapie. Die Therapiekosten für Patienten mit multiresistenten Viren belaufen sich mitunter auf 40.000 Euro p.a. [105]. Die hohen Kosten sorgen für eine eingeschränkte Verfügbarkeit – gerade in Ländern/Regionen, in denen die medizinische Versorgung limitiert und die Erkrankung besonders weit verbreitet ist (Sub-Sahara, Afrika). In Deutschland stellt cART zwar eine hohe finanzielle Belastung für die Krankenkassen dar, doch ist zu berücksichtigen, dass zum einen cART derzeit noch immer die einzige Therapieoption ist und zum anderen die durch AIDS-bedingten teils enormen Folgekosten (Therapie, Arbeitsunfähigkeit etc.) somit eingespart werden können.

Nach wie vor ist die Resistenzbildung ein großes Problem der HIV-Therapie. Neben den wirkstoffspezifischen Resistenzen kann es auch zu Kreuzresistenzen gegen andere Substanzen in derselben Wirkstoffklasse kommen [117, 118]. Aus diesem Grund ist eine Weiterentwicklung der antiretroviralen Therapie (mehr Wirkstoffe, aber auch neue Wirkstoffklassen) weiterhin nötig.

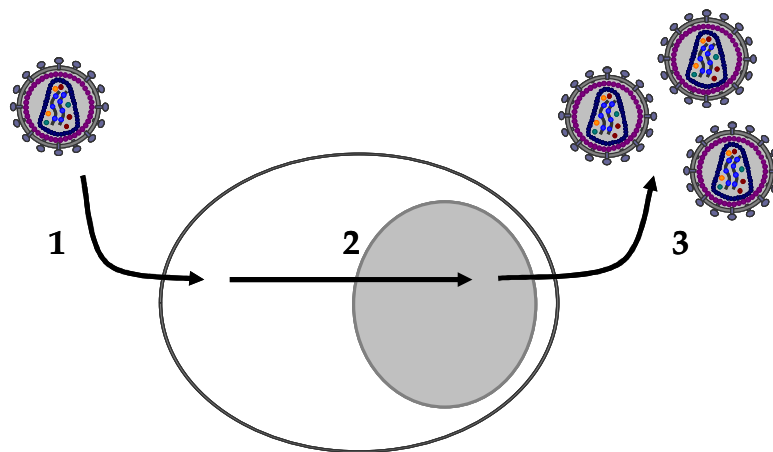
1.2. HIV-Gentherapie

Alternativ werden für HIV auch gentherapeutische Ansätze verfolgt. Der erhoffte Vorteil dieser Therapieform ist der Ersatz der lebenslangen Medikation durch die Expression therapeutischer Gene. Bereits 1988 wurde von David Baltimore das Modell der intrazellulären Immunisierung vorgeschlagen [119]: Durch die zelluläre Expression von Eintritts- und Replikationsinhibitoren kann die Zelle theoretisch dauerhaft immun gegen eine Infektion und Vermehrung der HI-Viren werden. Andere Ansätze beinhalten die Verstärkung der spezifischen antiviralen Immunität durch Modifikation autologer zytotoxischer T-Zellen oder die Vakzinierung durch die Expression viraler Gene [120].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Ansatz der intrazellulären Immunisierung behandelt und wird daher im Folgenden weiter beschrieben.

1.2.1. Klassifizierung antiviraler Gene

Replikationsinhibitorische, antivirale Gene zur HIV-Gentherapie können in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden (Abbildung 4) [120, 121].



Klasse	Inhibierte Phase des Replikationszyklus	Schutz vor			Selektionsvorteil
		Infektion	vir. CPE	CTL	
1	Rezeptorbindung, Fusion, reverse Transkription, Integration	ja	ja	ja	ja
2	Transkription und Translation viraler Gene, nukleärer Export	nein	ja	teilweise	ja
3	Zusammenlagerung, Ausknospung und Reifung	nein	nein	nein	nein

Abbildung 4 - Klassifizierung antiviraler Gene. Oben: Die Pfeile stellen stark vereinfacht den Replikationszyklus des HIV-1 dar. Die Nummern repräsentieren die Einteilung in die 3 antiviralen Klassen in Abhängigkeit vom Angriffspunkt. Unten: Die blockierten Stadien der Replikation und der dadurch vermittelte Schutz vor Infektion, viralem zytopathischem Effekt (vir. CPE) und zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Die rechte Spalte zeigt an, ob aus der Expression der antiviralen Gene ein Selektionsvorteil für die modifizierten Zellen hervorgeht. Abbildung modifiziert nach von Laer *et al.* (2006) bzw. (2009) [120, 121].

1.2.2. Eintrittsinhibitoren

Eine besonders attraktive Form der antiviralen Gene der Klasse 1 (siehe 1.2.1) stellen die Eintrittsinhibitoren dar. Eintrittsinhibitoren verhindern entweder durch Hemmung der Rezeptorbindung oder durch Blockierung der Fusion des viralen Partikels mit der Zellmembran bereits das Eindringen in die Zelle. Da sich der Wirkmechanismus der Eintrittsinhibitoren grundlegend von denen der anderen cART-Wirkstoffklassen unterscheidet, ist nicht mit Kreuzresistenzen zu rechnen. Daher werden Eintrittsinhibitoren vor allem bei multiresistenten HI-Viren eingesetzt.

Eintrittsinhibitoren werden je nach Wirkstrategie in Rezeptorbindungs-, Korezeptorbindungs- und Fusionsinhibitoren unterschieden [122]. Bislang sind in der antiretroviralen Therapie zwei Eintrittsinhibitoren zugelassen: Der Korezeptorantagonist Maraviroc (MVC; Handelsname Celsentri, Erstzulassung 2007) und der Fusionsinhibitor Enfuvirtid (T20 oder C36; Handelsname Fuzeon, Erstzulassung 2003).

Maraviroc blockiert die Bindung der HI-Viren an den CCR5-Korezeptor [123] und wird generell gut vertragen [124–126]. Es ist ein sogenannter *small-molecule* Wirkstoff, welcher über die Bindung an die transmembranen Helices des CCR5 die Interaktion mit gp120 stört [127]. Da die Maraviroc-Bindungstasche nicht mit der gp120-Bindungsstelle übereinstimmt, wird angenommen, dass der Wirkmechanismus eher auf einer inhibierenden Konformationsänderung beruht als auf einer kompetitiven Bindung [122, 123]. Wie für andere antiretrovirale Wirkstoffe ist auch für Maraviroc die Entstehung resistenter Virusstämme bekannt [128]. Nachteilig bei Korezeptorantagonisten ist die Spezifität für nur einen der möglichen Korezeptoren: Maraviroc ist z.B. nur für R5-trope HI-Viren geeignet. Bei Nachweis X4- oder R5X4-troper Stämme sollte Maraviroc nicht eingesetzt werden, um die Ausübung eines Selektionsdrucks zu vermeiden [129]. In der Hoffnung auf eine mögliche Kombinationstherapie bei X4- oder R5X4-tropen Stämmen, werden auch CXCR4-Antagonisten entwickelt; bislang ist aber noch keiner für die HIV-Therapie zugelassen. Einer dieser Antagonisten (Plerixafor, Handelsname Mozobil) mobilisiert über die Bindung an CXCR4 hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut [130–132]. Interessanterweise wird dieser Wirkstoff inzwischen zur Mobilisierung von Stammzellen in der autologen Stammzelltransplantation eingesetzt [133].

Die Wirkung des zweiten zugelassenen Eintrittsinhibitors Enfuvirtid ist im Gegensatz zu Maraviroc unabhängig vom Korezeptor-Tropismus. Dieses synthetische Peptid mit einer Länge von 36 Aminosäuren ist vom HR2 des gp41 abgeleitet. Durch die kompetitive Bindung an HR1 wird die Bildung des 6-Helix-Bündels verhindert (Abbildung 5; siehe auch Abschnitt 1.1.3) [90, 134–136]. Da der Wirkstoff vom carboxyterminalen Ende des gp41 abstammt, gehört er zu den sogenannten C-Peptiden. N-Peptide, also Peptide des aminoterminalen Endes, können zwar auch die Fusion hemmen, die Wirksamkeit ist aber im Vergleich zu C-Peptiden stark reduziert [90, 134, 137]. Da es sich bei Enfuvirtid um einen peptidischen Wirkstoff handelt, ist die Herstellung sehr aufwendig. Dies spiegelt sich in den Therapiekosten (Enfuvirtid ist mit fast 29.000 € p.a. das teuerste antivirale Therapeutikum [105]) und in der reduzierten Lieferbarkeit wieder [138]. Außerdem ist Enfuvirtid nicht oral verfügbar und muss subkutan injiziert werden. Da es über eine geringe Halbwertszeit im Serum

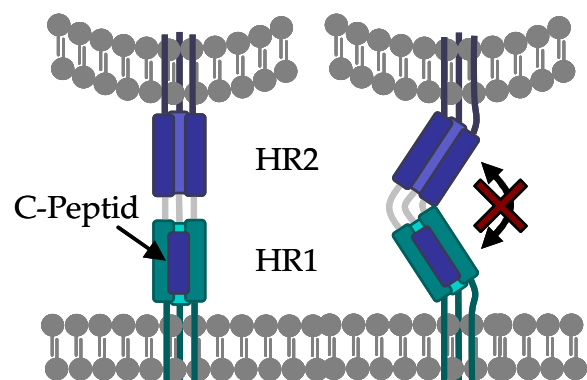


Abbildung 5 - Wirkungsweise eines C-peptidischen Eintrittsinhibitors. Durch die Bindung des C-Peptids an den N-terminalen heptad repeat (HR) wird die Bildung des 6-Helix-Bündels blockiert. Schematische Darstellung nach Chan und Kim (1998) [81].

verfügt ($t_{1/2} = 1,8$ Stunden), muss die Injektion zweimal täglich mit einer jeweils relativ hohen Dosis erfolgen [136]. Fast alle Patienten zeigen Reaktionen an der Einstichstelle (Entzündung, Gewebsverhärtungen etc.), welche z.T. erst nach Tagen oder Monaten abheilen [139, 140]. Dies senkt häufig die Compliance (Therapietreue) der Patienten. Auch für diesen Wirkstoff ist eine schnelle Entstehung resistenter HIV-Stämme beschrieben [141–143].

1.2.3. Gentherapeutische Alternativen zu Enfuvirtid

maC46 [144] und sC46 [145] stellen gentherapeutische Alternativen zur Injektion des Eintrittsinhibitors Enfuvirtid dar. Sowohl maC46 als auch sC46 leiten sich vom C46-Peptid ab. C46 ist ein C-Peptid, welches im Gegensatz zu Enfuvirtid aus 46 statt aus 36 Aminosäuren (AS) besteht. Die Verlängerung des C-Peptids erfolgte am N-Terminus, wodurch zusätzlich eine stark konservierte Tasche am C-Terminus des HR1 abgedeckt wird [146, 147]. Dieses verbessert nicht nur die Interaktion und somit die inhibitorische Aktivität des Peptids [148], es erschwert zusätzlich die Entstehung resistenter Varianten [148, 149]. maC46 entspricht der membrangebundenen Variante des C46 (exprimiert über den Vektor M87o) [144, 149]. Durch die Expression des membranverankerten C46 wird, wie auch bei Enfuvirtid, die Bildung des 6-Helix-Bündels blockiert und so die Fusion inhibiert [150]. MaC46-exprimierende autologe CD4⁺-T-Zellen wurden bereits in einer Pilotstudie bei HIV-Patienten mit cART-Therapieversagen infundiert [151]. Die T-Zell-Infusion wurde allgemein gut vertragen und es traten keine Nebenwirkungen durch die Modifikation der T-Zellen mit den γ -retroviralen Vektoren auf. Trotz eines signifikanten Anstiegs der totalen CD4⁺-T-Zellzahl wurde allerdings keine Akkumulation genmodifizierter Zellen beobachtet, obwohl *in vitro* ein Selektionsvorteil für modifizierte Zellen gezeigt werden konnte [144, 152]. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei den Patienten 3 Monate nach Transfusion eine Änderung des cART-Regimes vorgenommen werden musste. Dies führte bei den meisten Patienten zu einem Abfall der Viruslast und somit zu einer Verringerung des Selektionsvorteils der modifizierten Zellen [151].

Im Gegensatz zu maC46, welches nur die modifizierten Zellen selber, nicht aber benachbarte Zellen vor einer HIV-Infektion schützt [150], kann durch die Expression des sC46 ein breiterer Schutz vermittelt werden. sC46 stellt eine sezernierbare Version des C46 dar und wurde von unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe von Laer in Innsbruck entwickelt [145]. Um eine Sezernierung des C46-Peptids zu ermöglichen, mussten einige Optimierungen durchgeführt werden. Als erstes wurde durch die Fusion mit einem Signalpeptid, die Translokation ins ER ermöglicht. Hierfür wurde das Signalpeptid des *tissue-type plasminogen activator* (SPTPA) gewählt [153]. Mit einer Länge von 69 AS erfüllte dieses Peptid dennoch nicht die Größenanforderung von >50-80 AS für eine effiziente Sekretion [154, 155]. Durch Verlängerungen des Peptids mit Gerüstelementen des gp41, konnte zwar die Sekretion verbessert werden, eine antivirale Aktivität dieser Konstrukte wurde jedoch nicht beobachtet. Daher wurden sogenannte C46-Konkatemere konstruiert

(Abbildung 6). Hierfür wurden zwei C46-Peptide über eine proteolytische Schnittstelle miteinander fusioniert. Die (optimierte) Erkennungsstelle Fur_o für die zelluläre Protease Furin (flankiert von Glycin-Alanin-Linkern) ermöglichte eine Prozessierung der C46-Dimere in Monomere. Dadurch konnten die fusionsinhibitorischen Eigenschaften des C46 wiederhergestellt werden.

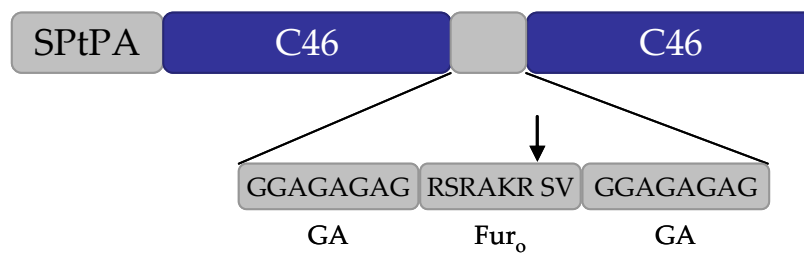


Abbildung 6 - Aufbau des sekretierbaren C46-Konkatemers sC46. Das Signalpeptid des *tissue-type plasminogen activators* (SPtPA) markiert sC46 für die Sekretion. Durch die Kopplung zweier C46-Peptide wird die kritische Größe für den effizienten Eintritt in den Sekretionsweg erreicht. Die optimierte Furin-Schnittstelle (Fur_o) mit flankierenden Glycin-Alanin-Linkern (GA) ermöglicht die proteolytische Spaltung (Pfeil) der Peptide im Trans-Golgi oder Extrazellulärraum und gewährleistet die antivirale Aktivität des C46 als Monomer. Abbildung modifiziert nach Egerer *et al.* (2011) [145].

Dieses attraktive antivirale Gen wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um das Potential primärer B-Zellen zur Sekretion therapeutischer Proteine/Peptide zu untersuchen.

1.2.4. Gentherapeutische Alternativen zu Maraviroc

Interessanterweise zeigt eine natürlich auftretende Mutation, dass eine CCR5-basierte Gentherapie theoretisch erfolgreich sein kann. Ca. 10 % der europäischen und westasiatischen Bevölkerung trägt eine Mutation dieses Korezeptors (CCR5Δ32; 10 % heterozygot, 1% homozygot) [156, 157]. Durch das Fehlen von 32 Nukleotiden im CCR5-Gen kommt es zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens, was eine Trunkierung des Proteins nach der vierten Transmembrandomäne (TM5) zur Folge hat [158]. Homozygote Träger weisen meist eine Resistenz gegenüber R5-tropen HIV-Stämmen auf [158-160]; in heterozygoten Trägern tritt der Krankheitsverlauf stark verzögert auf (*slow progressor*) [159, 161-164].

2009 berichteten Hütter und Kollegen, dass ein HIV-Patient, welcher aufgrund einer akuten myeloischen Leukämie mit hämatopoetischen Stammzellen eines passenden Spenders, der homozygot für CCR5Δ32 war, transplantiert wurde [165]. Obwohl der sogenannte „Berlin-Patient“ nach der Transplantation nicht mit cART behandelt wurde, blieb die HIV-RNA-Menge im peripheren Blut unterhalb der Nachweisgrenze und die CD4⁺-T-Zellzahl stieg an. 2011 galt dieser Patient als geheilt [166]. Da eine allogene Stammzelltransplantation mit schweren, potentiell tödlichen Nebenwirkungen verbunden ist und zudem die

Wahrscheinlichkeit, einen passenden Spender mit einer homozygoten CCR5 Δ 32-Mutation zu finden, äußerst gering ist [167], kann die in diesem Fall wirksame Therapie nicht für die allgemeine HIV-Therapie eingesetzt werden. Angesichts des Wirksamkeitsnachweises sind auf diesem Prinzip basierende gentherapeutische Ansätze jedoch äußerst vielversprechend. Die gentherapeutischen Alternativen können in Nukleinsäure- oder Protein-basierte Ansätze unterteilt werden [168, 169]. Zu den Nukleinsäure-basierten Wirkstoffen zählen z.B. Ribozyme, antisense-RNA und si/sh-RNA. Ribozyme sind enzymatisch aktive Ribonukleinsäuren, welche das Schneiden spezifischer RNAs katalysieren [170, 171]. Durch die Expression CCR5-spezifischer Ribozyme kann die Translation des Korezeptors herunterreguliert und die Zelle so vor einer Infektion mit R5-tropen HI-Viren geschützt werden [172–174]. Alternativ können auch RNA-Interferenzmechanismen genutzt werden [175]: Durch die Expression CCR5-spezifischer *antisense*-RNAs wird die CCR5-mRNA durch zelluläre Proteine abgebaut [176–180]. Es gilt zu berücksichtigen, dass die genannten Ansätze stets eine Herunterregulation des CCR5-Rezeptors induzieren: eine vollständige Suppression des HIV-Korezeptors ist meist nicht möglich. Daher werden CCR5-spezifische Nukleinsäuren häufig in Kombination mit anderen antiretroviralen Nukleinsäuren eingesetzt [181–183]. Zu den Protein-basierten Wirkstoffen zählen z.B. die sogenannten Intrakine. Diese sind künstlich hergestellte intrazelluläre Chemokine, welche an das ER gebunden sind und den jeweiligen Chemokinrezeptor dort ebenfalls zurückhalten. Ihre Wirksamkeit bei CCR5 konnte bereits gezeigt werden [184, 185].

Alle bisher genannten antiviralen Gene (inkl. C46) benötigen eine dauerhafte Expression, um einen lang anhaltenden Schutz der Zellen vor HIV zu gewährleisten. Alternativ kann aber auch durch den gezielten Knock-out eines zellulären Gens (z.B. CCR5) eine dauerhafte HIV-Resistenz vermittelt werden. Solch ein spezifischer Knock-out kann über sogenannte Designer-Nukleasen erreicht werden.

1.2.5. Designer-Nukleasen

Designer-Nukleasen werden für das sogenannte Genom-Editing, d.h. für gezielte Veränderungen des Erbgutes in somatischen Zellen, eingesetzt. Sie bestehen aus jeweils einer DNA-Bindungsdomäne, welche die Spezifität vermittelt, und einer Effektordomäne, welche im Fall der Nukleasen einen DNA-Doppelstrangbruch (DSB) induziert. Diese DSBs werden von zellulären Proteinen erkannt, woraufhin die Einleitung verschiedener Reparaturmechanismen erfolgt [186]. Je nach Reparaturmechanismus kann die Reparatur entweder präzise durchgeführt werden oder zu Deletionen und Insertionen (Indels) an der Zielsequenz führen [187]. Die Wahl des jeweiligen Reparaturmechanismus ist unter anderem abhängig vom Zellzyklus [188].

Eine präzise Reparatur entsteht vorwiegend durch die sogenannte homologe Rekombination [189, 190]. Bei diesem Mechanismus wird das Schwester-Chromatid als Vorlage verwendet

und so eine exakte Kopie des relevanten Abschnitts hergestellt. Dieses kann technisch genutzt werden: Durch das Bereitstellen einer geeigneten Vorlage (Matrix) wird an einer spezifischen Stelle im Genom ein Gen (Knock-in) oder eine Nukleotidsubstitution (Genkorrektur) eingefügt [191–193]. Beim Design muss jedoch beachtet werden, dass die Matrix über flankierende, homologe Bereiche verfügt, so dass sie von den Reparatur-enzymen als Vorlage erkannt wird.

Ein anderer möglicher Reparaturmechanismus ist die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ, *non-homologous end-joining*) [194, 195]. Hier können durch das Einfügen oder auch Entfernen von Nukleotiden die bereits genannten Indels entstehen. Dieses kann wiederum zu einer Verschiebung des Leserahmens (*frameshift*) führen, was in der Konsequenz einen Funktionsverlust (Knock-out) durch Trunkierung oder *nonsense-mediated-decay* (NMD) der RNA [196] bedeuten kann. Allerdings entstehen diese Indels unspezifisch und ungerichtet. Zwar gibt es die Möglichkeit, dass bestimmte Mutationen gehäuft auftreten (z.B. bei Mikrohomologien [194]), eine Steuerung des NHEJ-Ergebnisses ist aber bis zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Werden Zellen mit Designer-Nukleasen behandelt, ist die entstehende Population daher im Bezug auf die eingeführte Mutation polyklonal.

Auch bei den Designer-Nukleasen kann in Abhängigkeit von der DNA-Erkennungsdomäne zwischen Protein- und Nukleinsäure-basierten Systemen unterschieden werden. Das Nukleinsäure-basierte CRISPR/Cas-System (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) ist ursprünglich Bestandteil des bakteriellen adaptives Immunsystems [197, 198]. Hierbei bindet die sogenannte cr-RNA (CRISPR-RNA) an die Ziel-DNA und markiert diese für die Cas-Nukleasen. Damit die Cas-Nukleasen spezifisch nur crRNA-DNA Heteroduplexe schneiden, muss die crRNA zusätzlich von der tracr-RNA (*trans-activating crRNA*) erkannt werden, welche die Interaktion zwischen Nuklease und Zielsequenz vermittelt. Dieses System wurde erstmals im Frühjahr 2013 für das Genom-Editing in Säugerzellen benutzt [199–201]. Interessanterweise kann beim CRISPR/Cas-System ein sogenanntes *multiplexing* erfolgen, d.h. durch den Einsatz mehrerer crRNAs zusammen mit nur einer tracr-RNA und Cas-Nuklease können gleichzeitig mehrere Loci erkannt und geschnitten werden [200]. Es ist sogar möglich, dass die verschiedenen RNAs dabei auf nur einem Vektor transportiert werden. Dies ist gerade für technische Anwendungen sehr attraktiv. Für klinische Anwendungen bleibt allerdings abzuwarten, wie spezifisch diese neue Klasse der Designer-Nukleasen arbeitet.

Zu den Protein-basierten Systemen gehören unter anderem die Meganukleasen, Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und TAL-Effektor-Nukleasen (TALEN). Meganukleasen bestehen im Gegensatz zu den ZFN und TALEN nicht aus zwei separaten Proteinen. Bindet eine Meganuklease ihre Zielsequenz, so findet eine Konformationsänderung statt, durch welche die nukleolytische Domäne aktiviert wird [202]. Die Erkennungssequenz kann bis zu 40 Nukleotide lang sein, wodurch eine hohe Spezifität vermittelt wird. Dennoch werden z.T. Polymorphismen innerhalb der Erkennungssequenz toleriert [203]. Die Herstellung der

Meganukleasen ist sehr aufwendig und erfordert Computer-basiertes Design [204–206], wodurch Meganukleasen bislang keine breite Anwendung finden konnten.

Zinkfinger sind weit verbreitete DNA-Bindedomänen, welche über eine sehr konservierte Struktur verfügen [207]. Durch die Komplexierung eines Zinkions (meist über jeweils zwei Histidine und Cysteine) wird eine fingerartige Struktur geschaffen, an dessen Spitze durch eine gezielte Wahl der Aminosäuren die DNA-Erkennungssequenz definiert wird [208]. Ein Zinkfinger interagiert hierbei mit 3-4 Nukleotiden [209]. Durch die Kopplung mehrerer Zinkfinger kann die Erkennungssequenz verlängert werden. Die Herstellung der Zinkfinger-Multimere kann über modulare Systeme erfolgen, so dass theoretisch jedes beliebige Gen erkannt werden kann [210–212]. Allerdings ist die Interaktion eines Zinkfingers mit der DNA abhängig vom Kontext, d.h. von den benachbarten Zinkfingern [213]. Dies erschwert das Design, da es die Stringenz der einzelnen Finger herabsetzen kann. Dennoch können durch eine Kopplung mit einer Endonuklease wie z.B. FokI gezielte DSBs eingefügt werden [214]. Hierbei ist zu beachten, dass FokI erst nach Dimerisierung effizient schneidet (vgl. Abbildung 7c). Für einen DSB müssen daher stets 2 Arme hergestellt werden, deren Erkennungssequenzen durch einen sogenannten *spacer* getrennt sind [215]. Innerhalb dieses *spacers* kann die FokI den gewünschten DSB induzieren. CCR5-spezifische ZFN werden bereits in der klinischen Anwendung getestet (NCT00842634, NCT01044654). Neuere Studien zeigen allerdings, dass es bei ZFN mit relativ hoher Frequenz zu *off-target* Effekten, also dem Schneiden außerhalb der gewünschten Zielsequenz, kommen kann [216, 217].

2009 wurde mit der Entzifferung des Protein-DNA-Bindecodes durch Boch *et al.* [218] und Moscou *et al.* [219] eine neue Klasse von Designer-Nukleasen, die TALEN einer breiten Masse von Wissenschaftlern zugänglich. TAL-Effektoren stammen ursprünglich aus dem Phytopathogen *Xanthomonas* und sind somit, wie auch das CRISPR/Cas-System, bakteriellen Ursprungs [220]. Ihre Aufgabe ist die Modulierung der Genexpression innerhalb ihres Wirtes, um die Virulenz der Bakterien zu erhöhen. Ihre Funktionsweise kann hierbei als Mimikry von Transkriptionsfaktoren beschrieben werden.

TAL-Effektoren haben eine hochkonservierte Struktur (Abbildung 7a). Die DNA-Bindung wird durch eine Wiederholung nukleotidspezifischer Monomere vermittelt. Jedes dieser Monomere besteht aus 34 Aminosäuren. Nur 2 dieser Aminosäuren sind variabel: Position 12 und 13, genannt *repeat variable diresidues* (RVDs) [218, 219]. AS 13 ist für die Interaktion mit den jeweiligen Nukleotiden verantwortlich, wohingegen AS 12 essentiell für die Stabilität dieser Interaktion ist [221, 222]. Besteht z.B. ein RVD aus Histidin und Asparaginsäure, wird ein Cytosin auf DNA-Ebene gebunden. Bilden dagegen Asparagin und Isoleucin den RVD, wird ein Adenosin erkannt. So gibt es inzwischen für jedes Nukleotid ein oder mehrere RVDs, über welche eine spezifische Erkennung möglich ist [223, 224]. Diese Monomere können mittels einfacher Klonierungsmethoden aneinander gesetzt werden, sodass fast jede beliebige Erkennungssequenz erreicht werden kann [225–228]. Wie auch bei ZFN kann über die Kopplung der FokI-Nuklease an zwei TALE-Arme ein

spezifischer DSB vermittelt werden (Abbildung 7c) [229–231]. TALEN gelten bislang als relativ kontextunabhängig [228, 230, 231]. Außerdem gibt es Hinweise, dass durch die längere DNA-Bindedomäne im Vergleich mit ZFN eine geringere Zytotoxizität durch unspezifische Aktivität auftritt [231]. Dennoch ist der Transport der Proteine in die jeweilige Zielzelle aufgrund der Größe und der hohen Anzahl repetitiver Elemente problematisch [232].

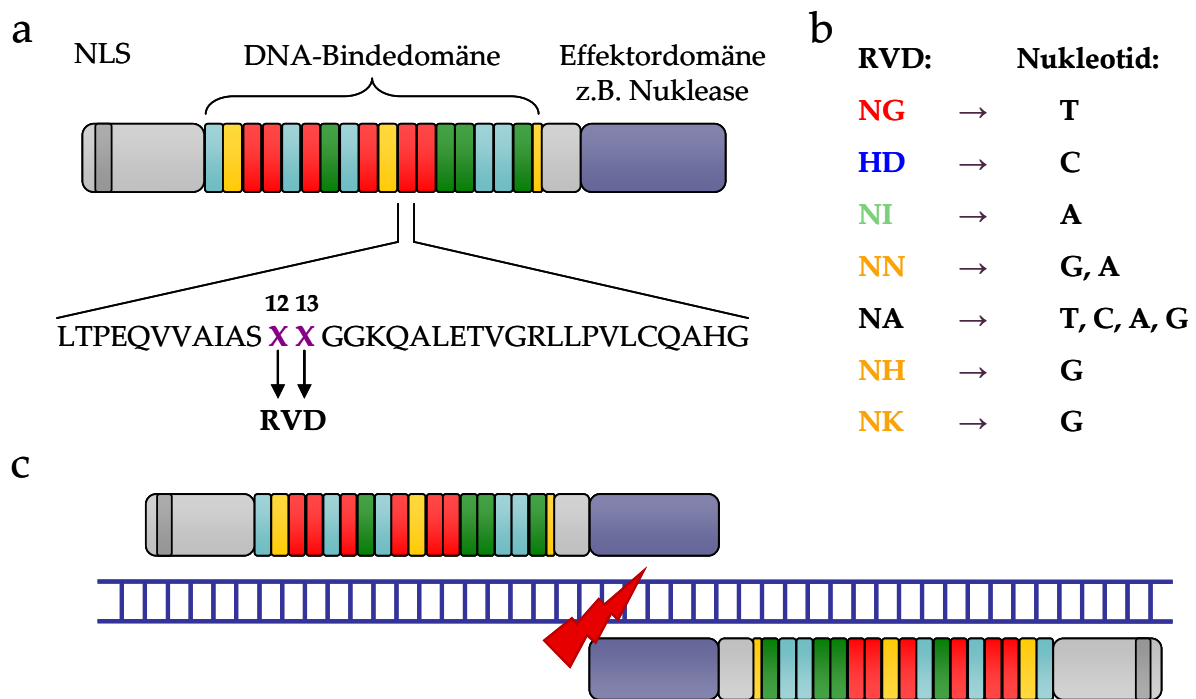


Abbildung 7 - Aufbau eines TAL-Effektors. (a) Schematische Darstellung eines TAL-Effektors nach Sanjana *et al.* (2012) [226]. Jede DNA-Bindedomäne besteht aus Monomeren (hier als farbige Blöcke dargestellt), welche jeweils 1 Nukleotid auf DNA-Ebene binden. Jedes Monomer besteht wiederum aus einer konservierten Aminosäureabfolge, bei der nur die Positionen 12 und 13 (RVD, *repeat variable diresidues*) variabel sind und die Spezifität des Monomers determinieren. Die enzymatische Funktion wird über die Effektordomäne vermittelt. Über die Kernlokalisierungssequenz (NLS) werden die TAL-Effektoren in den Nukleus transportiert. (b) Protein-DNA-Bindecode der TAL-Effektoren [223, 224]. Dargestellt sind die Aminosäuresequenz des RVD und die dadurch bestimmte Nukleotidspezifität. (c) Schematische Darstellung der Entstehung eines DSB. Jeweils ein rechter Arm (TALEN-R) und ein linker Arm (TALEN-L) binden an die Erkennungssequenz und ermöglichen eine Dimerisierung und somit Aktivierung der Nukleasedomäne. Der Ein-Buchstaben Code für Aminosäuren findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

Ein CCR5-spezifisches TALEN-Paar [231] wurde bereits von unseren Kooperationspartnern aus der Arbeitsgruppe von Prof. Cathomen (Universitätsklinikum Freiburg) entwickelt und uns freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

1.3. HIV-abgeleitete lentivirale Vektoren für die Gentherapie

Für den Transport genetischer Informationen (z.B. therapeutische Gene) in die gewünschten Zielzellen stehen diverse, sowohl virale als auch nicht-virale Vektorsysteme zur Verfügung. Alle Vektorsysteme haben ihre Vor- und Nachteile z.B. im Bezug auf Biosicherheit, Kapazität, Effizienz, Zytotoxizität und Immunogenität (detailliert in [233]). Ein Vorteil viraler Vektoren ist die meist höhere Effizienz, da der Eintritt in die Zelle rezeptorvermittelt und daher aktiv stattfindet (Transduktion). Durch Anpassung der viralen Hüllproteine (Pseudotypisierung) kann bei viralen Vektoren sogar eine Zellspezifität erreicht werden.

Wie bereits beschrieben, integrieren Retroviren ihr Genom stabil in das Wirtsgenom und können so nicht nur in der infizierten Zelle persistieren, sondern die genetische Information auch an die Tochterzellen weitergeben. Für die stabile Expression eines therapeutischen Transgens in sich teilenden Zellen sind retrovirale Vektoren daher das System der Wahl. Diese Eigenschaft wurde bereits in den 1980er Jahren ausgenutzt, als retrovirale Vektorsysteme für die stabile Expression von Transgenen verwendet wurden [234, 235]. Die ersten replikationsdefizienten HIV-1-abgeleiteten Vektoren wurden 1991 von Poznansky *et al.* [48] und Shimada *et al.* [236] entwickelt. Zusätzlich wurden auch auf anderen Viren basierende lentivirale Vektorsysteme hergestellt (z.B. HIV-2, SIV (*simian immunodeficiency virus*)) [237] – die breiteste Anwendung (bis hin zur klinischen Gentherapie) finden zur Zeit aber die HIV-1 abgeleiteten Viren [238]. Sie sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit und werden im Folgenden vereinfacht als lentivirale Vektoren (LVV) bezeichnet.

Der große Vorteil von LVV gegenüber anderen (retro-)viralen Vektoren besteht in der Möglichkeit, auch ruhende Zellen zu transduzieren (siehe 1.1.2; [33, 34]). Da in den frühen Vektorsystemen durch Rekombinationen leicht replikationskompetente Lentiviren (RCL, *replication competent lentiviruses*) entstehen konnten, bargen diese Vektoren zunächst ein zu großes Sicherheitsrisiko. Die Entwicklung sicherheitsoptimierter lentiviraler Systeme wird im folgenden Absatz beschrieben

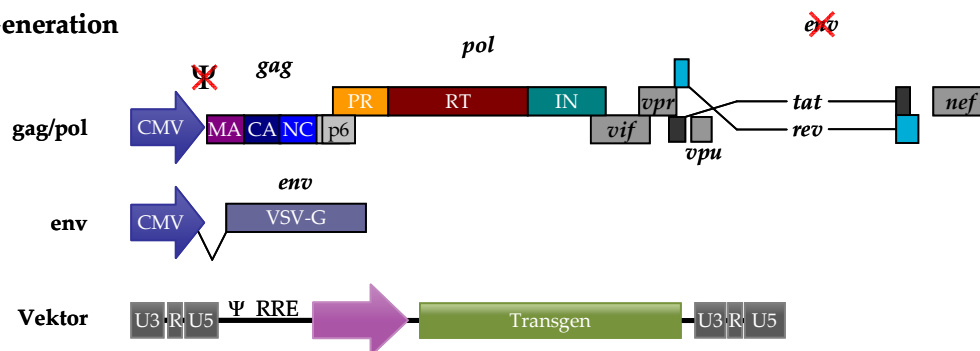
1.3.1. Entwicklung lentiviraler Vektorsysteme

Lentivirale Vektorsysteme werden in Abhängigkeit von ihrem Aufbau in 3 Generationen unterteilt (Abbildung 8) [237, 239].

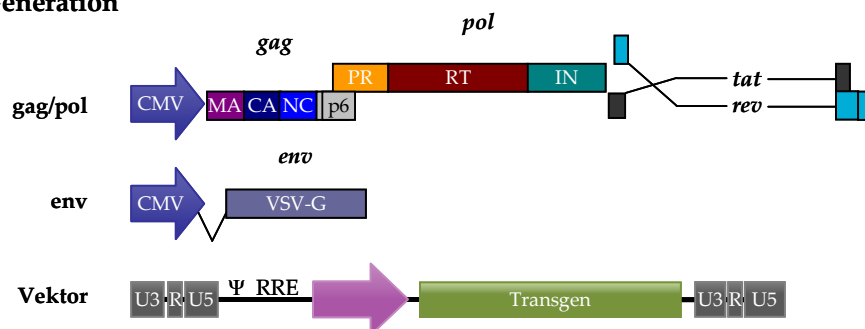
- 1. Generation [240–242]: Bei diesem System sind die einzelnen Komponenten auf 3 separaten Vektoren kodiert. Das reduziert nicht nur das Entstehungsrisiko von RCL, es schafft auch Platz für die Expression des gewünschten Transgens. Das Vektorplasmid enthält die verpackungsrelevanten Elemente ψ und RRE sowie die flankierenden LTRs. Letztere ermöglichen die reverse Transkription und die Integration in der Zielzelle. Zusätzlich kodiert das Vektorplasmid für das Transgen - nicht aber für virale Proteine. Da somit kein Tat-Protein in der Zielzelle zur Verfügung steht, ist die Aktivität des HIV-1 Promotors drastisch reduziert. Die Verwendung eines internen Promotors ist

erforderlich. Die viralen Proteine sind mit Ausnahme des Hüllproteins (Env) auf dem gag/pol-Plasmid kodiert. Als Hüllprotein können neben gp160 auch andere Glykoproteine gewählt werden (z.B. Glykoprotein des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV-G)). Neben der Verbesserung der Sicherheit kann so über die Pseudotypisierung auch eine flexible Anpassung des viralen Partikels an die jeweilige Zielzelle erfolgen. Da weder das env- noch das gag/pol-Expressionsplasmid über eine Verpackungssequenz verfügen, können sie keine verpackungsfähigen RNA-Genome bilden. Die Produktionsweise über getrennte Plasmide wird auch Komplementierungsprinzip genannt.

1. Generation



2. Generation



3. Generation

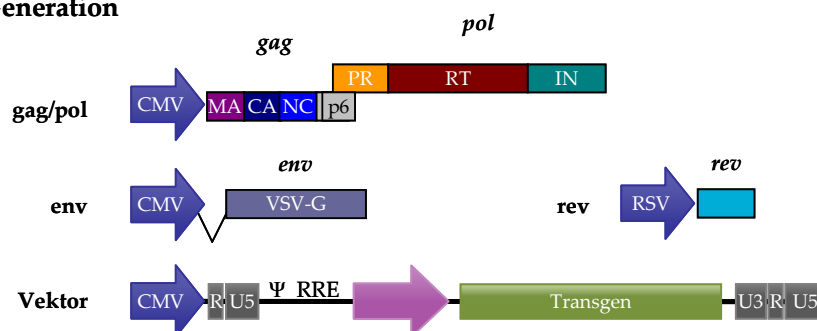


Abbildung 8 - Schematische Darstellung lentiviraler Vektorsysteme. Die 3 Generationen lentiviraler Vektoren unterscheiden sich in der Anzahl der verwendeten lentiviralen Komponenten. LVV der 1. Generation (oben) beinhalten alle viralen Gene. Bei Vektoren der 2. Generation wurden die akzessorischen Gene entfernt. Vektorplasmide der dritten Generation benötigen durch die Verwendung eines CMV-Promotors statt des HIV-1 Promotors keine Koexpression von Tat. Abbildung modifiziert nach Sakuma *et al.* [239] und Cockrell & Kafri [237]. Nicht maßstabsgetreu.

- 2. Generation [243]: Da für Lentiviren der 1. Generation die Bildung von RCL nur reduziert, nicht aber ausgeschlossen werden konnte, wurden für eine weitere Optimierung des Sicherheitsprofils die akzessorischen Proteine (siehe 1.1.1 und 1.1.2) deletiert. Bei der (sehr unwahrscheinlichen) Entstehung von RCL wäre so die Virulenz stark herabgesetzt.
- 3. Generation [244]: Bei Vektoren dieser Generation konnte durch den Ersatz des lentiviralen Promotors im 5'LTR durch einen Tat-unabhängigen mit *tat* ein weiteres virales Gen entfernt werden. Die Expression des Rev-Proteins über ein 4. Konstrukt reduziert weiter die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von RCL.

Parallel wurde durch die Entwicklung selbstinaktivierender (SIN) Vektoren die Sicherheit weiter erhöht (Abbildung 9) [245].

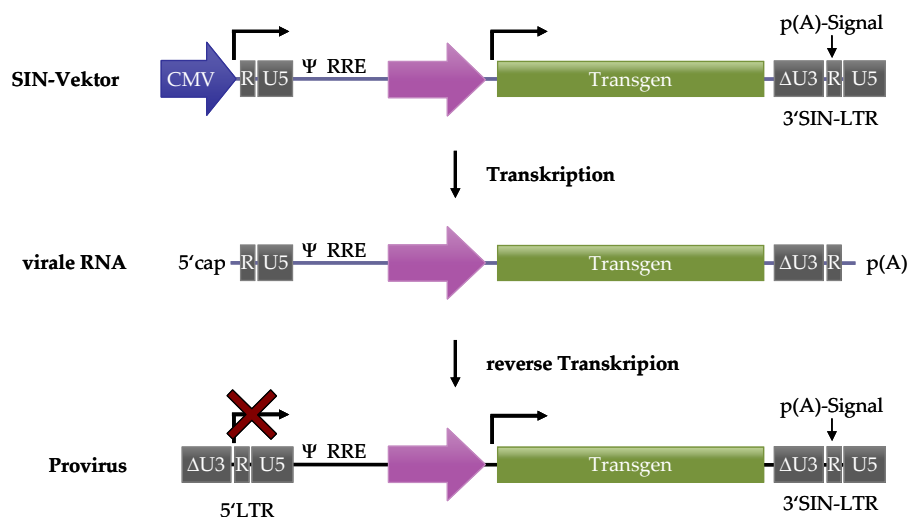


Abbildung 9 - Selbstinaktivierende (SIN) lentivirale Vektoren. Schematische Darstellung der Funktionsweise von SIN-Vektoren am Beispiel eines LVV der 3. Generation. Durch eine Deletion in der U3-Region (einzigartige Region im 3'LTR der viralen RNA) des Vektorplasmids ($\Delta U3$) ist der HIV-1-Promotor inaktiviert. Die virale RNA entsteht durch die CMV-abhängige Transkription. Bei der reversen Transkription der viralen RNA in der Zielzelle wird die $\Delta U3$ -Region dupliziert und in den 5'LTR übertragen. Eine Entstehung von viraler RNA auf Basis des Provirus ist durch den fehlenden Promotor im 5'LTR nicht mehr möglich. Nicht maßstabsgetreu.

Ein kritisches Element zellulärer mRNAs ist das p(A)-Signal in der 3' untranslatierten Region (3'UTR), welches bei der Transkription das Schneiden und Anhängen von 150-250 Adenosinen einleitet [246]. Neben der Förderung der Terminierung der Transkription [247, 248], erhöht dieser sogenannte poly(A)-Schwanz auch die mRNA-Stabilität [249, 250] und die Translationsinitiation [251–253]. Im Falle von HIV (und den davon abgeleiteten lentiviralen Vektoren) liegt das p(A)-Signal in der duplizierten R-Region der LTRs [254]. Somit kommt das p(A)-Signal nicht nur im 3'LTR sondern auch im 5'LTR vor. Um eine Polyadenylierung jedoch auf das 3'-Ende der mRNA zu beschränken, haben HI-Viren verschiedene Mechanismen akkumuliert, die eine 3'-Polyadenylierung fördern, eine 5'-Polyadenylierung

hingegen inhibieren [255]. Hierzu gehört unter anderem das *upstream element* (USE) in der U3-Region, über welches p(A)-bindende Proteine rekrutiert werden [256, 257]. Bei SIN-Vektoren ist jedoch das USE deletiert [245]. Dies könnte zu einer verminderten Terminierung und somit auch zu einer Reduktion der Genexpression führen [258, 259].

Da die heutigen Vektorsysteme für kein einziges virales Gen kodieren, verfügen sie über eine Kapazität von ca. 9 kb für Fremd-DNA. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten SIN-Vektoren des LeGO-Systems (*lentiviral gene ontology*) [260, 261] sind zusätzlich mit Elementen ausgestattet, welche die Expression des Transgens signifikant verstärken:

- 1.) wPRE [262]. Das *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* verbessert neben der Steigerung der Polyadenylierung [263] auch den Kernexport gespleißter und ungespleißter RNA [264].
- 2.) cPPT [265]. Der zentrale Polypurintrakt entstammt dem HIV-1 *pol* und verbessert den Import in den Nukleus [266, 267].
- 3.) SFFV. Der Promotor des *Spleen Focus Forming Virus* sorgt vor allem in hämatopoetischen Zellen für eine effiziente Expression [268, 269].

Die schematische Darstellung eines LeGO-Vektors findet sich in Abbildung 10. Vorteil des LeGO-Systems ist der modulare Aufbau und somit die flexible Anpassung der Vektoren an die jeweiligen Anwendungsgebiete. So kann z.B. durch das Einfügen eines U6- oder H1-Promotors auch shRNA stabil in Zellen exprimiert werden, was die dauerhafte Herunterregulation eines gewählten Zielgens zur Folge ermöglicht. Zusätzlich ist durch den Einsatz einer Vielzahl fluoreszierender Reportergene eine Markierung und durch die Verwendung von z.B. Antibiotikaresistenzen eine Selektion der modifizierten Zellen möglich.



Abbildung 10 - Schematische Darstellung eines LeGO-Vektors. Am Beispiel eines LeGO-Vektors (LeGO-G2) für die Expression des Reporterproteins eGFP (enhanced green fluorescent protein) ist die Anordnung der Elemente cPPT (zentraler Polypurintrakt; verbesserter Import des Präintegrationskomplexes), SFFV (Promotor des *Spleen Focus Forming Virus*; effiziente Expression in hämatopoetischen Zellen) und wPRE (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*; Steigerung der Polyadenylierung und des Kernexports ungespleißter RNA) gezeigt. Abbildung verändert nach Weber *et al.* (2008) [260]. Nicht maßstabsgetreu.

1.3.2. Lentivirale Vektoren für die transiente Expression

Für einige gentherapeutische Ansätze ist eine stabile Expression durch Integration nicht notwendig oder sogar kontraproduktiv. Nicht notwendig wäre z.B. eine vererbare Integration in ausdifferenzierten, ruhenden Zellen. Hier wird die genetische Information nicht durch Zellteilungen aufgeteilt oder geht gar verloren. In ruhenden Zellen können daher nicht-integrierende Vektorsysteme verwendet und somit das Risiko der sogenannten

Genotoxizität durch Insertionsmutagenese minimiert werden [270, 271]. Wenn auch bei ausdifferenzierten Zellen ein nur sehr geringes Risiko der malignen Transformation besteht, ist ein Restrisiko nicht auszuschließen. So könnten auch hier durch die Integration retroviraler Vektoren z.B. benachbarte Transgene (im schlimmsten Fall Onkogene) transaktiviert werden [272]. Dies wurde bereits für γ -retrovirale Vektore bei der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen beschrieben und führte in der klinischen Anwendung zu schweren Nebenwirkungen [273]. Die Integration von Retroviren erfolgt nicht rein zufällig: γ -Retroviren integrieren bevorzugt in die Nähe des Transkriptionsstarts aktiver Gene. Lentiviren hingegen favorisieren die Integration innerhalb transkribierter Gene. Eine Präferenz für den Transkriptionsstart und andere regulatorische Bereiche liegt nicht vor [274–276]. Lentiviren gelten daher als potentiell weniger genotoxisch.

Durch die Verwendung nicht-integrierender Vektoren wie Adenoviren oder Adeno-assoziierten Viren (AAV) wird in ruhenden Zellen eine stabile Expression durch episomale DNA erreicht. Um auch Zellen zu erreichen, bei denen diese Vektorsysteme nur unzureichend funktionieren oder wenn die Immunogenität der genannten Viren [277] ein zu großes Risiko darstellt, wurden sogenannte nicht-integrierende lentivirale Vektoren (NILV) entwickelt [278, 279]. Bei diesen Vektoren wurde durch den Austausch einer Asparaginsäure durch ein Valin (D64V) im aktiven Zentrum eine enzymatisch inaktive Integrase hergestellt [280] (vgl. Abbildung 1). Wird diese Integrasevariante bei der Produktion lentiviraler Vektoren verwendet, findet keine Integration der lentiviralen Vektor-DNA ins Wirtsgenom statt. Die Expression des Transgens erfolgt nun, vergleichbar mit Adeno- und Adeno-assoziierten Viren, über episomale DNA.

Eine weitere Anwendung finden transiente Vektorsysteme in der Expression von Designer-Nukleasen. Da Designer-Nukleasen mit dem Schneiden ihrer Zielsequenz ihre Aufgabe erfüllt haben, ist eine kurzfristige Expression ausreichend. Eine andauernde Expression ist sogar unerwünscht, da sie möglicherweise zu einer Re-Mutation oder auch zu *off-target*-Effekten führen würde. NILV wurden bereits erfolgreich für die Transduktion mit ZFN verwendet [281]. Nachteilig ist aber, dass es bei DNA-basierten Systemen zu spontanen Integration kommen kann. Dies wurde für lentivirale [282], aber auch für Adeno-assoziierte [283] und adenovirale [284] Systeme beschrieben. Durch die gleichzeitige Verwendung von DSB-induzierenden Nukleasen kann die spontane Integration sogar noch verstärkt werden. Gezeigt wurde dies im Zusammenhang des sogenannten *mappings* von *off-target* Effekten der ZFN [216].

1.4. Fragestellung

Die Entwicklung der kombinierten antiretroviralen Therapie hat zu einer enormen Verbesserung der Lebenserwartung und –qualität der HIV-Patienten geführt. Jedoch ist für eine Kontrolle der Infektion eine lebenslange, konsequente Einnahme der Medikamente zwingend notwendig. Eintrittsinhibitoren stellen eine sehr attraktive Wirkstoffklasse in der antiretroviralen Therapie dar, da sie bereits das Eindringen der viralen Partikel in die Zelle verhindern. Gentherapeutische Ansätze könnten eine dauerhafte Expression antiviraler Gene vermitteln, wodurch auf die Einnahme oder Injektion antiviraler Wirkstoffe verzichtet werden könnte.

Lentivirale Vektoren sind sehr potente Werkzeuge zum stabilen aber auch transienten Transport verschiedener Transgene. Im Gegensatz zu anderen retroviralen Vektoren können sie auch ruhende Zellen transduzieren und zeigen außerdem eine potentiell ungefährlichere Integrationspräferenz. Durch die einfache Produktion nach dem Komplementierungsprinzip ist die modulare Anpassung der lentiviralen Vektoren an die jeweilige Fragestellung möglich. So können z.B. durch die Wahl der Hüllproteine die viralen Partikel der jeweiligen Zielzelle angepasst werden. Außerdem kann durch Austausch der Enzymvarianten flexibel bestimmt werden, ob die Expression der Transgene stabil oder transient erfolgen soll.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung lentiviraler Vektorsysteme für zwei unterschiedliche Ansätze der HIV-Gentherapie.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression und Sekretion des Fusionsinhibitors sC46 über lentiviral modifizierte B-Zellen behandelt. Hierbei handelt es sich um ein Peptid, welches bereits erfolgreich in der Therapie eingesetzt wird. Die ständigen Injektionen führen jedoch zu Nebenwirkungen und einer schlechten Compliance der Patienten. Humane B-Zellen stellen als langlebige und sekretionsaktive Zellen sehr interessante Kandidaten für die Sekretion des antiviralen Peptids dar. In Kombination mit integrierenden lentiviralen Vektoren könnten so körpereigene „Fabriken“ geschaffen werden. Hierfür sollte ein effizientes Protokoll zur lentiviralen B-Zell-Transduktion entwickelt und die Vektoren der Expression in B-Zellen angepasst werden.

Schwerpunkt des zweiten Teils der Arbeit war die Entwicklung eines lentiviralen Systems für die transiente Expression CCR5-spezifischer TALEN. Aufgrund einer natürlich vorkommenden Mutation im HIV-Korezeptor CCR5 ist bekannt, dass Menschen bei Abwesenheit dieses Proteins resistent gegenüber einer R5-tropen HIV-Infektion sind. Durch die Verwendung von Designer-Nukleasen wie der TAL-Effektor-Nukleasen können sequenzspezifisch Knock-outs des CCR5-Gens induziert werden, welche diese HIV-Resistenz vermitteln. In dieser Arbeit sollte ein neuartiges lentivirales System für die transiente Expression entwickelt werden, welches den effizienten Gentransfer der TAL-Effektor-Nukleasen erlaubt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Laborausstattung und Geräte

Im Folgenden werden nur die für die Datenerhebung relevanten Geräte aufgeführt. Die übrigen Geräte wie Zentrifugen, Pipetten und Thermocycler entsprechen dem heutigen Laborstandard und werden nicht gesondert gelistet.

Anwendung		Firma
<u>Analytische Durchflusszytometrie:</u>		
FACS CantoII	(Laser: 407 nm, 488 nm, 633 nm)	BD Biosciences
FACS LSRFortessa	(Laser: 405 nm, 488 nm, 561 nm, 640 nm)	BD Biosciences
FACS LSRII	(Laser: 350 nm, 405 nm, 488 nm, 633 nm)	BD Biosciences
<u>FACS/Zellsortierung:</u>		
FACS AriaIII	(Laser: 407 nm, 488 nm, 561 nm, 633 nm)	BD Biosciences
<u>ELISA:</u>		
Sunrinse Basic		Tecan
<u>Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen:</u>		
Nanodrop 1000		ThermoScientific

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Anwendung	Firma
0,2-, 0,5-, 1,5-, 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
15-, 50 ml Reaktionsgefäße	Falcon
30 ml Reaktionsgefäße	Greiner
10-cm Schalen für die Molekularbiologie	Greiner
10-cm Schalen für die Zellkultur	Sarstedt
24-Loch-Platten für die Suspensionskultur	Greiner
96-, 24-, 12-, 6-Loch-Platten für die Zellkultur	Greiner
ELISA-Platte, Microton	Greiner
Filter für Einzelzellsuspensionen (70 µm)	Partec
Sterilfilter (0,45 µm)	Whatman

2.1.3. Reagenzien, Puffer und Medien

Bei allen Reaktionen wurde zur Verdünnung sowie zum Ansetzen der Lösungen und Puffer Reinstwasser (H₂O, Filtration durch membraPure-Anlage (Membrapure)) verwendet. Für die Verwendung in der Zellkultur wurde das Reinstwasser zusätzlich im Autoklaven sterilisiert.

2.1.3.1. Für die Molekularbiologie

Reagenzien:

6 x DNA Loading Dye
 6 x Orange DNA Loading Dye
 Agarose – Ultrapure
 Ampicillin/Kanamycin
 Adenosintriphosphat (ATP)
 Ethidiumbromid
 Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder
 Glycerol
 Oligonukleotide (dNTPs)

Firma:

Fermentas
 Fermentas
 Invitrogen
 Carl Roth
 Fermentas
 Invitrogen
 Fermentas
 Sigma-Aldrich
 Fermentas

Puffer:

1 x Oligo-*annealing* Puffer (in H₂O)
 10 mM Tris (pH 7,5 - 8,0)
 50 mM NaCl
 1 mM EDTA
 50 x TAE-Puffer

Merck
 Roth
 Sigma-Aldrich
 Invitrogen

Medien:

Agar-Agar Kobe I
 LB-Medium (Lennox)

Roth
 Roth

2.1.3.2. Für die Zellkultur

Reagenzien:

AccuCheck *counting beads*
 β-Mercaptoethanol (50 mM)
 BSA (Albumin bovine Fraction V, Solution 7,5 %)
 CaCl₂
 Chloroquin
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 FCS (fetales Kälberserum)
 Biocoll Separating Solution (1,077 g/ml)

Firma:

Invitrogen
 Gibco
 Sigma-Aldrich
 Merck
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 Lonza
 Biochrom AG

Flebogamma (5 %-Lösung)	Grifols
G418 (Geneticin)	Sigma-Aldrich
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	ICN Biomedicals
HEPES (1 M)	Gibco
Hygromycin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco
Penicillin/Streptomycin (Pen Strep)	Gibco
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid Staining Solution (50 µg/ml)	BD Biosciences
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich
Puromycin	PAA
RetroNectin	TaKaRa
Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Gibco

Puffer:

D-PBS	Gibco
FACS-Puffer (in PBS)	
2 % FCS	Lonza
0,1 % NaN ₃	Merck
2 x HBS (in H ₂ O)	
42 mM HEPES	ICN Biomedicals
280 mM NaCl	Roth
10 mM KCl ₂	Roth
1,5 mM Na ₂ HPO ₄	Merck
11 mM Glukose	Roth
pH 7,05	
RetroNectin-Block-Puffer (in PBS)	
2 % BSA	Lonza
RetroNectin-Puffer (in HBSS)	
25 mM HEPES	Gibco
MACS-Puffer (in PBS)	
0,5 % BSA	Sigma-Aldrich
2 mM EDTA	Sigma-Aldrich

Medien:

DMEM GlutaMAX I	Gibco
RPMI 1640	Gibco
X-VIVO 10	Lonza

2.1.3.3. Für die Proteinbiochemie

Reagenzien:

Streptavidin HRPO

TMB SureBlue Microwell

TMB Stop Solution

Firma:

BD Biosciences

KPL

KPL

Puffer:
Bicarbonat-Puffer pH 10,8 (in H₂O)50 mM NaHCO₃50 mM Na₂CO₃

pH 10,8

Merck

Roth

Block-Puffer (in PBS)

1 % BSA

Sigma-Aldrich

Wasch-Puffer (in HBSS)

Gibco

0,05 % Tween20

Promega

2.1.3.4. Für tierexperimentelle Arbeiten

Reagenzien:

Baytril 100

Firma

Bayer

Puffer:
Erylyse-Puffer (in H₂O)155 mM NH₄Cl1 mM KHCO₃

0,1 mM EDTA

pH 7,4

Sigma-Aldrich

Merck

Sigma-Aldrich

2.1.4. Plasmide

Plasmid

LeGO-G2

LeGO-iG2

LeGO-iS2

LeGO-iT2

Referenz
[260] Weber *et al.* (2008)

T60

[145] Egerer *et al.* (2010)

pAC-CMV-TALE-RM1-long-FokI-1317

[285] Mussolino *et al.* (2011)

pAC-CMV-TALE-RM2-long-FokI-1318

2.1.5. Oligonukleotide

Die im Folgenden genannten Oligonukleotide sind in 5' → 3' Richtung und mit dem jeweiligen Verwendungszweck aufgeführt. Bei der Beschreibung wird F für Vorwärts- und R für Rückwärtsorientierung verwendet. Die Rekonstitution erfolgte (mit Ausnahme von u47/u48) in H₂O.

Name	Verwendungszweck (Quelle)	Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')
u1.1	hEμMAR (NheI)-F	GGCTAGCAGGATTGTTTATCTTAGGAGGCA
u1.2	hEμMAR (NheI)-R (Modifiziert nach [286])	GGCTAGCTATCTGATTGAGTTTTCTCTTATGCC
u1	hCCR5-F	GGGATCCGGTGAACAAGATGGAT
u2-opt	hCCR5-R (Modifiziert nach [287])	AGCGGCCGCCCCTTGAGTCCGTGTCACA
u8	T7E1 CCR5-F	AAGATGGATTATCAAGTGTCAAGTCC
u9	T7E1 CCR5-R (Modifiziert nach [231])	GATGATTCCTGGGAGAGACGC
u28	TALEN-seq F1	AGTCCTCCGACAGACTGAGT
u29	TALEN-seq R1	TGCAGGTCGACTCTAGAGTC
u30	TALEN-seq F2	TGCATGCATGGCGCAAT
u31	TALEN-seq R2	AACTGGGCAACAATGCTCTC
u40	TALEN-F 1st PCR	ATCTACGCACGCTCGGCTA
u41	TALEN-R 1st PCR	CTGCTTGGCCAATTGGCAGAT
u42	TALEN-F 2nd PCR	AAGGTTCTGTTGACAGTGG
u43	TALEN-R 2nd PCR	CACACCGTAATCAATAGGAGATC
p74	SFFV-F	ATCAGCCTGCTTCTCGCTT
u37	wPRE-R	CATACGGGAAGCAATAGCATGATAC
u44	pMDL_gp_RRE_R	ACAATGAGACACCA
u45	pMDL_gp_RRE_F	GATATGTCCATTGGCCTTGCCC
u46	pMDL_gp_RRE_mut	TACATACAAC <u>CACCAC</u> CATGTAT
u47	iTALEN oligo sense	CATGGGCTACCCTTACGACGTGCCTGACTACGCC TCTAGACCCAAGAAAAAGCGGAAAGTGGGCAT CCACG
u48	iTALEN oligo antisense	CTAGCGTGGATGCCCACTTCCGCTTTTCTTGGG TCTAGAGGCGTAGTCAGGCACGTCGTAAGGGTA GCC
u58	BGH-p(A)-F	GCTGTACAAGTAACTGTGCCTTCTAG
u59	BGH-p(A)-R	GCTGTACAGCCATAGAGCCAC

u60	SV40-p(A)-F	GCTGTACAAGTAAACTTGTTTATTGCAGC
u61	SV40-p(A)-R	GCTGTACACAGACATGATAAGATACATTGATGA GT
M13 uni	TOPO-TA F	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13 rev	TOPO-TA R (Invitrogen)	GAGCGGATAACAATTCACACAGG
pJET F	pJET 1.2 F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET R	pJET 1.2 R (Fermentas)	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

2.1.6. Enzyme

Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben in den entsprechenden Puffern verwendet. Die Auflistung der Restriktionsenzyme erfolgt gesondert.

Enzym	Firma
DreamTaq DNA Polymerase	Fermentas
FastAP Thermosensitive Alkalische Phosphatase	Fermentas
Klenow Fragment	Fermentas
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 DNA Polymerase	Promega
T4 Polynucleotide Kinase	Fermentas
T7 Endonuclease 1	NEB
Restriktionsenzym	Firma
AgeI	Promega
ApaI	Fermentas
BamHI	Fermentas
BsrGI	Fermentas
HpaI	Fermentas
NcoI	Fermentas
NheI	Fermentas
NotI	Fermentas
PacI	NEB
PstI	Fermentas
PvuII	Fermentas
SacI	Promega
SacII	Fermentas

2.1.7. Kits

Kit	Firma
CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas
DyLight 633 Microscale Antibody Labeling Kits	Thermo Scientific
Fix & Perm	Invitrogen
HIV-1 p24 Antigen ELISA 2.0	Zeptomatrix
Human B cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec
NucleoSpin RNA Virus-Kit	Macherey-Nagel
Protein Biotinylation Module	Amersham ECL
PureLink HiPure Plasmid Filter Maxi	Invitrogen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

2.1.8. Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind im Folgenden aufgelistet. Die entsprechenden Isotyp-Kontrollen zu den Antikörpern wurden von der jeweiligen Firma bezogen und in derselben Konzentration eingesetzt.

Antigen	Fluorochrom	Klon	Firma
<i>Anti-human</i>			
Fc-Block (human): Anti-A,B BioClone	-	polyklonal	Ortho-Clinical Diagnostics
CD10	APC	H10a	BD Biosciences
CD19	APC	HIB19	BD Biosciences
CD19	Pacific Blue	HIB19	Biolegends
CD19	PerCP	4G7	BD Biosciences
CD27	APC-eFluor®780	O323	eBioscience
CD38	PE	HB7	BD Biosciences
CD45	APC	J.33	Beckman Coulter
CD195 (CCR5)	APC-Cy7	2D7/CCR5	BD Biosciences
CD195 (CCR5)	PerCP/Cy5.5	HEK/1/85a	Biolegends
sIgM ⁺	PerCP/Cy5.5	MHM-88	Biolegends
IgG (für ELISA)	-	polyklonal	DAKO
HIV-1 gp41 (2F5)	-	2F5	Polymun

Antigen	Fluorochrom	Klon	Firma
<i>Anti-murin:</i>			
Fc-Block (murin): Purified anti-mouse CD16/CD32	-	93	Biologends
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	BD Biosciences

2.1.9. Stimulantien

Stimulanz:	Firma:
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen
IL-2 (Proleukin/Aldesleukin)	Prometheus
IL-4 (Interleukin-4)	Immunotools

2.1.10. HIV-Eintrittsinhibitoren

Eintrittsinhibitor:	Firma
C46 (synthetisches Peptid in 50 % DMSO/H ₂ O)	Gene Cust
Sequenz N → C-terminal: WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFRSRAKR	
Enfuvirtid (T-20, Fuzeon) in H ₂ O	Roche

2.1.11. Materialien für tierexperimentelles Arbeiten

Der verwendete Mausstamm BALB/cA-RAG2KO,IL2R γ KO wurde von der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Er wird im Folgenden Rag2^{-/-} γ c^{-/-} genannt.

2.1.12. Software

Software	Firma
BD FACSDiva 6.0	BD Biosciences
Fiji (ImageJ)	Schindelin <i>et al.</i> (2012) [288]
Gimp 2.6	Gimp.org
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.
Office Excel 2003	Microsoft Corporation
pDRAW32	AcaClone software

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung linearer DNA-Moleküle nach ihrer Fragment-Größe wurde die Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die verwendeten Agarosekonzentrationen lagen im Bereich von 0,8 – 2 %. Das für die Elektrophorese angelegte elektrische Feld hatte eine Stärke von 7,5 -10 V/cm. Zur Detektion der DNA wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Licht im Transilluminator dargestellt.

2.2.2. Plasmidpräparationen

Für analytische Plasmidpräparationen wurde das Kit QIAprep Spin Miniprep nach Anleitung des Herstellers verwendet. Plasmidpräparationen im präparativen Maßstab erfolgten mit Hilfe des PureLink HiPure Plasmid Filter Maxi-Kits.

2.2.3. Präparation genomischer DNA

Für die Präparation genomischer DNA aus primären Zellen und Zelllinien wurde das QIAamp DNA Blood Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet. Abweichend vom Protokoll erfolgte die Elution in 75 µl H₂O.

2.2.4. Verwendung von Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die an DNA binden und diese positionsspezifisch schneiden können. Für analytische Ansätze wurde bis zu 1 µg Plasmid-DNA mit 1 U des jeweiligen Enzyms für 10 min – 2 h bei 37 °C inkubiert. Für präparative Ansätze wurden bis zu 4 µg mit 4 U der jeweiligen Restriktionsenzyme inkubiert.

2.2.5. Modifikationen der DNA-Enden

Nach der Inkubation mit den Restriktionsendonukleasen wurden die DNA-Enden z.T. noch weiter angepasst. Für Klonierungen, die glatte Enden, also Enden ohne 5' oder 3' Überhang, benötigten, wurden die 5' oder 3'-Enden entweder exonukleolytisch entfernt oder über eine DNA-Polymerase aufgefüllt.

Verwendung der T4 DNA Polymerase

Die Entfernung der 3'-Überhänge erfolgte über die 3'-5' exonukleolytische Funktion der T4 DNA Polymerase nach Herstellerangaben. Hierfür wurde das Volumen des Restriktionsansatzes mit 1 x Polymerase-Puffer angepasst und mit jeweils 100 µM dNTPs und 5 U der T4 DNA Polymerase versetzt. Die Reaktion erfolgte für 5 min bei 37 °C.

Verwendung des Klenow-Fragments

Das Auffüllen von 5'-Überhängen erfolgte mit Hilfe der DNA-Polymeraseaktivität des Klenow-Fragments nach Herstellerangaben. Hierfür wurde der Restriktionsansatz in dem vom Hersteller mitgelieferten 1 x Klenow-Puffer resuspendiert und 5 U des Klenow-Fragments sowie 0,05 mM dNTPs hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 10 min. Die Inaktivierung des Enzyms wurde bei 75° C für weitere 10 min durchgeführt.

Verwendung der Alkalischen Phosphatase

Um bei der Herstellung neuer Plasmidvarianten eine Selbstligation der Vektor-DNA zu vermeiden, wurden die 5' Phosphatreste an linearisierten Plasmiden entfernt. Dieses erfolgte während des Restriktionsverdau mithilfe der FastAP Thermosensitiven Alkalischen Phosphatase nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde zum Restriktionsansatz 1 U FastAP zugegeben und wie in 2.2.4 angegeben inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung der FastAP bei 75 °C für 5 min wurde nur dann durchgeführt, wenn keine weitere Aufreinigung oder Trennung der DNA durch Agarosegelelektrophorese nötig war.

Verwendung der T4 Polynucleotide Kinase

Für das Einfügen von PCR-Fragmenten und synthetisch hergestellten Oligonukleotiden in dephosphorylierte Vektoren ist es notwendig, die 5'-Enden der Fragmente zu phosphorylieren. Hierfür wurde die T4 Polynucleotide Kinase nach Herstellerangaben verwendet. Zu 20 pmol linearer DNA/Oligonukleotiden wurden in 1 x Reaktions-Puffer A, 10 mM ATP und 10 U des Enzyms gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 75 °C für 10 min.

2.2.6. Isolierung von DNA-Fragmenten

Für die Isolierung der benötigten DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau wurden die Fragmente über die Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1) aufgetrennt und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit wurde die DNA aus der Agarose aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl H₂O.

2.2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Analytische PCRs wurden mit Hilfe der DreamTaq durchgeführt. Präparative PCRs wurden entweder mit Hilfe der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase oder im Falle von PCR-Produkten > 3 kb mit der PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die *annealing*-Temperatur wurde im Falle der DreamTaq und der PfuUltra II 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer gewählt; die *annealing*-Temperatur für die Phusion-

Polymerase wurde mit Hilfe des *T_m-calculator*¹ ermittelt. Bei unzureichender Produktmenge wurde die optimale *annealing*-Temperatur über eine Gradienten-PCR angepasst.

2.2.7.1. Kolonie-PCR

Zur Identifikation positiver Klone ohne auf eine vorherige Plasmidpräparation (2.2.2) zurückgreifen zu müssen, wurde eine sogenannte Kolonie-PCR direkt auf Einzelkolonien durchgeführt. Hierfür wurden die Bakterienkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und zuerst in den vorbereiteten PCR-Ansatz und danach in 100 µl LB-Medium getaucht. Kolonie-PCRs wurden mit der Dream-Taq Polymerase gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die initiale Denaturierungsphase der PCR erfolgte für 3 min bei 95 °C, was eine Lyse der Bakterien und Freisetzung der Plasmid-DNA ermöglichte. Positive Kolonien wurden nach erfolgreicher PCR aus der vorhandenen Flüssigkultur für Plasmidpräparationen weiterkultiviert.

2.2.7.2. Megaprimer-PCR

Für die Herstellung der enzymatisch inaktiven reversen Transkriptase wurde eine gerichtete Mutation mittels Megaprimer-PCR nach dem 2-Schritt-Prinzip eingefügt (Abbildung 11). Die Megaprimer-PCR wurde in diesem Fall verwendet, da es keine flankierenden Restriktionsschnittstellen in der unmittelbaren Umgebung der eingefügten Mutation gab. In der ersten PCR wird die Mutation über ein Oligonukleotid eingebracht. Im zweiten Schritt wird das mutierte PCR-Produkt als sogenannter „Megaprimer“ verwendet und in einer zweiten PCR ein längeres PCR-Produkt mit der Mutation und den gewünschten flankierenden Restriktionsschnittstellen generiert.

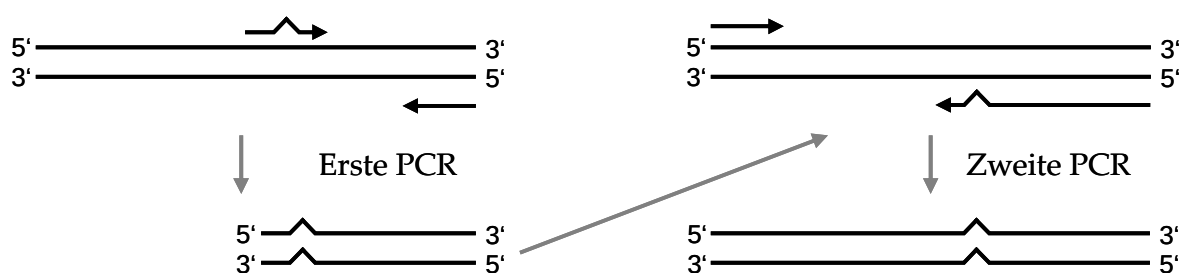


Abbildung 11 – Schematische Darstellung der Megaprimer-PCR nach Ke *et al.* (1997) [289].

2.2.7.3. *nested*-PCR

Bei einer *nested*-PCR werden zwei aufeinanderfolgende PCRs mit verschachtelten Primern durchgeführt. Dies resultiert in einer höheren Sensitivität, einer stärkeren Amplifikation und

¹ <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator>; aufgerufen 20.01.2013

in einer Reduktion falsch-positiver PCR-Produkte. In der ersten PCR-Reaktion wird zunächst eine „Standard-PCR“ durchgeführt. Die Produkte aus der ersten PCR dienen im nachfolgenden Schritt als Matritze. Bei der zweiten PCR werden Primer verwendet, die weiter innerhalb der Zielsequenz liegen und somit keine falschen PCR-Produkte aus der ersten PCR amplifizieren können. *Nested-PCRs* wurden in dieser Arbeit bei der Amplifikation integrierter lentiviraler Proviren aus genomischer DNA angewendet.

2.2.8. Aufreinigung der PCR-Fragmente

Für das weitere Verarbeiten von PCR-Fragmenten war es z.T. nötig, die dNTPs sowie die Polymerase und Puffer-Salze zu entfernen. Hierfür wurde das QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der PCR-Fragmente erfolgte in 30 µl H₂O.

2.2.8.1. Herstellung synthetischer Oligonukleotide

Klonierungen, bei denen die gewünschte Sequenz nicht über einen Restriktionsverdau oder eine PCR generiert werden konnte, wurden mithilfe sogenannter synthetischer Oligonukleotide durchgeführt. Hierfür wurden die jeweiligen komplementären Einzelstränge bei Eurofins MWG Operon bestellt. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 pmol/µl in 1 x Oligo-*annealing*-Puffer resuspendiert und die komplementären Einzelstränge in äquimolarem Verhältnis vereinigt. Zur Aufhebung evtl. ausgebildeter Sekundärstrukturen wurden die Oligonukleotide für 5 min auf 95 °C in einem Heizblock erhitzt. Die Aneinanderlagerung der komplementären Stränge erfolgte durch langsames Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur durch Ausschalten des Heizblocks. Die Aneinanderlagerung der Oligonukleotide wurde gelelektrophoretisch überprüft.

2.2.9. Klonierungsstrategien

LeGO-hEµMAR-G2

Für die Herstellung wurde der Bereich des hEµMAR mittels PCR aus primären humanen B-Zellen amplifiziert (u1.1, u1.2). Das Fragment wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits subkloniert und mit M13uni und M13rev sequenziert. Danach wurde das Fragment über das Restriktionsenzym NheI isoliert und in den NheI-linearisierten, dephosphorylierten Vektor LeGO-G2 eingesetzt. Die Orientierung wurde über die Enzyme PacI/ApaI kontrolliert.

LeGO-sC46-iS2 und LeGO-sC46-iG2

Für die Herstellung des Vektors zur Koexpression von sC46 und TSapphire wurde die sC46-Expressionskassette mittels NotI aus dem γ-retroviralen Vektor T60-iG präpariert und in die NotI-Schnittstelle vor der internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) des LeGO-iS2 eingesetzt.

LeGO-hEμMAR-sC46-iS2 und LeGO-hEμMAR-sC46-iG2

Das *enhancer*-Element hEμMAR wurde über das Restriktionsenzym NheI aus dem Vektor LeGO-hEμMAR-G2 isoliert und in die NheI-verdauten, dephosphorylierten Vektoren LeGO-sC46-iS2 und LeGO-sC46-iG2 eingesetzt. Die Überprüfung der Orientierung erfolgte über die Restriktionsenzyme HpaI und ApaI.

LNT-SFFV-TALEN-L und LNT-SFFV-TALEN-R

Die Kassetten TALEN-L (=RM1) und TALEN-R (=RM2) wurden über die Restriktionsendonukleasen SacI/AgeI aus den jeweiligen Expressionsplasmiden pAC-CMV-TALE-RM1-long-FokI-1317 and RM2-long-FokI-1318 isoliert und die Enden über die DNA T4 Polymerase exonukleolytisch entfernt. Da das hier verwendete NILV-System auf Lentiviren der 2. Generation beruht (siehe 1.3.1), wurden die Expressionskassetten in den LNT-SFFV-MCS umgesetzt. Dieser wurde zuvor durch BamHI linearisiert, die Enden über das Klenow-Fragment aufgefüllt und schließlich dephosphoryliert. Die Orientierung der TALEN-Kassetten wurde mit SacII überprüft. Die Übergänge zwischen Vektor und TALEN wurden durch Sequenzierungsreaktionen überprüft.

LeGO-iTALEN-L-iG2, LeGO-iTALEN-R-iG2, LeGO-iTALEN-R-iT2

Für die Klonierung wurden die jeweiligen TALEN-Kassetten über SacII/ApaI isoliert und in die jeweiligen LeGO-Konstrukte eingefügt (LeGO-iG2: Linearisierung mit StuI; LeGO-iT2: Linearisierung mit BamHI, Auffüllen der Enden mit Klenow-Fragment). Die Konstrukte wurden mittels BamHI (TALEN-L-iG2) und NheI (TALEN-R-iT2) überprüft.

LeGO-hCCR5-mTagBFP-puro⁺

Die cDNA des humanen CCR5 wurde über eine PCR-Reaktion amplifiziert (u1, u2-opt) und über die Schnittstellen BamHI/NotI in den lentiviralen Vektor LeGO-mTagBFP-puro⁺ gesetzt. Die Korrektheit des Konstruktes wurde durch Sequenzierung bestätigt.

LeGO-iTALEN-L-iG2 und LeGO-iTALEN-R-iG2

Die Vektoren LeGO-TALEN-L-iG2 und LeGO-TALEN-R-iG2 wurden mit NheI und PstI linearisiert. Die IRES wurde über PstI und NcoI aus dem LeGO-iG2 isoliert. Für einen bündigen Abschluss der IRES mit dem Startcodon der TALEN wurde das Oligonukleotid u47/u48 über die Schnittstellen NcoI und NheI eingefügt. Das Restriktionsmuster der entstandenen Vektoren LeGO-iTALEN-L-iG2 und LeGO-iTALEN-R-iG2 wurden mithilfe von NheI kontrolliert.

LeGO-iTALEN-L-iG2 und LeGO-iTALEN-R-iG2

Die p(A)-Signale wurden mithilfe einer PCR (BGH-p(A): u58/u59; bzw. SV40-p(A): u60/u61) aus dem pAC-CMV-TALE-RM1-long-FokI-1317 amplifiziert und in die jeweiligen iTALEN-Konstrukte eingesetzt. Es wurden 2 unterschiedliche Positionen gewählt: 1.) direkt 3' des Transgens (über BsrGI); 2.) 3' des wPRE (über PvuII). Die entstandenen Vektoren wurden mit NheI kontrolliert und zur Überprüfung sequenziert.

2.2.10. Isolierung viraler RNA aus Lentiviren

Zur Isolierung lentiviraler RNA aus Zellkultur-Überständen wurde das NucleoSpinRNA Virus-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.11. DNA-Synthese aus viraler RNA

Für die Synthese von DNA aus viraler RNA (2.2.10) wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Es wurden 500 ng der RNA mit 1 µl Oligo(dT)₁₈ Primer in einem Volumen von 12 µl für 5 min bei 65 °C denaturiert und nach Zugabe von 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl reverser Transkriptase 60 min bei 42 °C und 5 min bei 70 °C inkubiert. Die PCR zur Amplifikation der relevanten Bereiche erfolgte im Anschluss mit der Phusion-Polymerase (siehe 2.2.7).

2.2.12. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung neuer Plasmidvarianten wurden die DNA-Fragmente aus PCR (2.2.7), aus Restriktionsansätzen (2.2.4) oder synthetisierten Oligonukleotiden (2.2.8.1) mit den vorbereiteten linearisierten Vektor-Plasmiden verknüpft. Hierfür wurde die T4 DNA Ligase gemäß Herstellerangaben verwendet. Es wurde insgesamt 50-200 ng DNA pro Ligationsansatz verwendet. Die Fragmente wurden hierbei in einem dreifachen (Klonierungen mit 3' oder 5'-Überhängen) oder sechsfachen (Klonierungen mit glatten Enden) molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl in 1 x Ligationspuffer mit 1 U T4 DNA Ligase bei 16 °C für 2-16 h. Bei Klonierungen mit synthetisierten Oligonukleotiden wurden zu 50-200 ng Vektor-DNA 0,1 µl Oligonukleotide gegeben. Für die Transformation kompetenter Bakterien (siehe 2.3.1) wurde der gesamte Ligationsansatz verwendet.

2.2.13. Verwendung des CloneJET PCR Cloning Kit

Für das Vereinzeln von heterogenen PCR-Fragmenten wurde das CloneJET PCR Cloning Kit verwendet. Hierbei wurden die PCR-Fragmente ungerichtet in einen Expressionsvektor (pJET1.2/blunt) ligiert, einzeln analysiert und sequenziert. Der Vorteil des Systems liegt in

der hohen Effizienz und Spezifität. Konstrukte, die kein Fragment integriert haben, exprimieren ein letales Restriktionsenzym. Dieses sorgt dafür, dass nur rekombinante Klone auf den Agar-Platten wachsen können.

Das Protokoll für das Klonieren der PCR-Fragmente in den pJET1.2/blunt unterschied sich je nach Polymerase, die für die PCR verwendet wurde. Bei Verwendung von Polymerasen mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (z.B. Phusion-Polymerase (2.2.7)) wiesen die PCR-Fragmente glatte Enden auf und wurden direkt in den pJET1.2/blunt eingesetzt. Hierfür wurden 0,15 pmol PCR-Fragment mit 10 µl 2 x Reaktionspuffer in einem Volumen von 20 µl mit 1 µl des pJET1.2/blunt-Vektors und 1 µl der mitgelieferten T4 DNA Ligase für 5 min bei 22 °C inkubiert und anschließend für die Transformation kompetenter Bakterien verwendet (2.3.1). PCR-Fragmente, die über Polymerasen generiert wurden, welche über keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verfügen (z.B. DreamTaq-Polymerase (2.2.7)), weisen häufig kurze Überhänge auf, die vor der Ligation mit dem Expressionsvektor entfernt werden mussten. Eine Vorreaktion mit dem mitgelieferten DNA Blunting Enzyme war hierbei notwendig. Hierfür wurden 0,15 pmol PCR-Fragment mit 10 µl 2 x Reaktionspuffer und 1 µl DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 18 µl für 5 min auf 70 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Im Folgenden wurden 1 µl des pJET1.2/blunt Expressionsvektors sowie 1 µl der mitgelieferten T4 DNA Ligase zugegeben und für 5 min bei 22 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet (2.3.1).

2.2.14. Verwendung des TOPO TA Cloning Kits

Für die Subklonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet. PCR-Produkte, die über die Taq-Polymerase amplifiziert werden, verfügen häufig über einen 3'-Adenosin-Überhang. Diese können über die Verwendung eines Vektors mit 3'-Thymidin-Überhang und kovalent gebundener Topoisomerase ohne die Verwendung einer Ligase in den besagten Vektor eingesetzt werden.

Die Verwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden 4 µl des PCR-Produktes mit 1 µl H₂O und 1 µl TOPO-Vektor versetzt und für 5 min (RT) inkubiert. Der Ansatz wurde dann zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet (siehe 2.3.1).

2.2.15. Endonukleaseassay

Mittels Endonukleaseassay (siehe Abbildung 12) wurde der Anteil modifizierter DNA nach Behandlung mit Zinkfinger- oder TALE-Nukleasen bestimmt. Hierfür wurde zunächst eine PCR (siehe 2.2.7) auf dem modifizierten Gen durchgeführt. Die PCR wurde gelelektrophoretisch überprüft und das PCR-Produkt aufgereinigt (2.2.6). 150 ng des PCR-Produktes wurden für 10 min bei 98 °C denaturiert und dann langsam auf Raumtemperatur runtergekühlt. Hierbei lagern sich die DNA-Stränge wieder aneinander, was bei einer Mischung aus wildtyp und mutierter DNA zur Formierung von Heteroduplexen führt. Diese Heteroduplexe verfügen je nach Mutationsrate über sogenannte *mismatches* (Fehlpaarungen).

Diese Bereiche können von einer *mismatch*-sensitiven Endonuklease erkannt und geschnitten werden. In diesem Fall wurden 150 ng PCR-Fragment mit 10 U T7-Endonuklease 1 für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und der Anteil geschnittener DNA mittels Fiji [288], einem Bildbearbeitungsprogramm für biologische Anwendungen, ermittelt.

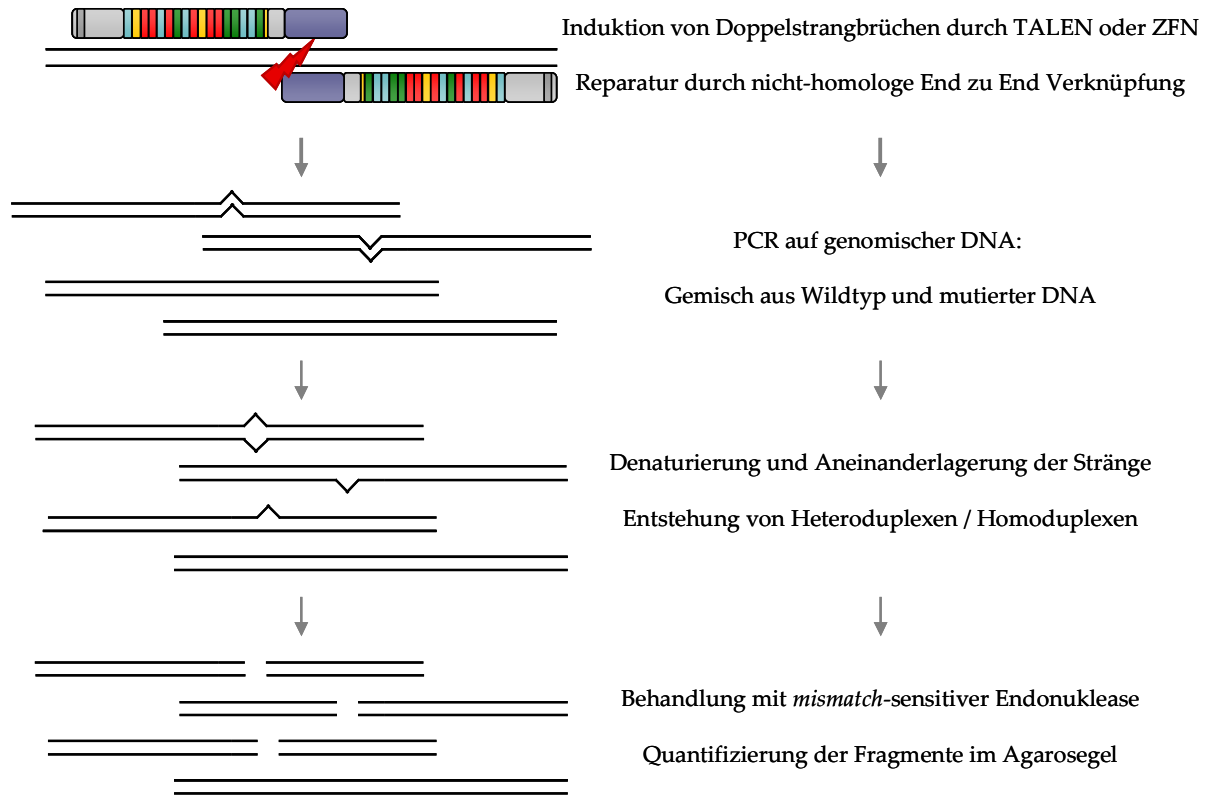


Abbildung 12 - Schematische Darstellung des Endonukleaseassays. Modifiziert nach Sanjana *et al.* (2012) [226].

2.3. Arbeiten mit Bakterien

2.3.1. Transformation kompetenter Bakterien

Die Ligationsansätze (aus 2.2.12, 2.2.13 und 2.2.14) wurden direkt für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien verwendet. Hierfür wurde der *Escherichia coli*-Stamm Top10 F' gewählt. 100 µl der Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 10 µl Ligationsansatz hinzugefügt. Inkubiert wurde für 30 min auf Eis; der Hitzeschock erfolgte für 45 Sekunden bei 42 °C. Nachfolgend wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt und für die Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 30 min bei 37 °C in 500 µl LB-Medium ohne Antibiotika geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien kurz anzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar Platten mit den entsprechenden Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin; 50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über

Nacht (ü.N.) bei 37 °C. Am nachfolgenden Tag wurden Einzelkolonien gepickt und entweder in LB-Medium (inkl. entsprechender Antibiotika) für Plasmidpräparationen (2.2.2) expandiert oder mittels Kolonie-PCR (2.2.7.1) analysiert.

2.3.2. Sequenzierungen

Standard-Sequenzierungen wurden extern durchgeführt. Hierfür wurden 600 – 700 ng Plasmid oder PCR-Ansätze mit 20 pmol des jeweiligen Sequenzierungsprimers an die Firmen Eurofins MWG Operon oder Seqlab übergeben. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte über das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

2.4. Methoden der Zellkultur

2.4.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Die Arbeitsflächen wurden vor Beginn mit 80 % Ethanol gereinigt und alle verwendeten Materialien entweder direkt steril bezogen oder sterilisiert. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Zelllinien und primären Zellen bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten, 5 %igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.4.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Färbung mit Trypan Blau mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Trypan Blau ist ein negativ geladenes Chromophor, welches nur defekte Zellmembranen durchdringen kann und somit ausschließlich tote Zellen anfärbt. Die zu zählende Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:2-1:100 mit Trypan Blau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Anzahl der Zellen in 4 Großquadraten wurde bestimmt und die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Zellen (4 Großquadrate)}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

In Abweichung davon wurde die absolute Anzahl an B-Zellen im Transduktionsversuch durchflusszytometrisch über AccuCheck *counting beads* bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.6.1).

2.4.3. Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung von primären Zellen und Zelllinien wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 × 10⁶ - 1 × 10⁷ Zellen/ml in 90 % FCS mit 10 % DMSO aufgenommen und in speziellen Isopropanol-Einfrierbehältern (Thermo Scientific) mit einer konstanten

Kühlrate von -1 °C/min auf -80 °C runtergekühlt. Nach 24 h wurden die Zellen in Lagerbehälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.4.4. Kultivierung von Mammalia-Zellen

Für die Kultivierung von Säugerzellen wurden die folgenden Medien mit den angegebenen Zusätzen verwendet:

- 1.) DMEM GlutaMAX (mit 4,5 g/l Glukose)
 - + 10 % FCS
 - + 1 mM Natriumpyruvat
- 2.) RPMI 1640
 - + 10 % FCS
 - + 1 mM Natriumpyruvat
 - + 2 mM L-Glutamin
- 3.) X-VIVO 10
 - + 10 mM Natriumpyruvat
 - + 50 µM β-Mercaptoethanol

Eine Auflistung der verwendeten Zelllinien und der jeweiligen Medien ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 - Verwendete Zellen und Kulturbedingungen. Medium mit Standard-Zusätzen wie oben angegeben (Abschnitt 2.4.4).

Zelllinie	Medium	Zusätze
293T	DMEM	20 mM HEPES
B-Zellen (primär, human)	RPMI 1640	2 ng/ml IL-4
CW698	RPMI 1640	-
EBV+ B-Zellen (BLS DR2a)	RPMI 1640	1 % Penicillin/Streptomycin; 1 mg/ml G418
CCR5 ⁺ -GHOST	DMEM	500 µg/ml G418; 100 µg/ml Hygromycin
Jurkat	RPMI 1640	-
K562	RPMI 1640	-
L929	DMEM	-
L929-CD40L	RPMI 1640	-
MN60	RPMI 1640	-
PM-1	RPMI 1640	-
Raji	RPMI 1640	-
REH	RPMI 1640	-
RPMI 8226	RPMI 1640	-
T-Zellen (primär, human)	X-VIVO 10	16 % Autologes Plasma (2.4.5.2); 200 U/ml Proleukin

Die Zelllinien MN60 und CW698 sowie die EBV-immortalisierten humanen B-Zellen (BLS DR2a) wurden freundlicherweise von Dr. Eva Maria Murga-Penas (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) bzw. von Prof. Dr. Roland Martin (Universität Zürich, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die CCR5⁺-GHOST-Zellen stammen aus dem „Programme

EVA Centre for AIDS Reagents (EVA CFAR)“ und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Littman und Dr. V KewalRamni (NIBSC, UK).

2.4.4.1. Adhärenente Zellen

Für das Passagieren wurden adhärenente Zellen mit PBS gewaschen und gerade soviel Trypsin/EDTA-Mix zugegeben, dass der Boden vollständig bedeckt war. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von Serum-haltigem Medium inaktiviert. Die Zellen wurden in Abhängigkeit von der Verdopplungszeit in einem Verhältnis von 1:5 – 1:15 in ein frisches Kulturgefäß überführt.

2.4.4.2. Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in einem Abstand von 2-3 Tagen in einem Verhältnis von 1:3 – 1:5 (je nach Verdopplungszeit) mit frischem Medium verdünnt.

2.4.5. Isolation und Stimulation von Lymphozyten

Primäre humane Lymphozyten wurden aus sogenannten *Buffy Coats* isoliert. Diese wurden freundlicherweise vom Blutspendedienst des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. *Buffy Coat* bezeichnet ein Nebenprodukt der Herstellung von Erythrozyten-Konzentraten, welches man durch das Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Es enthält unter anderem Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen), die über eine Dichtegradienten-Zentrifugation von Plasma, Thrombozyten sowie verbliebenen Erythrozyten und Granulozyten getrennt werden können.

Zunächst wurde der *Buffy Coat* 1:2 mit PBS verdünnt und in einem 50 ml-Falcon vorsichtig über 15 ml Biocoll (1,077 g/ml) geschichtet. Die Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte bei $1000 \times g$ für 20 min mit ausgeschalteter Bremse. Die gebildete Interphase mit den mononukleären Zellen wurde abgenommen und zweimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und entweder kryokonserviert (2.4.3) oder, wie im Folgenden beschrieben, weiter verwendet.

2.4.5.1. B-Zellen

Die Anreicherung primärer humaner B-Lymphozyten aus mononukleären Zellen erfolgte über das Prinzip des *Magnetic Cell Sorting* (MACS) mithilfe des Human B cell Isolation Kit II. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte negative Selektion über magnetische Partikel, an die spezifische Antikörper gebunden sind. Diese Antikörper binden Oberflächenstrukturen auf allen nicht-B-Zellen. Bei Anlegen eines magnetischen Feldes an einer Säule werden die nicht markierten B-Zellen so spezifisch im Eluat angereichert.

Zunächst wurden die mononukleären Zellen gezählt und der Anteil der B-Zellen über Durchflusszytometrie (2.4.6) bestimmt. Hierfür wurde ein B-Zell-spezifischer Antikörper

verwendet (anti-CD19-PerCP). Über den Anteil der B-Zellen wurde hieraufhin die absolute B-Zellzahl ermittelt. Die Zellen wurden zentrifugiert (300 x g für 10 min) und in 40 µl pro 10⁷ Zellen MACS-Puffer resuspendiert. Für die Markierung der Oberflächenproteine wurden 10 µl pro 10⁷ Zellen Antikörper-Cocktail zugegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden erneut 30 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen und 20 µl magnetische Partikel pro 10⁷ Zellen hinzugefügt, gut gemischt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Das Zellen/Partikel-Gemisch wurde einmal mit PBS gewaschen und in 500 µl pro benötigte Säule resuspendiert. Die Anzahl benötigter Säulen errechnet sich wie folgt:

$$\text{Anzahl der Säulen} = \frac{\text{Zellzahl gesamt}}{10^{10}} \times (100 - (\% \text{ CD19}^+))$$

Die Anzahl der Säulen wurde aufgerundet. Die Equilibrierung der Säulen erfolgte mit 3 ml MACS-Puffer. Die Zellen wurden auf die Säule gegeben und der Durchfluss mit den B-Zellen aufgefangen. Es wurde dreimal mit jeweils 3 ml gewaschen und der Durchfluss mit dem ersten Durchfluss vereinigt. Schließlich wurden die Zellen zentrifugiert (450 x g für 7 min), in 1-2 ml RPMI 1640 + 2 ng/ml Il-4 resuspendiert und gezählt. Die Aktivierung und Kultivierung der primären B-Zellen erfolgte auf sogenannten *Feeder*-Zellen. Hierbei handelte es sich um einen Fibroblasten-Klon (L929#5), der über die Integration einer lentiviralen Expressionskassette (LeGO-CD154) stabil CD40-L auf der Zelloberfläche exprimiert. Etabliert und validiert wurde dieses Zell-basierte CD40L-System in unserem Labor von Regine Thiele und Almut Uhde. Vor der Beladung mit B-Zellen wurde der L929-Klon mit 90 Gy γ-Strahlen bestrahlt und in einer Dichte von 1-1,3 x 10⁵ Zellen/ml ausgesät. Die Bestrahlung gewährleistet, dass sich die *Feeder*-Zellen zwar nicht weiter teilen aber trotzdem weiterhin CD40L auf der Zelloberfläche exprimieren. Auf die so vorbereiteten *Feeder*-Zellen wurden die B-Zellen in einer Dichte von 1,3 x 10⁵/ml ausgesät.

2.4.5.2. T-Zellen

Für das Arbeiten mit T-Zellen wurden die mononukleären Zellen aus dem *Buffy Coat* direkt mit T-Zell-spezifischen Antikörpern stimuliert. Dies ermöglicht eine Expansion der T- aber nicht der übrigen mononukleären Zellen. Für die Stimulation wurde das Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28-Kit nach Herstellerprotokoll verwendet. Die mononukleären Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit den CD3/CD28-beschichteten Partikeln gemischt und in X-VIVO 10 mit 200 U/ml IL-2 2-3 Tage bis zur lentiviralen Transduktion kultiviert. Das Medium wurde mit 16 % autologem Plasma ergänzt. Die Gewinnung des autologen Plasmas erfolgte bei der Dichtegradienten-Zentrifugation des *Buffy Coats* aus der oberen Phase. Es wurde für 30 min bei 57 °C hitzeinaktiviert und bei 1000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zu weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.4.6. Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können verschiedene Zelleigenschaften und Zellpopulationen simultan dargestellt werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst in eine Einzelzellsuspension gebracht und dann entweder auf ihre endogene Fluoreszenz hin untersucht oder mittels Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern gefärbt. Für die Färbung mit Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und dann in 300 µl PBS resuspendiert. Zur Blockierung von Fc-Rezeptoren wurde Fc-Block hinzugegeben. Die Färbung mit den spezifischen Antikörpern erfolgte im Anschluss für 15 min (RT). Eine Liste der verwendeten Antikörper findet sich in Abschnitt 2.1.8.

2.4.6.1. Phänotypisierung von B-Zellen

Die Phänotypisierung von B-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch über die Färbung mit spezifischen Antikörpern (siehe 2.4.6). Das Färbeschema ist an die Veröffentlichung von Perez-Andres *et al.* [290] angelehnt.

B-Zell Subtyp	Oberflächenantigen (CD)	Fluorochrom (Klon)
Gesamt B-Zellen	CD19 ⁺	PerCP (4G7)
Unreife B-Zellen	CD10d ⁺ (<i>diminished</i>) CD38 ⁺ sIgM ⁺	APC (H10a) PE (HB7) PerCP-Cy5.5 (MHM-88)
Naïve B-Zellen	CD10 ⁻ CD27 ⁻	APC (H10a) APC-Cy7 (O323)
Gedächtnis B-Zellen	CD10 ⁻ CD27 ⁺	APC (H10a) APC-Cy7 (O323)
Plasma B-Zellen	CD10 ⁻ CD38 ⁺⁺ CD27 ⁺⁺	APC (H10a) PE (HB7) APC-Cy7 (O323)

2.4.6.2. Bestimmung der Zellzahl über *counting beads*

Die absolute Zahl an B-Zellen im Transduktionsversuch wurde über AccuCheck *counting beads* nach Herstellerprotokoll bestimmt. Hierfür wurde ein definiertes Volumen an B-Zellen mit dem gleichen Volumen an AccuCheck *counting beads* vermischt. Sowohl die Events der

counting beads als auch die Events der Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Da die Konzentration der *counting beads* bekannt war, konnte über die Relation zwischen *counting beads* und Zellen die absolute Zellzahl (Zellen/ μ l) bestimmt werden:

$$\text{Absolute Zellzahl (Zellen}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Events (Zellen)}}{\text{Events (counting beads)}} \times \text{Eingesetzte counting beads (beads}/\mu\text{l})$$

2.4.6.3. Fluoreszenz-Kopplung von Antikörpern

Die Kopplung des sC46-spezifischen Antikörpers 2F5 mit DyLight-633 erfolgte mithilfe des DyLight 633 Microscale Antibody Labeling Kits gemäß Herstellerangaben. Der Antikörper wird im Folgenden 2F5-633 genannt. Die Aufbewahrung erfolgte in 0,5 M Borat-PBS mit 100 μ g/ml BSA; 0,05 % NaN₃ und 50 % Glycerol bei -20 °C. Die Kopplung wurde durchflusszytometrisch überprüft und die optimale Konzentration für jede Charge neu bestimmt.

2.4.6.4. Intrazelluläre Färbung von sC46

Die intrazelluläre Expression des sC46 wurde durchflusszytometrisch mittels Fix & Perm-Kit bestimmt. 3×10^5 Zellen wurden zentrifugiert (450 x g) und in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Für die Fixierung der Zellen wurden 100 μ l Reagenz A zugefügt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die fixierten Zellen wurden einmal mit FACS-Puffer gewaschen und mit 100 μ l Reagenz B permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden 5 μ l Flebogamma verwendet. Die Detektion des intrazellulären sC46 erfolgte über die Zugabe von 0,4 μ l 2F5-633 (siehe 2.4.6.3). Die Zellen wurden 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Für die Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert.

2.4.7. Einzelzellablage

2.4.7.1. *Fluorescence activated cell sorting* (FACS)

Die Einzelzellablage mittels FACS erfolgte am FACS AriaIII in der FACS-Core Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Hierfür wurden die Zellen gewaschen und in PBS aufgenommen. Um Verklumpungen zu entfernen, wurden die Zellen durch ein 70 μ m-Zellsieb gegeben. Die Zellen wurden anhand der Fluoreszenz (Reporterprotein) in vorbereitete 96-Loch-Platten mit dem benötigten Medium sortiert. Da die Sortierung unter nicht-sterilen Bedingungen erfolgte, wurde das jeweilige Medium mit 2 % Penicillin/Streptomycin ergänzt.

2.4.8. Transfektion über Calciumphosphat

Über die Transfektion mittels Calciumphosphat wird eine transiente Expression der transportierten Vektoren erreicht. Alle im Folgenden verwendeten Mengenangaben beziehen sich auf 10-cm Schalen. Bei Transfektionen im 6-Loch-Platten Format wurde jeweils $\frac{1}{6}$ der hier angegebenen Mengen verwendet.

Für die Transfektion wurden am Vortag 5×10^6 293T-Zellen in einer 10-cm Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Vektoren in 450 μ l H₂O verdünnt und 50 μ l 2,5 M CaCl₂ hinzugefügt. Diese Lösung wurde unter Zufuhr von Luft in ein vorbereitetes 15 ml-Gefäß mit 500 μ l 2 x HBS-Puffer überführt. Das DNA/CaCl₂/HBS-Gemisch wurde 20 min inkubiert (RT). In der Zwischenzeit wurde bei den 293T-Zellen das Medium gewechselt und zusätzlich 25 μ M Chloroquin hinzugefügt. Schließlich wurde das Gemisch auf die vorbereiteten 293T-Zellen getropft und der Ansatz 6 – 12 h im Inkubator inkubiert. Das Medium wurde erneut gewechselt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C im Inkubator kultiviert.

2.4.8.1. Produktion lentiviraler Partikel

Die Herstellung lentiviraler Partikel erfolgte über die transiente Transfektion nach dem Komplementierungsprinzip (siehe 1.3). Diese Herstellungsweise erhöht nicht nur die Sicherheit im Hinblick auf die Entstehung von RCLs, es ermöglicht auch eine flexible Zusammensetzung der viralen Partikel. So ist durch die Anpassung der sogenannten *gag/pol*-Plasmide eine Produktion von integrierenden, nicht-integrierenden aber auch den hier entwickelten nicht-revers transkribierenden lentiviralen Vektoren möglich. Weiterhin kann der Tropismus der lentiviralen Partikel durch die Wahl des Hüllproteins (*env*) bestimmt werden (Pseudotypisierung). Für die Produktion wurden je nach System folgende Plasmide verwendet:

Integrierenden Lentiviren (ILV):

- Vektoren der 3. Generation (abgeleitet vom LeGO-System [260])
- pMDLg/pRRE [244] (*gag/pol*) für Matrix, (Nukleo-)Kapsid, reverse Transkriptase, Protease und Integrase
- pRSV-Rev [244] für die Vermittlung des Exports ungespleißter und einfach gespleißter viraler RNA aus dem Zellkern
- Hüllproteine:
 - VSV-G: pHCMV-VSV-G [291]
 - GALV: pHCMV-GALV-C_{4070A} (zur Verfügung gestellt von Dr. Carol Stocking, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg)
 - MV: pCG-HcΔ18 + pCG-FcΔ30 [292]

Nicht-integrierende Lentiviren (NILV):

- Vektoren der 2. Generation (abgeleitet vom pHR'SIN-SEW [269])
- pCMVΔ8.74D64V [279] (*gag/pol*) für Matrix, (Nukleo-)Kapsid, reverse Transkriptase, Protease und enzymatisch inaktive Integrase.
- Hüllprotein:
 - VSV-G: pMD2.G (zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Lausanne; Addgene Plasmid 12259)

Nicht-revers-transkribierende Lentiviren (NRTLTV):

- Vektoren der 3. Generation (abgeleitet vom LeGO-System [260])
- pMDLg/pRRE_ΔRT (*gag/pol*) für Matrix, (Nukleo-)Kapsid, enzymatisch inaktive reverse Transkriptase, Protease und Integrase
- pRSV-Rev [244] für die Vermittlung des Exports ungespleißter und einfach gespleißter viraler RNA aus dem Zellkern
- Hüllprotein:
 - VSV-G: pHCMV-VSV-G [291]

Folgende Mengen der jeweiligen Plasmide wurden für die Virusproduktion eingesetzt:

Plasmid	Menge pro 10-cm Schale
Vektor (3. Generation):	10 µg 11,3 µg bei Pseudotypisierung mit MV
Vektor (2. Generation):	12,8 µg
pMDLg/pRRE [244]:	10 µg 6,7 µg bei Pseudotypisierung mit MV
pMDLg/pRRE_ΔRT:	10 µg
pCMVΔ8.74D64V [279]:	9,6 µg
pRSV-Rev [244]:	5 µg
pHCMV-VSV-G [291]:	2 µg
pMD2.G:	3,2 µg
pHCMV-GALV-C _{4070A} :	4 µg
pCG-HcΔ18 [292]:	2 µg
pCG-FcΔ30 [292]:	6 µg

Die Ernte der viralen Überstände erfolgte in Abhängigkeit vom Hüllprotein:

Hüllprotein	Ernte
VSV-G:	1 x nach 24 h
GALV:	Bis zu 4 x nach 12, 24, 36 und 48 h
MV:	1 x nach 16 h

Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Überstände durch einen 0,45 µm-porigen Filter gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

2.4.8.2. Aufkonzentration lentiviraler Partikel

Für Experimente, bei denen eine höhere Partikelzahl/Zelle (MOI - *multiplicity of infection*) benötigt wurde, als diese durch die jeweiligen virushaltigen Zellüberstände erreicht werden konnte, wurde eine Aufkonzentration bei 4 °C durchgeführt. Für NILV wurden 32 ml Überstand bei 50 000 x g für 2 h zentrifugiert und anschließend in 150 µl serumfreien DMEM aufgenommen. Für ILV und NRTLIV wurden 30 ml bei 7 000 x g für 16 h zentrifugiert und in 500 µl serumfreien X-VIVO 10 aufgenommen. MV-pseudotypisierte LVV wurden für 4-6 h bei 20 000 x g zentrifugiert und in 350 µl RPMI 1640 aufgenommen.

2.4.9. Titration lentiviraler Partikel

Die Titration lentiviraler Partikel erfolgte in Abhängigkeit vom Konstrukt entweder über Durchflusszytometrie oder über einen HIV-1 p24-ELISA. Der ELISA wurde nur dann durchgeführt, wenn eine Titration über Durchflusszytometrie nicht möglich war (z.B. kein fluoreszierendes Reportergen im Konstrukt oder eine zu schwache Expression des Fluoreszenzproteins, so dass keine eindeutige Trennung der Populationen erreicht werden konnte).

2.4.9.1. Titration über p24-ELISA

Der HIV-1 p24 Antigen ELISA 2.0 wurde gemäß Protokoll durchgeführt. Die Proben wurden in *Assay Diluent* verdünnt und in einem Verhältnis von 1:10 mit *Lysing Buffer* versetzt. Die initiale Inkubation der Proben auf der Mikrotiterplatte erfolgte für 1,5 h bei 37 °C. Der Titer wurde mittels eines Referenzvektors, dessen Titer zuvor bereits über Durchflusszytometrie ermittelt wurde (siehe 2.4.9.2), bestimmt.

2.4.9.2. Titration über Durchflusszytometrie

Die Titration über Durchflusszytometrie erfolgte über fluoreszierende Reporterproteine, die nach erfolgreicher Transduktion durch lentiviralen Partikel in der Zielzelle exprimiert wurden. Über den Anteil positiver Zellen kann auf die Anzahl funktioneller lentiviraler Partikel geschlossen werden, solange die Transduktionsrate nicht zu hoch ist (Mehrfach-Integrationen führen zu einer Unterschätzung des Titters). Nach der Poisson-Verteilung ist zu erwarten, dass bei einem Anteil von 5 – 25 % positiver Zellen weitestgehend Einfach-Integrationen vorliegen [293].

Die für die Titration verwendeten Zelllinien (siehe 2.4.4) wurden in Abhängigkeit der jeweiligen Hüllproteine gewählt:

Hüllprotein	Zelllinie für Titration
VSV-G	293T
GALV	Jurkat K562
MV (HcΔ18, FcΔ30)	293T BLS DR2a

2.4.10. Transduktion mittels lentiviraler Partikel

Der Begriff der Transduktion beschreibt die Übertragung von Genen und wird als Fachterminus für die Infektion von Zellen mit viralen Vektorpartikeln verwendet. Es wurden je nach Zielzelle und Hüllprotein zwei unterschiedliche Methoden für die Transduktion von Zellen angewendet.

2.4.10.1. *Spin*-Infektion

Bei der sogenannten *Spin*-Infektion wurden die Zellen zunächst in 24-Loch-Platten ausgesät. Die Zugabe des viralen Überstandes erfolgte direkt ins Medium. Eine Steigerung der Transduktionsrate wurde erreicht, indem die Zellen zusammen mit den viralen Überständen für 1 h bei 1 000 x g (RT) zentrifugiert wurden. Zudem wurden vor der Transduktion zu den Zellen noch unterschiedliche Polykationen hinzugefügt. Diese sorgen durch die Bindung an Zell- und Virushülle für eine Reduktion der anionischen Ladungen und somit zu einer Verringerung der Abstoßung. Mit Ausnahme primärer T-Zellen in Kombination mit GALV-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren, bei denen Protaminsulfat (4 µg/ml) verwendet wurde, wurde Polybren (8 µg/ml; Hexadimethrinbromid) verwendet. Aufgrund beschriebener toxischer Eigenschaften von Polybren und Protaminsulfat [294] wurde 24 h nach *Spin*-Infektion das Medium entweder ersetzt oder 1:2 mit frischem Medium verdünnt. Die Inkubation der transduzierten Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C.

2.4.10.2. Transduktion auf RetroNectin

Bei RetroNectin (TaKaRa) handelt es sich um ein rekombinant hergestelltes Fibronectin-Derivat, an welches über verschiedene Protein-Domänen sowohl lentivirale Partikel (Heparin-bindende Domäne) als auch VLA-4⁺-(CS-Region) oder VLA-5⁺-Zellen (zentrale Zell-bindende Domäne) binden können. So kann über die Kollokalisierung eine Steigerung der Transduktionsrate erreicht werden [295].

Hierfür wurden zunächst 24-Loch-Platten (für Suspensionskultur) für 2 h bei RT oder für 16 h bei 4 °C mit RetroNectin beschichtet (9 µg/cm²). Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mittels RetroNectin-Block-Puffer für 30 min (RT). Die Platte wurde nach einem Waschschrift mit RetroNectin-Puffer überschichtet, bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche verwendet. Die Beladung mit Vektorpartikeln erfolgte jeweils 4 x mit maximal 400 µl viralem Überstand mittels Zentrifugation (940 x g, 4 °C, 30 min). Auf die so vorbereiteten Platten wurden bis zu 5 x 10⁵ Zellen gegeben, welche am nächsten Tag auf unbehandelte 24-Loch-Platten umgesetzt wurden. Die MOI wurde über die Annahme, dass 100 % der Viren aus dem Überstand an das RetroNectin gebunden haben, errechnet. Dies entspricht einer Überbewertung der tatsächlichen MOI und ist als Annäherung zu verstehen.

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Detektion des sC46-Peptids in Zellüberständen

Der ELISA zur Detektion des sC46 (1.2.3) im Zellüberstand wurde mit freundlicher Unterstützung durch Dr. Andreas Volk (Frankfurt) etabliert und validiert. Da zum damaligen Zeitpunkt nur ein Antikörper für das Peptid zur Verfügung stand, musste der Nachweis des sC46 über ein kompetitives System (siehe Abbildung 13) erreicht werden. Hierfür wurde zunächst die Mikrotiter-Platte mit einem rabbit-anti-human-IgG vorbeschichtet (0,6 µg/Ansatz in 50 mM Bicarbonat-Puffer; Inkubation: 1 h bei 37 °C) und darauffolgend mit einem BSA-haltigen sC46-ELISA-Block-Puffer inkubiert (2 h bei RT). Diese Vorbeschichtung und Blockierung ermöglicht zum einen eine effizientere Beladung der Mikrotiter-Platte mit dem sC46-spezifischen Antikörper (2F5; 5 ng/Ansatz in sC46-ELISA-Block-Puffer; 2 h bei RT) und zum anderen eine Reduktion des Hintergrundsignals durch das Abbinden unspezifischer Bindungsstellen. Die Proben wurden in Duplikaten vorbereitet und wenn nötig in Zellkulturmedium der jeweiligen Zielzellen (0,45 µm steril filtriert) verdünnt. Vor der Zugabe der Proben auf die Platten wurde ein Gemisch aus Probe und Kompetitor (13,2 nM/Ansatz) hergestellt. Bei dem Kompetitor handelt es sich um biotinyliertes Enfuvirtid (Protein Biotinylation Module), welches über das gleiche Epitop verfügt wie sC46 und somit auch vom verwendeten Antikörper (2F5) gebunden werden kann. Die Bindung des Proben-Kompetitor-Gemisch an den Antikörper erfolgte bei 4 °C ü.N.. Bei geringen

sC46-Konzentrationen kann viel Kompetitor durch den Antikörper gebunden werden, wohingegen bei hohen sC46-Konzentrationen der Kompetitor in einer Gleichgewichtsreaktion verdrängt wird. Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung des biotinylierten Kompetitors durch den zugegebenen *Streptavidin-horseredish peroxidase* (HRPO)-Komplex (1:1000 in Block-Puffer; 1 h bei 37 °C).

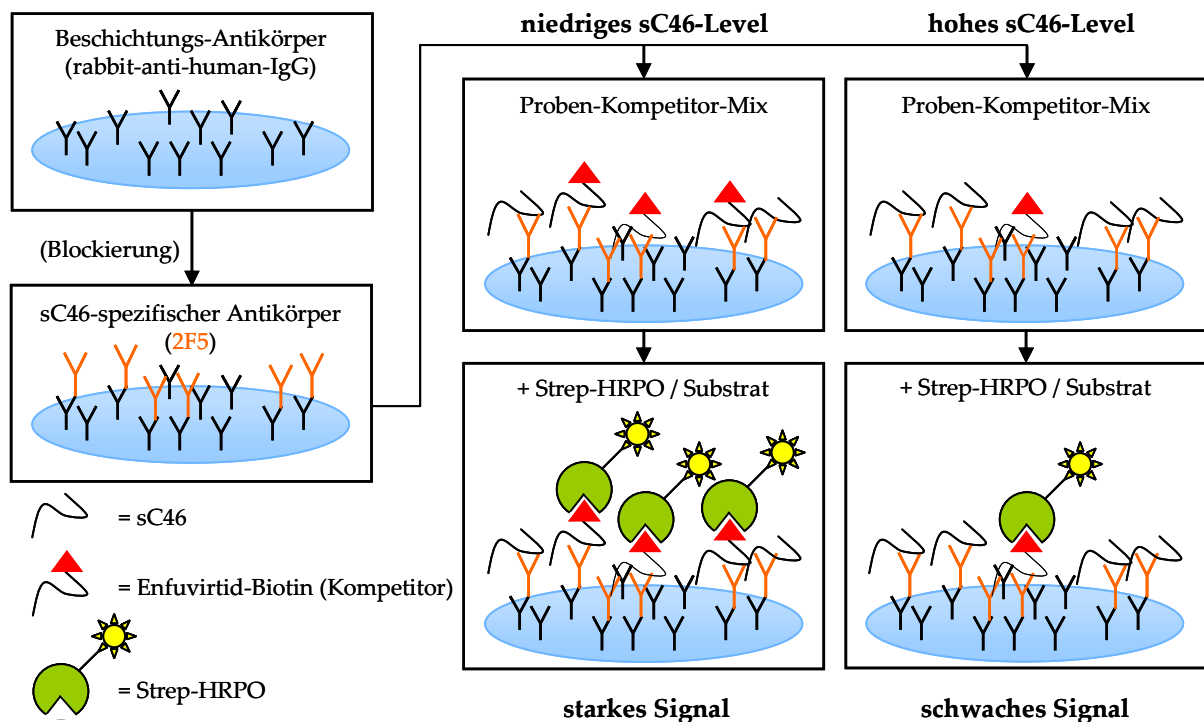


Abbildung 13 - Schematische Darstellung des kompetitiven sC46-ELISA. Entwickelt durch Dr. Andreas Volk (Frankfurt).

Die Quantifizierung des gebundenen Komplexes wurde über die Zugabe des Substrats TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; 100 µl/Ansatz; Inkubationsdauer abhängig von Farbentwicklung) in einer Farbreaktion durchgeführt. Je mehr sC46 im Überstand, desto schwächer ist die Farbreaktion und umgekehrt. Die Reaktion wurde gestoppt (TMB Stop Solution (H₂SO₄); 100 µl/Ansatz) und im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen (Korrekturwellenlänge: 540 nm). Für eine absolute Quantifizierung wurde in jedem Durchlauf eine Standardreihe mit synthetisiertem C46-Peptid in bekannter Konzentration (300 – 0,14 nM) mitgemessen.

2.6. Tierexperimentelles Arbeiten

Tierexperimentelle Arbeiten wurden am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Zusammenarbeit mit der Versuchstierhaltung durchgeführt. Die Experimente erfolgten im Rahmen der örtlichen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz. Das Projekt wurde unter dem Titel „Präklinische Tiermodelle

für die HIV-Gentherapie mit Stammzellen und Lymphozyten“ (Tierversuchsleiter Prof. Dr. Boris Fehse) und der Antragsnummer 03/11 in Hamburg genehmigt.

2.6.1. Transplantation humaner primärer B-Zellen

Es wurden Rag2^{-/-} γc^{-/-}-Mäuse mit $0,7-1 \times 10^7$ humanen transduzierten B-Zellen transplantiert. Die B-Zellen wurden wie in 2.4.5 bzw. 2.4.5.1 beschrieben aus unabhängigen *Buffy Coats* isoliert und stimuliert. Die Transduktion erfolgte an Tag 4 nach Isolation mit GALV-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren (LeGO-hEμMAR-G2) über RetroNectin (siehe 2.4.10.2). An Tag 2 nach Transduktion wurden die Zellen intravenös transplantiert. Hierfür wurden die Zellen in 300 μl PBS/Tier resuspendiert und in die Schwanzvene injiziert. Um ein Infektionsrisiko zu verringern, wurde dem Trinkwasser das Antibiotikum Baytril zugemischt (1,2 ml auf 300 ml Trinkwasser). Die Tiere wurden täglich beobachtet. Es konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

2.6.2. Organentnahme und Aufarbeitung

Die Organentnahme erfolgte 2 bis 7 Tage nach Transplantation nach Betäubung durch ein CO₂/O₂-Gemisch und Tötung durch Einleitung von reinem CO₂. Es wurden Knochenmark, Milz und Blut präpariert und aufgearbeitet. Für die Gewinnung des Knochenmarks wurden Tibia und Femur entfernt und die Knochen oben und unten mit einer sterilen Schere abgeschnitten. Die Knochenmarkszellen wurden mit PBS aus den Röhrenknochen gespült, einmal gewaschen und in PBS resuspendiert. Für die Gewinnung von Zellen aus der Milz wurde die Milz in RPMI 1640 ausgestrichen und zur Vereinzelung der Zellen durch ein 70 μm Nylon-Netz gegeben. Um störende Erythrozyten zu entfernen, wurde eine Erylyse durchgeführt. Hierfür wurde die Einzelzellsuspension mit 2 ml Erylyse-Puffer versetzt, 7 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Da im Blut deutlich mehr Erythrozyten vorhanden waren, wurde die Erylyse des Blutes nach einem anderen Protokoll durchgeführt. Es wurden zunächst 1 ml Erylyse-Puffer hinzugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschriff wurden die Zellen erneut mit 1 ml Erylyse-Puffer versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Zellen erneut gewaschen und in PBS resuspendiert.

Die Analyse von Knochenmark, Milz und Blut erfolgte durchflusszytometrisch (siehe 2.4.6). Antikörper mit folgender Spezifität wurden für die Detektion humaner B-Zellen in den transplantierten Mäusen verwendet:

Oberflächenantigen	Fluorochrom (Klon)
murines CD45	PerCP (30-F11)
humanes CD45	APC (J.33)
humanes CD19	Pacific Blue (HIB19)

EGFP wurde als Reporterprotein für transduzierte Zellen herangezogen. Tote Zellen wurden über eine Propidiumiodid-(PI)-Färbung ausgeschlossen. PI dringt durch die defekte Zellmembran toter Zellen ein und interkaliert in die DNA. Die Färbung kann dann im Durchflusszytometer detektiert werden.

2.7. Statistische Analyse

Daten, die als Säulendiagramme dargestellt werden, repräsentieren, wenn nicht anders erwähnt, den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen. Fehlerbalken stellen, wie angegeben, die Standardabweichung (SD) oder den Standardfehler (SEM) dar. Signifikanzen wurden über die Studentsche T-Verteilung ermittelt und als p -Wert angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Lentivirale Vektoren für die Expression des Eintrittsinhibitors sC46 in primären B-Zellen

In diesem Teil der Arbeit wurde das Potential primärer B-Zellen zur Sezernierung des HIV-Eintrittsinhibitors sC46 untersucht. Hierfür wurde zunächst das Transduktionsprotokoll für primäre B-Zellen optimiert. Es stellte sich heraus, dass Lentiviren, die mithilfe des Hüllproteins des *Gibbon ape leukemia virus* pseudotypisiert wurden, primäre B-Zellen effizient und schonend transduzieren können. Es wurden unterschiedliche Ansätze zur Charakterisierung und Optimierung des neuen Protokolls verfolgt. Zusätzlich konnte durch die Verwendung eines B-Zell-spezifischen *enhancers* die Transgenexpression in B-Zellen deutlich gesteigert werden. Für die Expression des sC46 wurden schließlich verschiedene lentivirale Vektoren hergestellt und die (Langzeit-)Expression sowie Sekretion des sC46 untersucht.

3.1.1. Auswirkungen des Pseudotyps auf Titer und Morphologie

Primäre humane B-Zellen stellen aufgrund ihres hohen Sekretionspotentials attraktive Zielzellen für die *in vivo*-Sekretion von Peptiden und Proteinen dar. Um eine stabile Produktion des eingebrachten Faktors zu erreichen, wurden für die Modifikation der Zellen, integrierende lentivirale Vektoren verwendet. Es war bereits im Vorfeld gezeigt worden, dass Lentiviren, die mittels des Hüllproteins des *Gibbon ape leukemia virus* (GALV) pseudotypisiert wurden, andere Zellen des hämatopoetischen Systems effizient transduzieren können [296]. Zum Vergleich wurden lentivirale Partikel mit den bisher favorisierten Hüllproteinen des Masern-Virus verwendet (MV = HcΔ18; FcΔ30).

Zunächst wurde der Einfluss der Hüllproteine auf die lentivirale Vektorproduktion untersucht. Hierfür wurden parallel lentivirale Partikel mit dem eGFP-kodierenden Vektor LeGO-G2 (pG2) produziert und die Titer auf 293T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 14a). GALV-pseudotypisierte Lentiviren (GALV-LVV) wiesen hierbei einen ca. 14 x höheren Titer auf als MV-pseudotypisierte Lentiviren (MV-LVV). GALV-LVV können im Gegensatz zu MV-LVV bei einer Produktion mehrfach geerntet werden (bis zu 4 x alle 8 - 16 h im Gegensatz zu 1 x nach 24 h). Die absolute Ausbeute lentiviraler Partikel unterschied sich daher noch stärker als der Titer: Eine 10-cm-Schale 293T-Zellen ergab in einer Produktion von GALV-LVV bis zu 30 x mehr Partikel als MV-LVV ($6,7 \pm 0,7 \times 10^7$ zu $2,2 \pm 0,2 \times 10^6$; Abbildung 14b). Auch die Morphologie der Produktionszellen wies Unterschiede in Abhängigkeit vom transfizierten Hüllprotein auf (Abbildung 14c). Während 293T-Zellen bei Produktion von GALV-LVV ihre ursprüngliche Morphologie weitestgehend

beibehielten, bildeten sich bei der Produktion von MV-LVV durch Verschmelzung mehrerer Zellen sogenannte Synzytien (Abbildung 14c, unten).

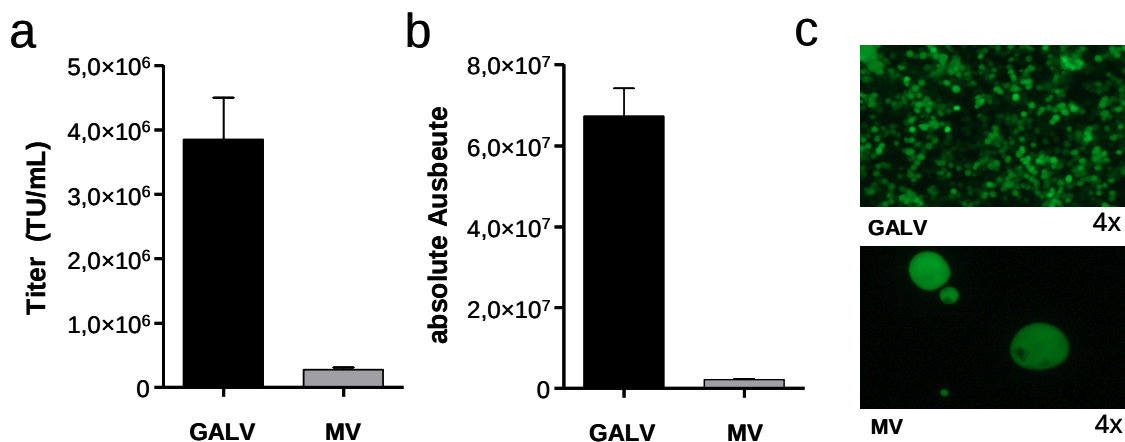


Abbildung 14 – Titer und Morphologie bei Produktion GALV- und MV-pseudotypisierter lentiviraler Vektoren. Virale partikelhaltige Überstände, pseudotypisiert mit GALV- oder MV-Hüllproteinen wurden parallel mithilfe von 293T-Zellen hergestellt. (a) Durchflusszytometrische Bestimmung der viralen Titer dargestellt als eGFP-Transfereinheiten/ml (TU/ml). (b) Absolute Ausbeute viraler Partikel pro Produktion für GALV- und MV-LVV. $n=2$, Mittelwert $\pm$ SD. (c) Morphologie der Produzentenzellen 24 h nach Kotransfektion zur Virusproduktion von LeGO-G2-Vektoren. Oben: Kotransfektion mit GALV-Hüllprotein. Unten: Kotransfektion mit MV-Hüllproteinen (Hc Δ 18; Fc Δ 30). Aufnahme in 4 x Vergrößerung.

Aufgrund des vergleichsweise niedrigen Titers (Abbildung 14a) wurden MV-LVV für die nachfolgenden Versuche mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

3.1.2. Transduktion primärer humaner B-Zellen mit GALV-pseudotypisierten Lentiviren (GALV-LVV)

Die hergestellten Lentiviren wurden nun für die Transduktion primärer humaner B-Zellen verwendet. Um das Transduktionspotential für sowohl nicht-aktivierte als auch aktivierte B-Zellen zu testen, wurden die humanen B-Zellen isoliert und dann entweder direkt (nicht-aktiviert) oder nach 24-stündiger Aktivierung durch Ko-Kultivierung mit CD40L-exprimierenden *Feeder*-Zellen mit eGFP-kodierenden Partikeln transduziert. Die Transduktion erfolgte im Fall von MV-LVV durch *spin*-Infektion. GALV-LVV wurden für die Transduktion zunächst auf RetroNectin-beschichtete Platten zentrifugiert bevor die Zellen zugegeben wurden. Die Transduktionseffizienz wurde 7 Tage nach Transduktion im Durchflusszytometer bestimmt (Abbildung 15).

Wie in Abbildung 15 dargestellt, waren GALV-LVV in der Lage, sowohl nicht-aktivierte als auch aktivierte primäre B-Zellen zu transduzieren. Die Transduktionsraten waren für nicht-aktivierte B-Zellen im Vergleich zu aktivierten B-Zellen jedoch deutlich reduziert (22,4 % zu 56,8 %).

Auch für MV-LVV konnten in Abhängigkeit von der MOI gute bis sehr gute Transduktionsraten erreicht werden: nicht-aktivierte B-Zellen waren bei einer MOI von 0,2 zu 20,8 % eGFP-positiv, aktivierte Zellen erreichten bei dieser niedrigen MOI eine Transduktionsrate von 54,7 %. Bei höherer Virusmenge (MOI 1) wurden dementsprechend höhere Transduktionsraten erreicht (nicht-aktiviert: 42,9 %; aktiviert: 86,8 %). Hierbei ist aber zu beachten, dass höhere MOIs der MV-LVV schädliche Effekte auf die Zellen hatten (siehe 3.1.4).

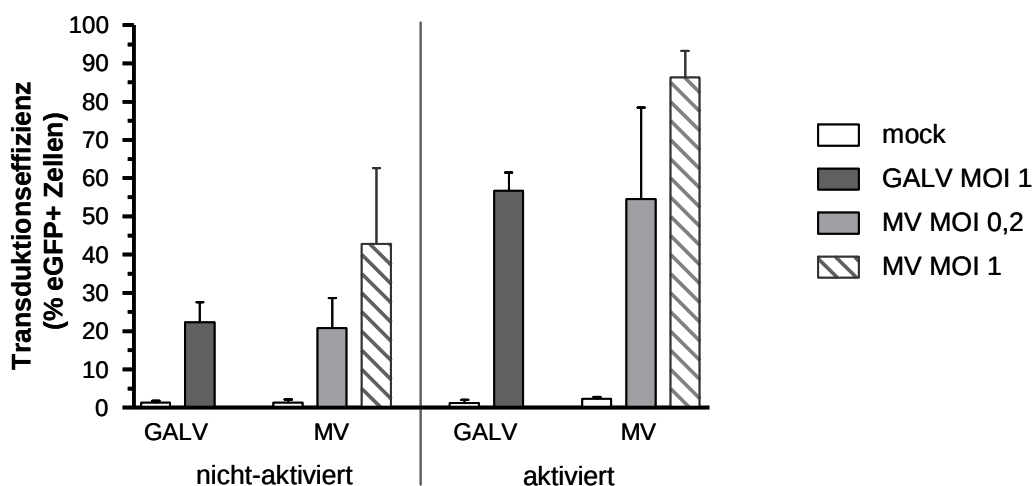


Abbildung 15 – Vergleichbare Transduktionseffizienzen in primären B-Zellen mit GALV- und MV-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren. Primäre B-Zellen wurden entweder direkt (nicht-aktiviert, links) oder nach 24-stündiger CD40L-Aktivierung (aktiviert, rechts) mit GALV- oder MV-LVV transduziert. Als MOI wurde hierbei jeweils 1 gewählt. Zusätzlich wurden, um schädliche Effekte bei höheren MOIs zu vermeiden, Zellen mit einer reduzierten MOI der MV-LVV transduziert (MOI 0,2). Gezeigt ist die Transduktionseffizienz nach 7 Tagen, bestimmt über den Anteil CD19⁺/eGFP⁺-Zellen im Durchflusszytometer; ein repräsentativer Spender von dreien, $n=2$, Mittelwert $\pm$ SD.

3.1.3. Optimierung des Transduktionsprotokolls für GALV-LVV

Nachdem gezeigt werden konnte, dass GALV-LVV für die Transduktion von primären B-Zellen geeignet sind, wurden Parameter im Transduktionsprotokoll verändert und die Transduktion optimiert. Hierfür erfolgte zunächst die Bestimmung der optimalen MOI. Primäre B-Zellen wurden mit ansteigenden MOIs von 0 – 20 transduziert und die Transduktionseffizienz über den Anteil CD19⁺/eGFP⁺-Zellen bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mit MOIs zwischen 1 und 5 Transduktionsraten von bis zu 57 % erreicht werden können (Abbildung 16a). MOIs unterhalb von 1 und oberhalb von 5 führten zu reduzierten Transduktionsraten.

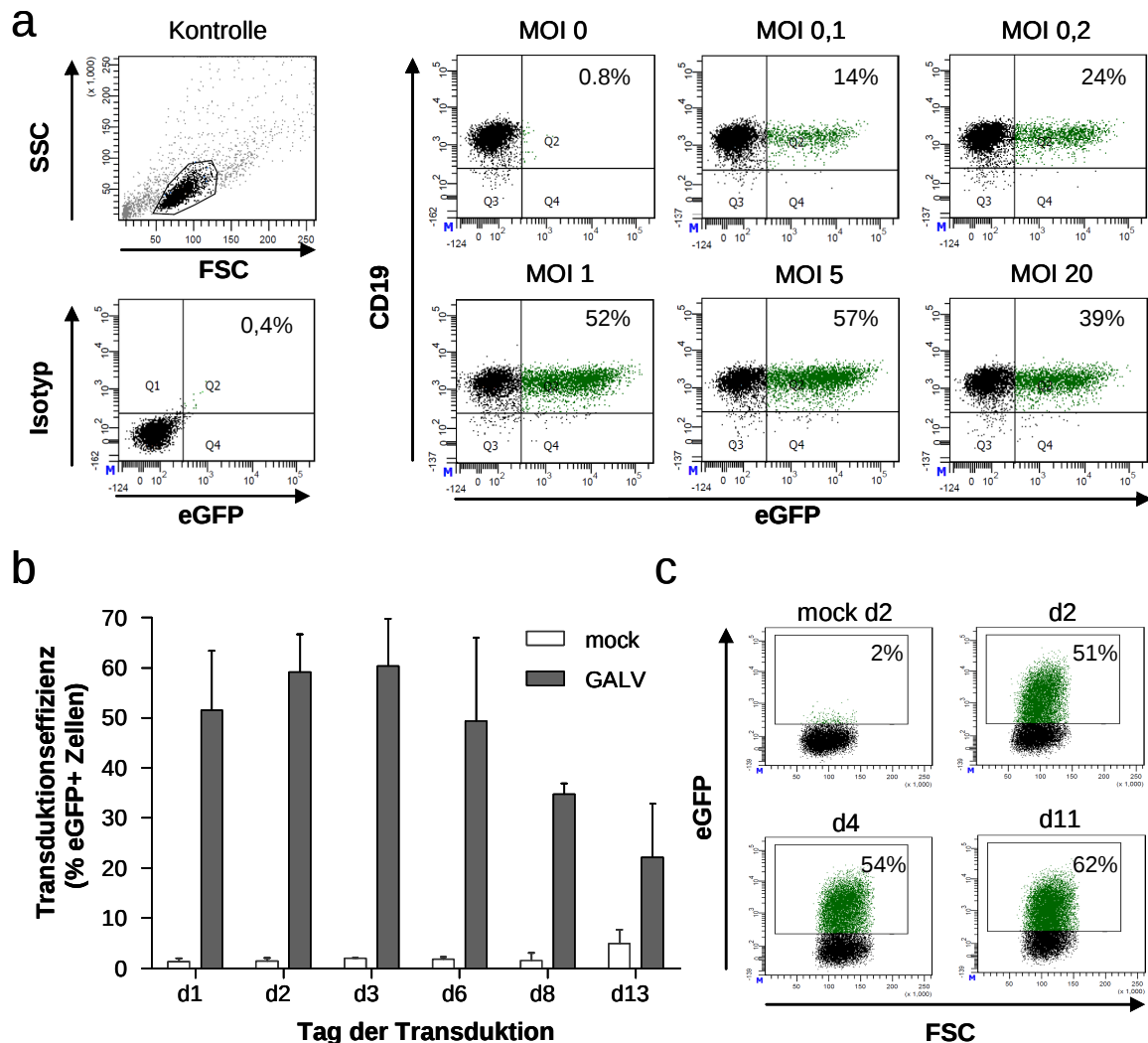


Abbildung 16 - Optimierung der lentiviralen B-Zell-Transduktion für GALV-LVV. Humane B-Zellen wurden aktiviert und mit GALV-LVV über RetroNectin beschichtete Platten transduziert. Dargestellt ist der Anteil CD19⁺/eGFP⁺-Zellen. (a) Bestimmung der optimalen MOI durch Transduktion nach 2-tägiger Aktivierung. Als Kontrolle dienten untransduzierte Zellen; die Abgrenzung der CD19⁺-Population erfolgte mithilfe einer Isotypen-Färbung. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. (b) Bestimmung des optimalen Transduktionszeitpunktes. Aktivierte humane B-Zellen wurden an den angegebenen Tagen nach Isolation transduziert und die Transduktionseffizienz nach 7 Tagen bestimmt (GALV-LVV). Als Kontrolle (mock) wurde der Anteil eGFP⁺-Zellen bei untransduzierten Zellen angegeben. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ SD für 3 unabhängige Experimente (in Duplikaten). (c) Bestimmung der Transduktionsrate über einen Zeitraum von 11 Tagen. Primäre B-Zellen wurden nach zweitägiger Aktivierung mit GALV-LVV transduziert und die Transduktionsrate an Tag 2, 4 und 11 nach Transduktion bestimmt. Als Kontrolle dienten mock-transduzierte Zellen (hier dargestellt für Tag 2). Abgebildet ist eines von zwei unabhängigen Experimenten.

Ein weiterer Parameter bei der Transduktion der B-Zellen war der Zeitpunkt der Transduktion nach Stimulation. Um hier den optimalen Zeitpunkt zu bestimmen, wurden primäre B-Zellen von drei unabhängigen Spendern isoliert, aktiviert und in einem Kinetik-Experiment an unterschiedlichen Tagen nach Aktivierung transduziert. Es zeigte sich, dass

innerhalb der ersten 6 Tage der Aktivierung Transduktionsraten von über oder bis zu 50 % erreicht werden konnten (siehe Abbildung 16b). Erst nach längerer Kultivierung der aktivierten B-Zellen konnte eine Reduktion der Transduktionsrate auf 35 % (Tag 8) bzw. 22 % (Tag 13) beobachtet werden. Da an Tag 2 und 3 nach Aktivierung die Transduktionsraten am höchsten waren, wurden für die folgenden Versuche die primären B-Zellen dementsprechend entweder nach zwei- oder dreitägiger Stimulation transduziert.

Zur Bestimmung des optimalen Analyse-Zeitpunktes und gleichzeitig zur Überprüfung der stabilen Expression, wurden primäre B-Zellen nach zweitägiger Aktivierung mit GALV-LVV transduziert und die Transduktionsrate nach 2, 4 und 11 Tagen bestimmt. Wie in Abbildung 16c zu erkennen, blieb die Transduktionsrate über den angegebenen Zeitraum weitestgehend stabil. Dies bedeutet, neben der gezeigten Expressionsstabilität über mehr als 10 Tage, dass der Messzeitpunkt für die Transduktionsrate bei GALV-LVV relativ flexibel im angegebenen Zeitraum bestimmt werden kann.

3.1.4. Ausbeute transduzierter Zellen

Zusätzlich zur Transduktionseffizienz wurde die absolute Ausbeute transduzierter Zellen bestimmt. Hierfür wurden die humanen primären B-Zellen isoliert, stimuliert und nach 1, 2, 3 und 6 Tagen mit GALV- und MV-LVV transduziert. Wie bereits in den vorhergehenden Versuchen wurden für MV-LVV zwei unterschiedliche MOIs gewählt (0,2 bzw. 1) wohingegen GALV-LVV in einer MOI von 1 eingesetzt wurde. 7 Tage nach Transduktion erfolgte die Bestimmung der absoluten Zellzahlen über *counting beads* im Durchflusszytometer. Insgesamt konnten für Versuche mit GALV-LVV signifikant (* $p < 0,05$) höhere Ausbeuten erzielt werden (Abbildung 17a). Transduktionen mit geringeren Mengen an MV-LVV (MOI 0,2) ergaben im Vergleich zum GALV-LVV bis zu 5,5 x weniger transduzierte Zellen (Transduktion an Tag 2 nach Aktivierung). Bei der höheren MOI an MV-LVV (MOI 1) wurden bis zu 14,5 x weniger transduzierte B-Zellen detektiert (Transduktion an Tag 2 nach Aktivierung).

Ein möglicher Einfluss von RetroNectin auf die Expansionskapazitäten der B-Zellen wurde über eine Kultivierung der B-Zellen auf RetroNectin in Abwesenheit der lentiviralen Vektoren untersucht. Hierfür wurden Zellen von 2 unabhängigen Spendern isoliert, für 1-3 Tage stimuliert und schließlich für 24 Stunden in Ab- oder Anwesenheit von RetroNectin kultiviert. Auch hier wurde die absolute Zellzahl 7 Tage nach Behandlung über *counting beads* bestimmt. Es konnten in Anwesenheit von RetroNectin 1,6 x mehr Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 17b).

Wie schon in den Produzentenzellen beobachtet werden konnte, kann die Verwendung der MV-Hüllproteine zur Bildung von Synzytien führen (siehe Abbildung 14c). Da dieses auch einen Einfluss auf die absolute Ausbeute transduzierter Zellen haben könnte, wurde die Entstehung von Synzytien bei der Transduktion primärer B-Zellen mit MV-LVV mikroskopisch untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit einer MOI von 1 transduziert und

die Morphologie nach 4 Tagen analysiert (siehe Abbildung 17c). B-Zellen bilden in Kultur häufig sogenannten *cluster* aus. Diese traubenförmigen Ansammlungen entstehen zum einen durch klonales Wachstum, zum anderen aber auch durch die Interaktion der Zellen über Oberflächenproteine. Diese *cluster* konnten für untransduzierte Zellen beobachtet werden (Abbildung 17c, rechts). Im Gegensatz dazu wurden bei den transduzierten Zellen vermehrt fusionierte Zellen detektiert. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 17c (links) dargestellt. Diese unphysiologischen Zellen könnten unter Umständen ein Sicherheitsrisiko bei der Transplantation darstellen (Lungenembolie bei Transplantation etc.).

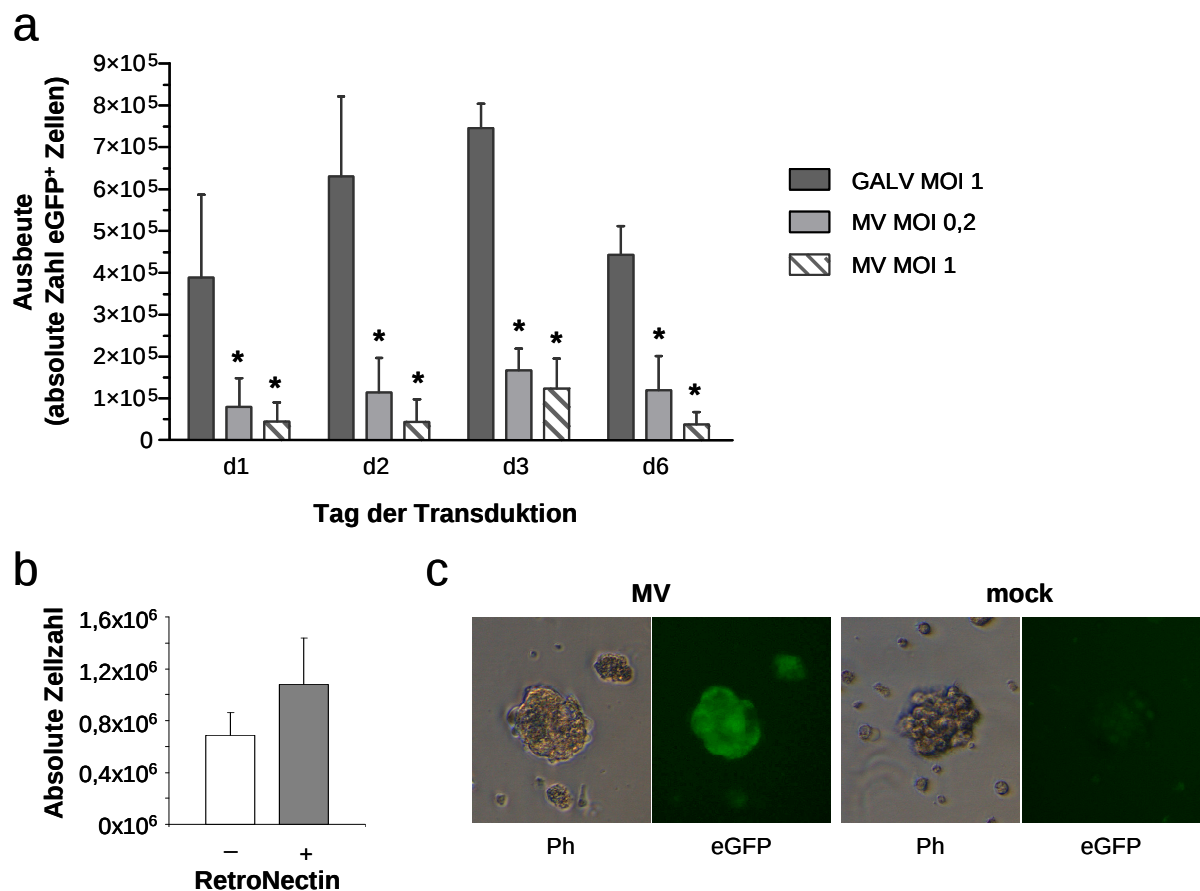


Abbildung 17 – Höhere Ausbeute transduzierter Zellen bei Transduktion mit GALV-LVV. Primäre B-Zellen wurden entweder mit GALV-LVV über RetroNectin oder MV-LVV über *spin*-Infektion transduziert. (a) Absolute Ausbeute CD19⁺/eGFP⁺-Zellen in Abhängigkeit vom Pseudotyp und Dauer der Inkubation. Die Zellen wurden über den angegebenen Zeitraum aktiviert und mit GALV-LVV oder zwei unterschiedlichen MOIs an MV-LVV transduziert. Die Bestimmung der absoluten Zellzahl erfolgte durchflusszytometrisch nach 7 Tagen. Daten repräsentieren Mittelwert ± SD zweier unabhängiger Experimente, die jeweils in Duplikaten angefertigt wurden. **p* < 0,05; Studentsche T-Verteilung. (b) Primäre B-Zellen von zwei Spendern wurden für 1-3 Tage aktiviert und für 24 Stunden in An- (grauer Balken, +) oder Abwesenheit (weißer Balken, -) von RetroNectin kultiviert. Die Bestimmung der absoluten Zellzahl erfolgte durchflusszytometrisch an Tag 7 (*n*=6). (c) Morphologie primärer B-Zellen an Tag 4 nach Transduktion mit MV-LVV (MV, links). Als Kontrolle wurden untransduzierte Zellen verwendet (mock, rechts). Mikroskopiert wurde entweder im Durchlicht (Phasenkontrast, Ph) oder im UV-Licht (FITC-Filtersatz, eGFP).

3.1.5. Steigerung der Expression durch B-Zell-spezifischen *enhancer*

Zur Steigerung der Transgenexpression in primären humanen B-Zellen wurde ein *enhancer* („Verstärker“) aus dem humanen Immunglobulin-Gen der schweren Kette [297, 286] in den bereits verwendeten lentiviralen Vektor LeGO-G2 eingesetzt. Flankiert wird dieser *enhancer* durch sogenannte *matrix-association regions* (MAR) - Regionen, die an die Kern-Matrix gebunden werden. Die Kombination aus schwere-Kette-*enhancer* und MAR wird im Folgenden als hE μ MAR abgekürzt. Eine schematische Darstellung des Vektors LeGO-hE μ MAR-G2 ist in Abbildung 18a gezeigt. Wie hier zu erkennen ist, wurde der *enhancer* in den 5'-Bereich des internen SFFV-Promotors eingesetzt. Der Vektor LeGO-hE μ MAR-G2 wurde nun zur Herstellung lentiviraler Partikel verwendet. Wie in Abbildung 18b zu erkennen ist, konnten keine Unterschiede im Titer für die Pseudotypen MV, GALV und VSV-G detektiert werden.

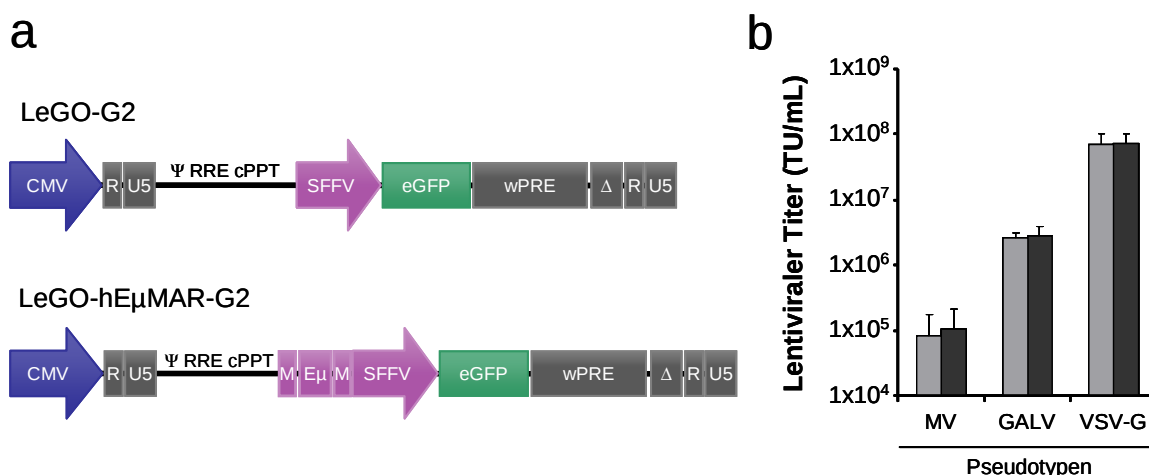


Abbildung 18 – Kein Einfluss des B-Zell-spezifischen *enhancer* auf den lentiviralen Titer. (a) Schematische Darstellung der Vektoren LeGO-G2 und LeGO-hE μ MAR-G2 (nicht maßstabsgetreu). (b) Lentivirale Titer der Vektoren LeGO-G2 (hellgrau) und LeGO-hE μ MAR-G2 (dunkelgrau) in Abhängigkeit der Pseudotypen MV, GALV und VSV-G. 293T-Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden und den Verpackungsplasmiden kotransfiziert, die Partikel entsprechend ihres Pseudotyps geerntet und der Titer durchflusszytometrisch über die Transduktionsrate in Abhängigkeit des Volumens bestimmt (TU/ml, Transfereinheiten/ml).

Für eine systematische Überprüfung der Funktionalität des *enhancers* im Zusammenspiel mit dem SFFV-Promotor wurden verschiedene Zelllinien und auch primäre humane B-Zellen mit dem LeGO-hE μ MAR-G2 und dem LeGO-G2 transduziert und die Expression des Reporterproteins eGFP durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 19a). Die Expressionsstärke wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt und gegen den Vektor LeGO-G2 ohne *enhancer* normalisiert (Abbildung 19b). Da die Expressionsstärke abhängig von der Anzahl der integrierten Proviren ist, wurden nur Transduktionsraten zwischen 5

und 20 % zugelassen. Bei dieser Transduktionsrate weisen statistisch fast 90 % der Zellen nur 1 Integration auf [298] und der direkte Vergleich der Expression ist zulässig.

Bei 293T-Zellen, einer Fibroblasten-Zelllinie, und K562-Zellen, einer Zelllinie myeloiden Ursprungs, konnte keine signifikanter Einfluss des *enhancers* auf die Transgenexpression festgestellt werden (293T: $1,13 \pm 0,17 \times$; K562: $1,07 \pm 0,21 \times$). Bei den beiden hier verwendeten T-Zelllinien Jurkat und PM-1 wurde sogar eher die Tendenz einer verringerten Transgenexpression detektiert (Jurkat: $0,71 \pm 0,11 \times$; PM-1: $0,77 \pm 0,25 \times$). Im Gegensatz dazu wurde bei primären B-Zellen und EBV-immortalisierten B-Zellen eine relativ starke und signifikante Steigerung gemessen (prim. B-Zellen: $2,91 \pm 0,36 \times$; EBV⁺ B-Zellen: $2,48 \pm 0,29 \times$). Die B-Zelllinien MN60 und Raji zeigten einen geringeren aber dennoch signifikanten Effekt (MN60: $1,73 \pm 0,17 \times$; Raji: $1,63 \pm 0,10 \times$), wohingegen der Effekt bei den B-Zelllinien REH, RPMI8226 und CW698 nicht signifikant bzw. im Fall von CW698 sogar negativ war (REH: $1,52 \pm 0,85 \times$; RPMI8226: $1,29 \pm 0,13 \times$; CW698: $0,89 \pm 0,08 \times$).

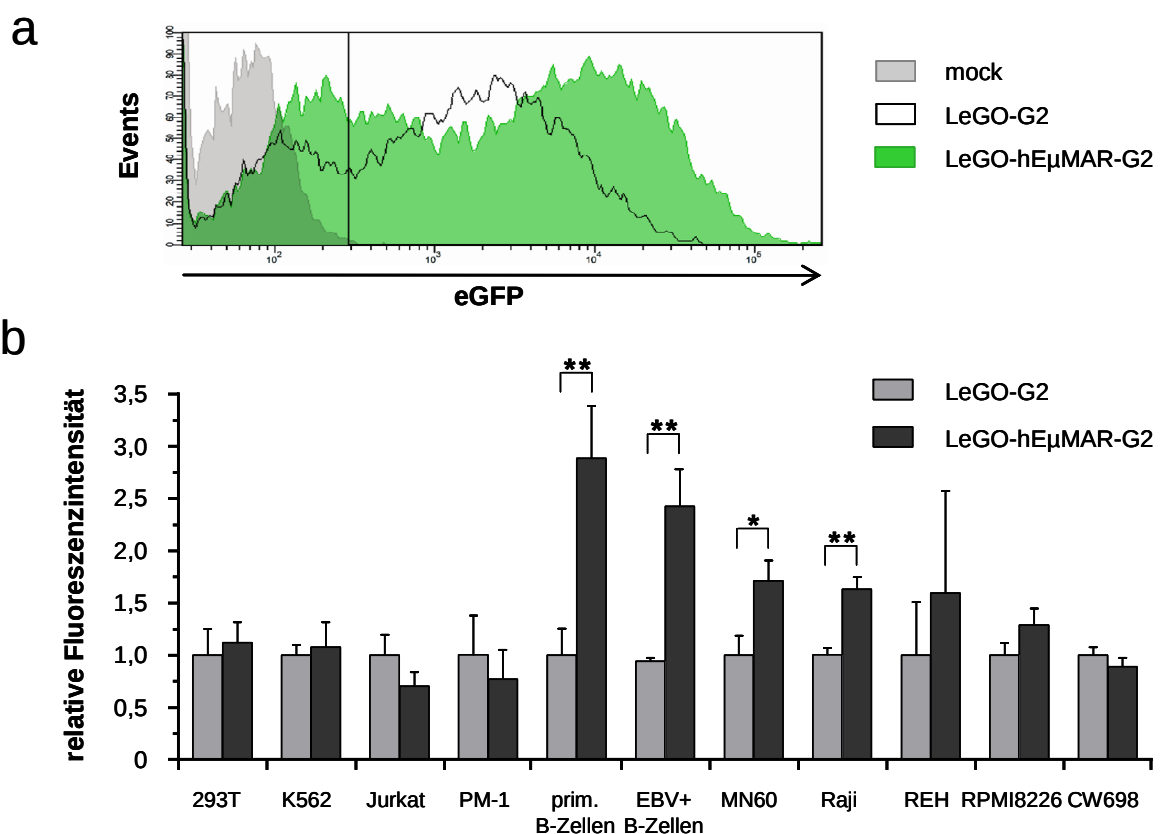


Abbildung 19 – Steigerung der Transgenexpression in primären B-Zellen und B-Zelllinien durch B-Zell-spezifischen *enhancer* hEμMAR. (a) Primäre B-Zellen wurden mittels RetroNectin-Infektion mit GALV-LVV transduziert und die Transgenexpression für die Vektoren LeGO-G2 und LeGO-hEμMAR-G2 bestimmt. Als Kontrolle wurden untransduzierte Zellen verwendet (mock). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus Zweien. (b) Quantifizierung der Transgenexpression nach Transduktion mit den Vektoren LeGO-G2 und LeGO-hEμMAR-G2. Dargestellt ist die normalisierte Expression gegen LeGO-G2 als Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils in Duplikaten durchgeführt); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; prim. = primäre.

3.1.6. B-Zell Phänotyp und Engraftment im Mausmodell nach Transduktion

Für die Charakterisierung eines möglichen Effektes der Transduktion mit GALV-LVV und des *enhancers* auf die Physiologie und den Phänotyp der transduzierten B-Zellen wurde die Verteilung der Phänotypen in einem *in vitro*-Experiment bestimmt.

Hierfür wurden die B-Zellen isoliert, aktiviert und an Tag 2 mit GALV-LVV transduziert. Die B-Zell-Subtypen wurden im Durchflusszytometer zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen entweder untransduziert auf RetroNectin kultiviert oder unbehandelt gelassen (Abbildung 20). Die Verteilung der verschiedenen B-Zell-Subtypen im peripheren Blut der untersuchten Spender entsprach der erwarteten Durchschnittsverteilung humaner Erwachsener [290]. An Tag 1 der Kultivierung war ein vermehrter Anstieg der Gedächtnis B-Zellen und der damit verbundene prozentuale Rückgang der naiven B-Zellen zu verzeichnen. Dieser Trend setzte sich an Tag 3 fort. Verglichen mit Tag 3 konnten an Tag 5 weniger Gedächtnis B-Zellen detektiert werden; an Tag 7 stieg der Anteil wieder an. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied zwischen transduzierten, RetroNectin-behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden.

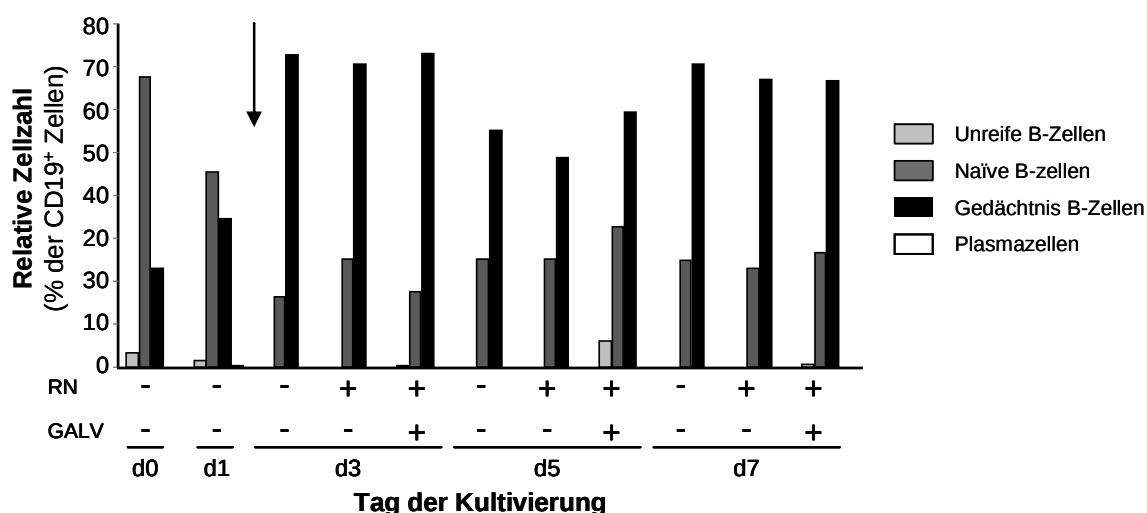


Abbildung 20 – Kein Einfluss der experimentellen Prozedur auf den Phänotyp primärer B-Zellen. Primäre B-Zellen gesunder Spender wurden isoliert (d0), über CD40L/IL-4 stimuliert und an Tag 2 nach Isolation mit GALV-LVV auf RetroNectin-beschichteten Platten mit LeGO-hEμMAR-G2 transduziert (RN+, GALV+; Pfeil markiert die Transduktion). Als Kontrollen wurden untransduzierte Zellen entweder auf RetroNectin beschichteten Platten kultiviert (RN+, GALV-) oder unbehandelt gelassen (RN-, GALV-). Die Bestimmung der B-Zell-Subtypen erfolgte nach folgendem Antikörper-Schema: unreife B-Zellen (CD10d+, CD38+, sIgM+); naïve B-Zellen (CD10-, CD27-); Gedächtnis B-Zellen (CD10-, CD27+); Plasmazellen (CD10-, CD38+, CD27+). Für RN+/GALV+ wurden die B-Zell-Subtypen innerhalb der transduzierten Zellpopulation angegeben. Ein repräsentatives Ergebnis aus insgesamt 3 Experimenten mit unabhängigen Spendern ist dargestellt. RN = RetroNectin

Der Einfluss der experimentellen Prozedur auf die Kapazität der humanen B-Zellen in einem *in vivo*-Versuch zu überleben (bzw. anzuwachsen (Engraftment)), wurde in einem Mausversuch analysiert (Abbildung 21a). Hierfür wurden B-Zellen zweier unabhängiger Spender isoliert und an Tag 3 nach Aktivierung durch CD40L/IL-4 mit GALV-LVV über RetroNectin-beschichtete Platten transduziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen geerntet und zwischen 7×10^6 und 1×10^7 CD19⁺-Zellen in die Schwanzvene immunsupprimierter Mäuse (Rag2^{-/-} γ_c ^{-/-}) injiziert. An Tag 2-7 wurden die Tiere getötet und Milz, peripheres Blut und Knochenmark entnommen. Die Einzelzellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression des humanen Lymphozyten-Markers CD45 und des Reporterproteins eGFP getestet. Das Ergebnis zweier untersuchter Tiere findet sich in Abbildung 21c. In der Endanalyse konnten nur einige hundert humane Zellen in der Milz detektiert werden. Dem ungeachtet war der relative Prozentsatz GALV-transduzierter Zellen (eGFP⁺) nach Transplantation fast identisch mit dem Anteil eingesetzter GALV-transduzierter B-Zellen (prä-Transplantation: $24 \pm 2\%$; post-Transplantation: $22 \pm 9\%$; für $n=4$). Dies könnte darauf hinweisen, dass das in dieser Arbeit etablierte Protokoll und die Expressionskassette mit dem B-Zell-spezifischen *enhancer* keinen negativen Einfluss auf das Überleben der B-Zellen im Kurzzeit-Mausmodell haben.

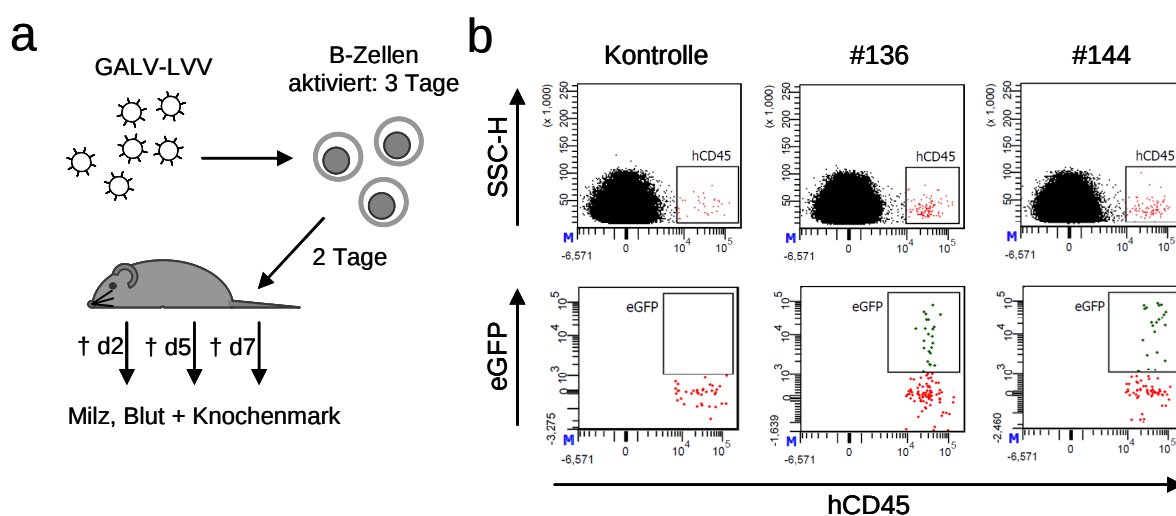


Abbildung 21 - Kurzzeit-Engraftment der transduzierten B-Zellen im Mausmodell. (a) Schematische Darstellung des Mausversuchs. B-Zellen wurden isoliert und an Tag 3 nach Stimulation durch CD40L/IL-4 mit GALV-LVV (LeGO-hEμMAR-G2) transduziert. Die Zellen wurden weitere 2 Tage kultiviert und in Rag2^{-/-} γ_c ^{-/-} Mäuse appliziert. Die Endanalyse (Organentnahmen, Entnahme peripheren Blutes) wurde 2-7 Tage nach Transplantation durchgeführt. (b) Engraftment-Kapazität transduzierter Zellen. Durchflusszytometrische Bestimmung des Kurzzeit-Engraftments durch Detektion humaner hämatopoetischer (CD45⁺; oben) und eGFP-positiver (eGFP⁺; unten) Zellen in der hCD45⁺-Population in der murinen Milz.

3.1.7. Generierung des lentiviralen sC46-Expressionskonstrukts

Schließlich wurde das optimierte Protokoll für die Expression des Eintrittsinhibitors sC46 angewendet (1.2.3; [145]). Um die Produktion des Peptids in den Zielzellen zu überprüfen, wurde eine intrazelluläre Färbung mithilfe des 633-gekoppelten Antikörpers 2F5 durchgeführt. Die maximale Extinktion des 633-Fluorochroms liegt bei 638 nm, die maximale Emission bei 658 nm. Da diese indirekte Form des Nachweises nur bedingt die Charakterisierung und Optimierung von Vektorsystemen erlaubt, wurde zu Beginn dieser Arbeit das Expressionskonstrukt durch ein Reporterprotein ergänzt. Hierfür wurde das Fluoreszenzprotein TSapphire [299] gewählt; ein Protein, welches im Durchflusszytometer bei 399 nm angeregt wird und bei 511 nm emittiert. Die großen Unterschiede in den Emissionsbereichen ermöglichen eine simultane Messung des Reporterproteins und des sC46. Der Vektor wird im Folgenden LeGO-sC46-iS2 genannt. Analog wurde der Vektor auch für eine eGFP-Koexpression hergestellt (LeGO-sC46-iG2).

Zur Überprüfung der Funktionalität und Langzeitexpression durch das lentivirale Konstrukt wurde die EBV-immortalisierten B-Zelllinie BLS DR2a transduziert und die Expression des TSapphire und des sC46 im Durchflusszytometer über einen Zeitraum von 65 Tagen bestimmt (Abbildung 22). Die Expression des TSapphires war weniger Schwankungen unterlegen als die Expression des sC46. Es ist wahrscheinlich, dass TSapphire als Reporterprotein eher den Transduktionsstatus in der Zelle widerspiegelt als die intrazelluläre Färbung, deren geringere Sensitivität zu einer Unterschätzung der Transduktionseffizienz führt. Nichtsdestotrotz, ist die intrazelluläre Färbung des Peptids ein geeigneter Richtwert für die Expression.

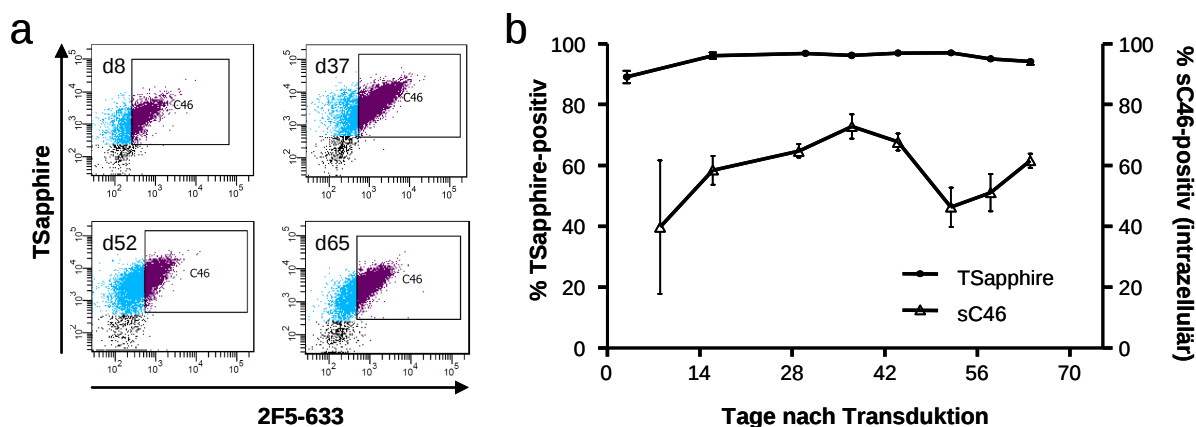


Abbildung 22 – Stabile Langzeitexpression des sC46 und des Reporterproteins TSapphire. EBV-immortalisierte B-Zellen (BLS DR2a) wurden mit dem LeGO-sC46-iS2 transduziert und die Koexpression von sC46 und TSapphire über einen Zeitraum von 65 Tagen im Durchflusszytometer bestimmt. (a) Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie für Tag 8, 37, 52 und 65. (b) Darstellung des Verlaufs über den gesamten Messzeitraum; $n=2$; Mittelwert $\pm$ SEM.

3.1.8. Sekretion des Eintrittsinhibitors sC46 durch Zelllinien

Für die Überprüfung der sC46-Sekretion wurden 293T-, K562- und immortalisierte B-Zellen (BLS DR2a) mit LeGO-sC46-iS2 kodierenden lentiviralen Partikeln transduziert und die Konzentration des Eintrittsinhibitors im Zeitverlauf gemessen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte über einen kompetitiven sC46-ELISA. Wie in Abbildung 23 zu erkennen, konnte nur für die 293T- und K562-Zellen eine dauerhafte Sekretion nachgewiesen werden. Im Fall der BLS DR2a-Zellen waren die Konzentrationen an Tag 24, 31, 38 und 45 nach Transduktion unterhalb der Detektionsgrenze. Gemittelt über den gesamten Versuchszeitraum sezernierten die 293T-Zellen mit einer mittleren Konzentration von $141,8 \pm 45,2$ nM eine ca. 4 x höhere Menge als die K562-Zellen mit $33,8 \pm 21,6$ nM. Für beide Zelllinien war über den Beobachtungszeitraum eine abnehmende Tendenz zu beobachten.

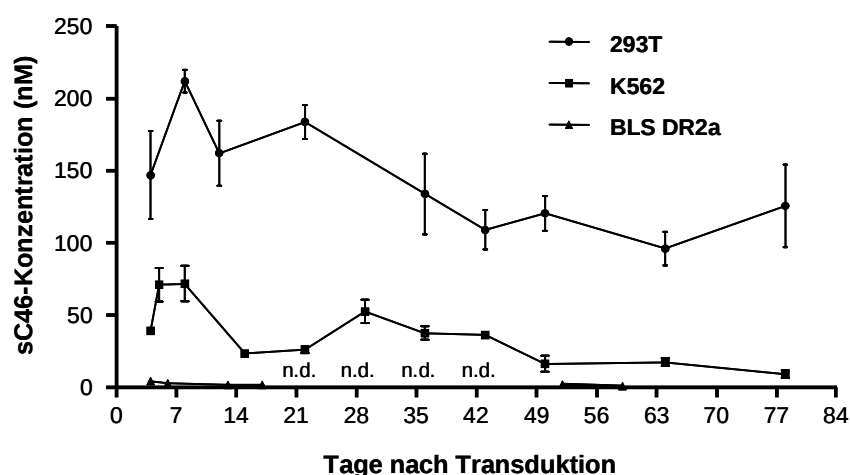


Abbildung 23 - sC46-Sekretion nach Transduktion von 293T, K562 und BLS DR2a. Die Transduktion der Zellen erfolgte mit LeGO-sC46-iS2. Die Konzentration wurde mittels sC46-ELISA bestimmt. n.d. = nicht detektierbar; $n=1-3$, Mittelwert $\pm$ SEM.

3.1.9. Geringe sC46-Sekretion durch transduzierte B-Zellen

Für die Transduktion von B-Zellen wurde der Expressionsvektor für das sC46 mit dem *enhancer* hEμMAR versehen (siehe 3.1.5). Die Konstrukte werden im folgenden LeGO-hEμMAR-sC46-iS2 bzw. -iG2 genannt. Wie in Abbildung 22 bereits dargestellt, stellt die Expression des Reporterproteins einen guten Richtwert für die Transduktionsrate dar. Im Vergleich dazu wird durch die relativ schwache intrazelluläre Färbung des sC46 die eigentliche Transduktionsrate unterschätzt. Für die Validierung der neu hergestellten Konstrukte wird daher die Positivität des eGFP herangezogen (siehe Abbildung 24a). Es konnte eine $1,8 \pm 0,1$ x stärkere Expression in B-Zellen durch Verwendung des hEμMAR erzielt werden.

In weiteren Versuchen wurden die optimierten Konstrukte für die Transduktion von B-Zellen und die Vermessung der Zellüberstände im sC46-ELISA herangezogen. Wie bereits in Abbildung 16 gezeigt, liegt die optimale MOI im Bereich von 1-5. Dieses konnte für die sC46-exprimierenden Vektoren bestätigt werden (siehe Abbildung 24b). Unter optimalen Bedingungen wurden so in unabhängigen Versuchen Transduktionsraten von 18-20 % erreicht. Im Vergleich zu 293T- und K562-Zellen (334 ± 70 nM bzw. 22 ± 9 nM) wurde im Überstand transduzierter B-Zellen nur eine sehr geringe Menge sezerniertes sC46 detektiert ($5,4 \pm 1,5$ nM; Abbildung 24c). Auch mesenchymale Stamm-/Stromazellen und primäre T-Zellen zeigten vergleichbar geringe sC46-Level im Überstand (4.1.3; nicht gezeigt).

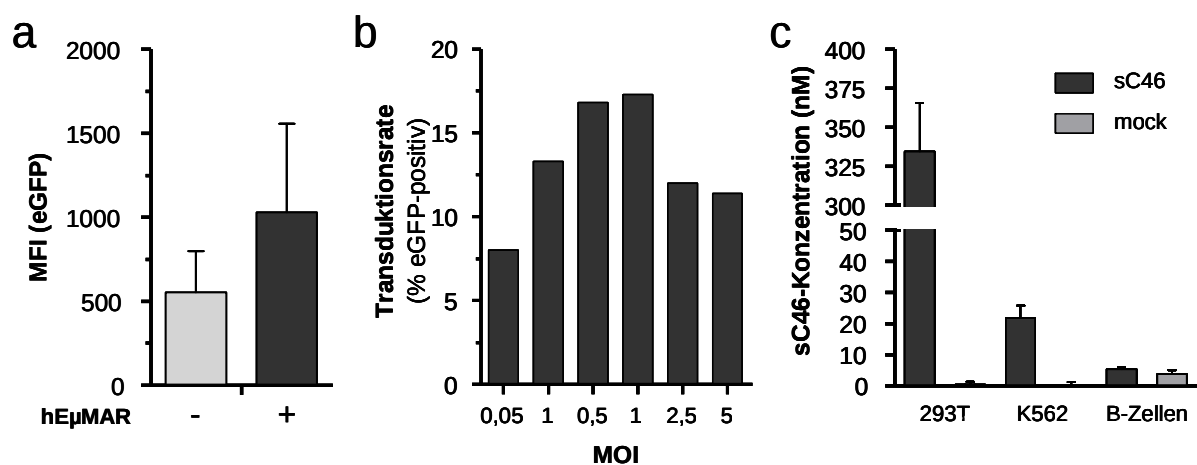


Abbildung 24 - Validierung der LeGO-hEμMAR-sC46 Vektoren und Sekretionslevel. Primäre humane B-Zellen wurden aktiviert und nach 3 Tagen mit GALV-pseudotypisierten LeGO-hEμMAR-sC46-iG2 transduziert. (a) Steigerung der MFI (eGFP) für LeGO-hEμMAR-sC46-iG2 (hEμMAR+, dunkelgrau) gegenüber LeGO-sC46-iG2 (hEμMAR-, hellgrau). Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD der MFI des Reporterproteins eGFP für 2 unabhängige Versuche. (b) Optimierung der MOI bei der Verwendung des LeGO-hEμMAR-sC46-iG2. Dargestellt ist die Transduktionsrate als % eGFP⁺-Zellen 4 Tage nach Transduktion mit unterschiedlichen MOIs. (c) sC46-Konzentration im Zellüberstand nach Transduktion von 293T-, K562- und primären B-Zellen. Die Transduktion der 293T- und K562-Zellen bzw. der B-Zellen erfolgte mit dem LeGO-sC46-S2 (sC46) und LeGO-iS2 (mock) bzw. mit LeGO-hEμMAR-sC46-iG2 (sC46) und LeGO-hEμMAR-G2 (mock). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im sC46-ELISA ($n=4-6$).

3.2. Lentivirale Vektoren für den Knock-out des HIV-Korezeptors CCR5 über sequenzspezifische Nukleasen

In diesem Teil der Arbeit wurde ein lentivirales Vektorsystem für den Transport sequenzspezifischer Nukleasen - im Speziellen der TAL-Effektor Nukleasen (TALEN) - entwickelt. Am Beispiel des Zielgens CCR5, dessen Knock-out zu einer HIV-1-Resistenz führen kann, wurde das für ZFN etablierte System der nicht-integrierenden (NILV) und integrierenden (ILV) Lentiviren getestet. Im Gegensatz zu den ZFN führte die Transduktion mit TALEN über bisherige lentivirale Systeme aber nicht zum Knock-out. Durch Untersuchungen der viralen RNA und proviralen DNA konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass zwar intakte RNA transportiert, aber nur stark rekombinierte provirale DNA ins Zielgenom integriert wird. Darauf basierend wurde hier ein System entwickelt, mit dem lentivirale Vektoren als reines RNA-Transportvehikel genutzt werden können. Die Rekombination bei der reversen Transkription wird somit umgangen. Das System wurde charakterisiert und optimiert. Schließlich wurde untersucht, ob das neuentwickelte lentivirale System für den TALEN-vermittelten Knock-out geeignet ist.

3.2.1. Transduktion mit TALE-Nukleasen über integrierende und nicht-integrierende Lentiviren

Für die Expression der CCR5-spezifischen TALE-Nukleasen durch Lentiviren wurden zunächst die beiden jeweiligen TALEN-Arme in LVV umklont. Da das verwendete NILV-System auf Lentiviren der 2. Generation beruht, wurde für die Klonierung der Vektor LNT-SFFV-MCS verwendet. Mit den Konstrukten (Abbildung 25a) wurden nicht-integrierende lentivirale Partikel hergestellt. Als Positiv-Kontrolle wurden CCR5-spezifische ZFN herangezogen [300, 301], da für ZFN bereits erfolgreich gezeigt werden konnte, dass sie sich über NILV transportieren lassen [281]. Die lentiviralen Expressionsplasmide für die CCR5-ZFN wurden freundlicherweise von Dr. Emma Chan (Institute of Child Health, University Clinic London) zur Verfügung gestellt. Die Partikel wurden für die Transduktion der Reporterzelllinie CCR5⁺-GHOST verwendet (Abbildung 25b). Da sowohl die Zinkfinger als auch die TAL-Effektoren an die FokI-Nuklease gekoppelt vorliegen und diese nur als Dimer effizient DSBs induzieren, wurden als weitere Kontrollen nur die rechten bzw. linken Arme der Konstrukte transduziert (5L bzw. 5R). Für die ZFN wurden wie erwartet hohe CCR5-Knock-out Raten erzielt (MOI 5: $86,4 \pm 4,4$ %). Der Effekt war hierbei abhängig von der eingesetzten MOI. Im Gegensatz dazu konnte für die TALEN kein Expressionsverlust des CCR5 detektiert werden.

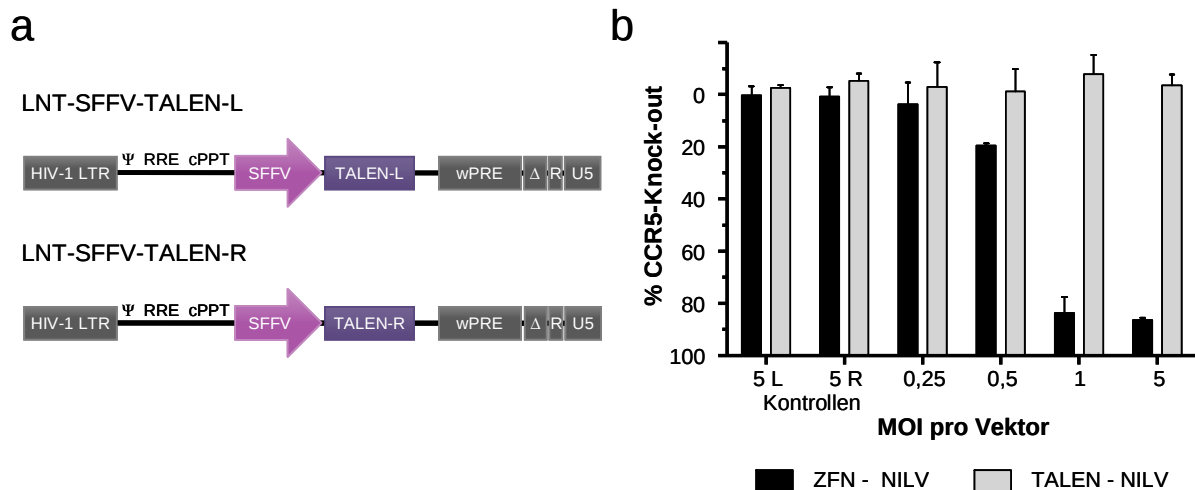


Abbildung 25 – Kein Knock-out des CCR5 nach Transduktion mit TAL-Effektor Nukleasen über nicht-integrierende lentivirale Vektoren (NILV). (a) Schematische Darstellung der lentiviralen Expressionsplasmide für CCR5-spezifische TALEN (L = linker Arm; R = rechter Arm; nicht maßstabsgetreu). (b) Knock-out des humanen CCR5. CCR5-spezifische ZFN und TALEN wurden in ansteigenden MOIs über NILV in CCR5⁺-GHOST Zellen transduziert. Der relative Knock-out wurde über die CCR5-Expression im Durchflusszytometer bestimmt und gegen untransduzierte CCR5⁺-GHOST Zellen normalisiert. Als Kontrolle wurde entweder nur der jeweilige linke Arm (5L) bzw. rechte Arm (5R) verwendet. $n=2$; Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD.

Um zu überprüfen, ob die Transduktion oder die Expression der TALEN fehlerhaft war, wurden die Expressionskassetten erneut in das lentivirale LeGO-System umgesetzt (Abbildung 26a). Die Expression der TALEN-Arme wurde über eine IRES an Reporterproteine gekoppelt (links + eGFP, rechts + tdTomato), um die Kontrolle der Transduktionseffizienzen zu ermöglichen. Zunächst wurde in einem Transfektionsexperiment die Funktionalität der Konstrukte überprüft. Da die Transfektion der CCR5⁺-GHOST-Zellen nicht erfolgreich war, wurde für dieses Experiment ein CCR5⁺-293T-Zellklon generiert. Hierfür wurde ein CCR5-Expressionsvektor hergestellt (LeGO-hCCR5-mTagBFP-puro⁺). Nach Transduktion mit diesem Konstrukt (ca. 1 Kopie/Zelle) wurden über FACS Einzelzellklone generiert und diese auf Stabilität des CCR5-Expression untersucht. Da nicht nur die Transfektion mit der neuen CCR5⁺-293T-Reporterzelllinie effizienter sondern auch die CCR5-Expression stabiler war als in den CCR5⁺-GHOST-Zellen, wurden für alle folgenden Versuche die neuen CCR5⁺-293T-Reporterzellen verwendet.

Die Transfektion der Einzelkonstrukte resultierte nicht in einer Reduktion der CCR5-Expression (CCR5-Knock-out). Die Kotransfektion beider Arme hingegen induzierte den CCR5-Knock-out in 66 % der Zellpopulation. Im Transduktionsexperiment mit ILV konnte zwar eine Expression der Reporterproteine detektiert werden (bis zu 63 % eGFP/tdTomato-doppelpositiv), ein Knock-out des CCR5 wurde allerdings nicht induziert (Abbildung 26c).

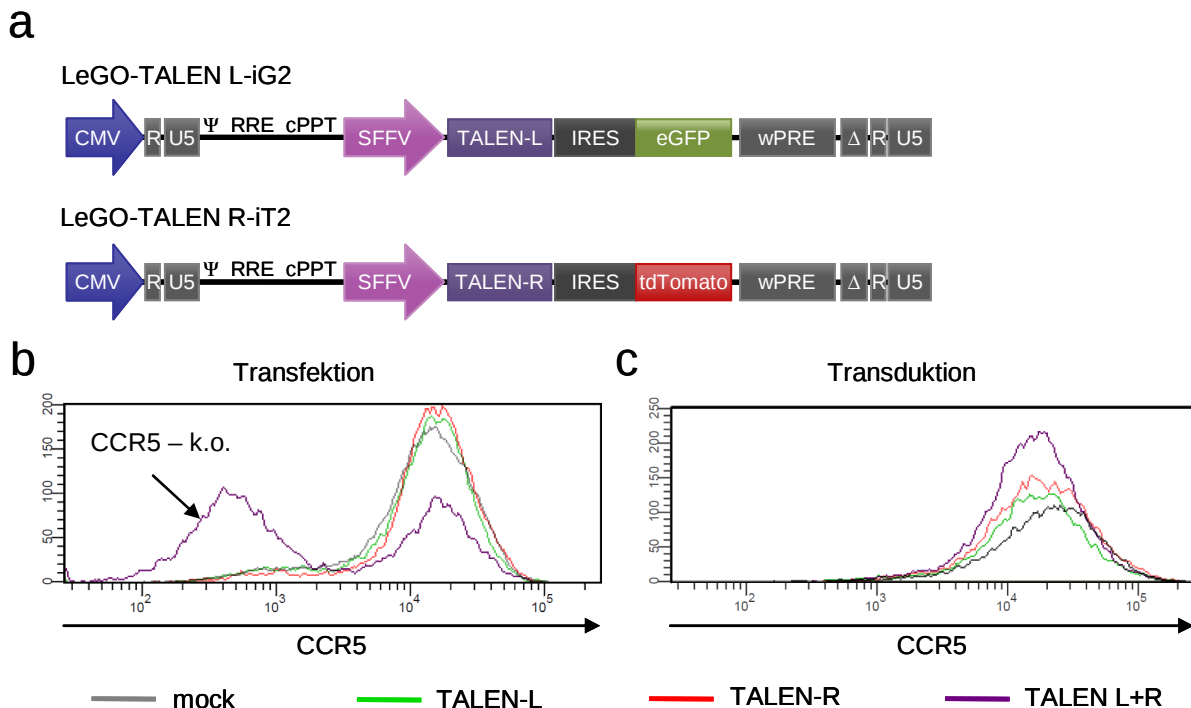


Abbildung 26 - Validierung der lentiviralen TALEN-Expressionsvektoren. (a) Schematische Darstellung der TALEN-kodierenden LeGO-Vektoren (nicht maßstabsgetreu). (b) Transfektion der lentiviralen TALEN-Expressionskonstrukte. CCR5⁺-293T-Zellen wurden jeweils mit 5 µg DNA transfiziert und die Expression des CCR5 nach 5 Tagen im Durchflusszytometer gemessen. (c) Transduktion mit TALEN-ILV. CCR5⁺-293T-Zellen wurden jeweils mit einer MOI von 5 transduziert und die Expression des CCR5 nach 5 Tagen im Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrolle wurden jeweils untransfizierte bzw. untransduzierte Zellen verwendet (mock). k.o. = Knock-out, L = linker Arm; R = rechter Arm.

3.2.2. Untersuchung der proviralen DNA und viralen RNA in TALEN-kodierenden Lentiviren.

Da weder die Transduktionsexperimente noch die Konstrukte fehlerhaft waren, wurde untersucht, ob die provirale DNA der TALEN-Vektoren vollständig in die genomische DNA der Zielzelle integriert. Hierfür wurden CCR5⁺-293T-Zellen mit TALEN-ILV transduziert und die provirale DNA aus der genomischen DNA einer Massenkultur über eine PCR amplifiziert (u40/u41, Abbildung 27a). Interessanterweise konnte kein distinktes Volllängen-Fragment mit einer Länge von ca. 2,7 kb detektiert werden (Abbildung 27b). Stattdessen wurde ein DNA-Schmier im Bereich von ca. 1,5 kb nachgewiesen. Um diesen Schmier weiter zu charakterisieren, wurde die DNA aus dem Bereich des Gels extrahiert und in pJET1.2-Vektoren subkloniert. Einzelklone wurden gepickt und sequenziert (pJET F, pJET R) (Abbildung 27d). 15 von 15 analysierten Klonen wiesen Deletionen im Bereich der TALE-Monomere auf. Bei allen blieb der offene Leserahmen erhalten.

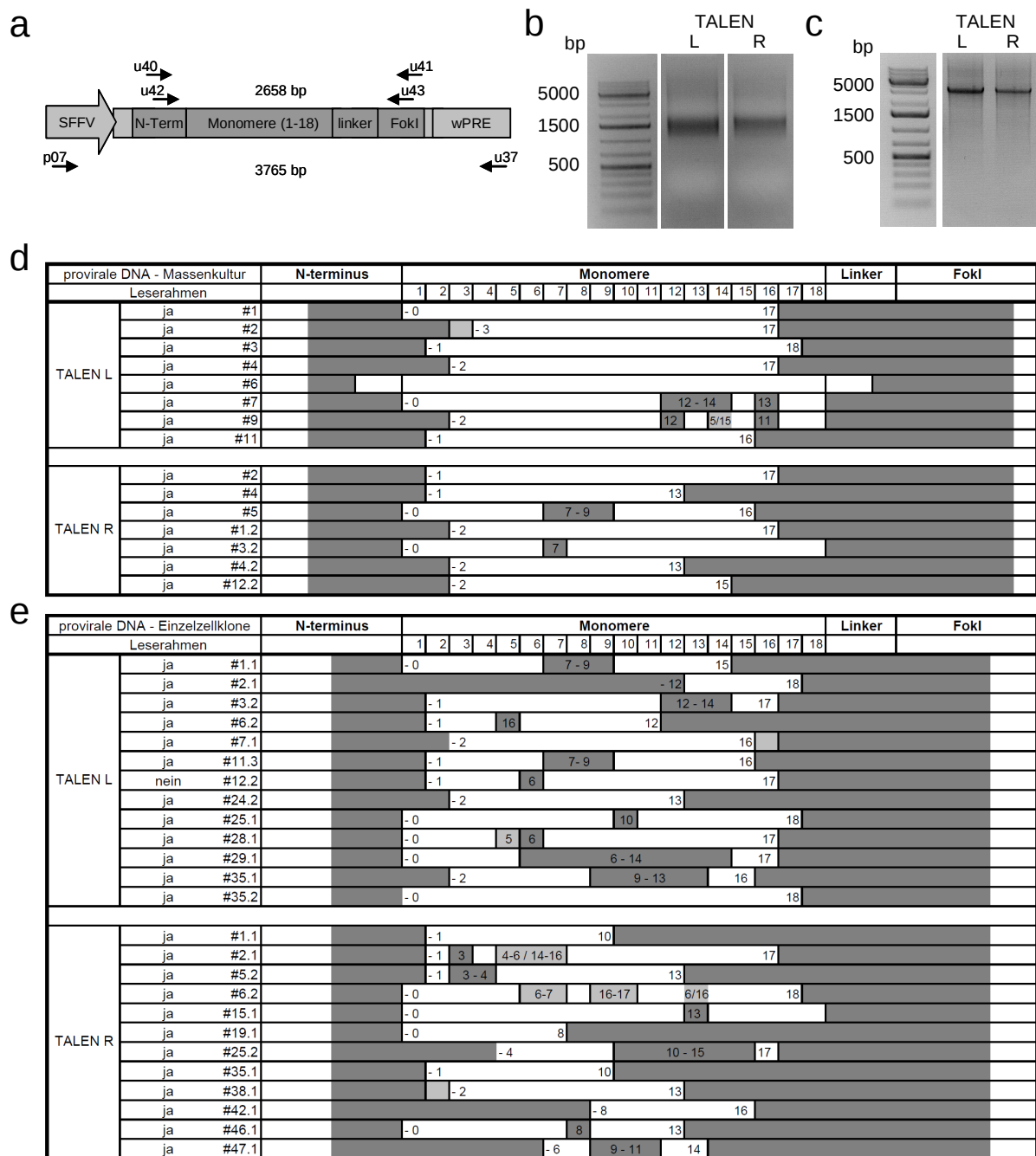


Abbildung 27 - Rekombination in der proviralen DNA TALEN-kodierender Lentiviren bei intakter viraler RNA. (a) Schematische Darstellung des PCR-Designs (nicht maßstabsgetreu). Zur Amplifikation der proviralen DNA wurden folgende Primer verwendet: Massenkultur = u40/u41; Einzelzellklone = u40/u41 und u42/u43. Primer p74/u37 wurden für die Analyse der viralen RNA herangezogen. (b) PCR auf integrierter proviraler DNA. Der Schmier der unerwartet kleinen PCR-Produkte wurde subkloniert und auf Rekombinationen untersucht. (c) PCR auf *in vitro* revers transkribierter viraler RNA. Fragmente wurden isoliert und die Intaktheit durch Sequenzierung überprüft. (d und e) Frequenz und Vorkommen von Rekombination in proviraler TALEN-DNA. (d) Provirale DNA aus einer Massenkultur. (e) Provirale DNA aus Einzelzellklonen. Das Rekombinationsmuster für den rechten (TALEN R) bzw. linken (TALEN L) Arm ist dargestellt als graue Blöcke. Weiße Areale repräsentieren Deletionen, hellgraue Blöcke entsprechen Monomeren, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Die Erhaltung des Leserahmens ist mit „ja“ oder „nein“ angegeben. N-Term. = N-Terminus der TALEN.

Da bei einer Subklonierung kleinere Fragmente meist bevorzugt eingebaut werden und größere oder sogar Vollängen-Konstrukte statistisch unterrepräsentiert sind, wurden über FACS Einzelzellklone aus der Massenkultur abgelegt. Erneut wurde die provirale DNA amplifiziert (*nested* PCR; erste PCR: u40/u41; zweite PCR: u42/u43; siehe Abbildung 27a), subkloniert und sequenziert (Abbildung 27e). Auch hier wiesen alle 25 der 25 analysierten Einzelzellklonen Deletionen im Bereich der TALE-Monomere auf. Bei 24 der 25 untersuchten Klone blieb der Leserahmen erhalten. Insgesamt traten bei 40 der 40 Klone Rekombinationen auf. 17/40 zeigten ein Rekombinationsevent, 20/40 mindestens zwei. Bei drei Klonen konnte keine eindeutige Zuordnung erfolgen (Abbildung 27d: TALEN L #2; Abbildung 27c: TALEN L #7.1, TALEN R #38.1).

Als weiterer Schritt wurde nun auch die virale RNA auf Intaktheit untersucht. Hierfür wurden lentivirale Partikel aufgearbeitet und die virale RNA isoliert. Die cDNA wurde über eine *in vitro* reverse Transkription hergestellt und die TALEN-kodierende Region über eine PCR amplifiziert (p07/u37, siehe Abbildung 27a). Interessanterweise konnten hierbei für beide TALEN-Arme überwiegend Vollängenfragmente detektiert werden (Abbildung 27c). Dass es sich hierbei um intakte TALEN-kodierende Bereiche handelt, konnte durch Sequenzierung bestätigt werden. Zusammenfassend wurde in diesem Abschnitt gezeigt, dass zwar Vollängen-RNA in die viralen Partikel verpackt wird, die revers transkribierte provirale DNA allerdings variable ist und z.T. sehr lange Deletionen mehrerer Monomere aufweist.

3.2.3. Generierung nicht-revers transkribierender Lentiviren

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, werden intakte virale RNAs in den viralen Partikeln transportiert. Offensichtlich kommt es aber bei der Entstehung der proviralen DNA während der reversen Transkription der TALEN-kodierenden Bereiche zu Rekombinationen (Deletionen und Austausch). Um dieses zu verhindern, wurde eine neuartige enzymatisch inaktive reverse Transkriptase entwickelt. Das aktive Zentrum ist in Retroviren stark konserviert und besteht aus den Aminosäuren YXDD bzw. YMDD in Lentiviren [302]. In einer Megaprimer-PCR (Primer u44, u45 und u46) wurde das aktive Zentrum im Verpackungsplasmid pMDLg/pRRE gezielt mutiert: Die Asparaginsäuren an Position 185 und 186 der reversen Transkriptase wurden gegen Valine ausgetauscht (D185V und D186V;

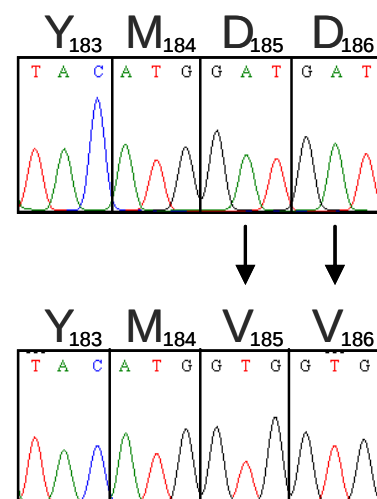


Abbildung 28 - Inaktivierung der reversen Transkriptase durch gezielte Mutation. Austausch der Asparaginsäuren (D) an Position 185 und 186 im aktiven Zentrum (YMDD) durch Valine.

Abbildung 28). LVV, die mit dem neuen Verpackungsplasmid pMDLg/pRRE_ΔRT produziert wurden, sind im Folgenden nicht-revers transkribierende lentivirale Vektoren (NRTLTV) genannt.

Sowohl bei ILV als auch bei NILV wird die mRNA des transportierten Transgens in der Zielzelle neu produziert (bei in dieser Arbeit verwendeten Vektoren über den Promotor SFFV). Im Gegensatz dazu wird bei NRTLTV die virale RNA direkt für die Translation verwendet. Zwar verfügt die virale RNA über ein sogenanntes 5'-*cap*, welches bei der Rekrutierung der Ribosomen eine essentielle Rolle spielt (siehe Abbildung 9) doch weist der 5'-Bereich der lentiviralen Vektoren (hier LeGO-G2) schon vor dem eigentlichen Transgen 19 Startcodons und daraus resultierend 19 abgeschlossene offene Leserahmen auf. Obwohl keinem dieser Startcodons eine Kozak-Sequenz vorangestellt ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass eine *cap*-abhängige Translation des relevanten Transgens nur sehr ineffizient funktioniert (vgl. Abbildung 29a; -IRES). Alternativ zur *cap*-abhängigen Translation kann auch eine *cap*-unabhängige Translationsinitiation über eine sogenannte interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) erfolgen. Um zu überprüfen, ob die Translation des Transgens im NRTLTV-System effizienter initiiert wird, wurden virale Partikel mit zwei Vektoren (LeGO-G2 (ohne IRES, *cap*-abhängig); LeGO-iG2 (mit IRES, *cap*-unabhängig)) produziert und die Produktion des Transgens eGFP im Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 29a-b). Abbildung 29a stellt die stärkere Expression mithilfe der IRES dar; in Abbildung 29b ist die signifikante Steigerung der eGFP-Translation durch *cap*-unabhängige Translationsinitiation quantifiziert (+IRES = $5,4 \pm 0,2 \times$).

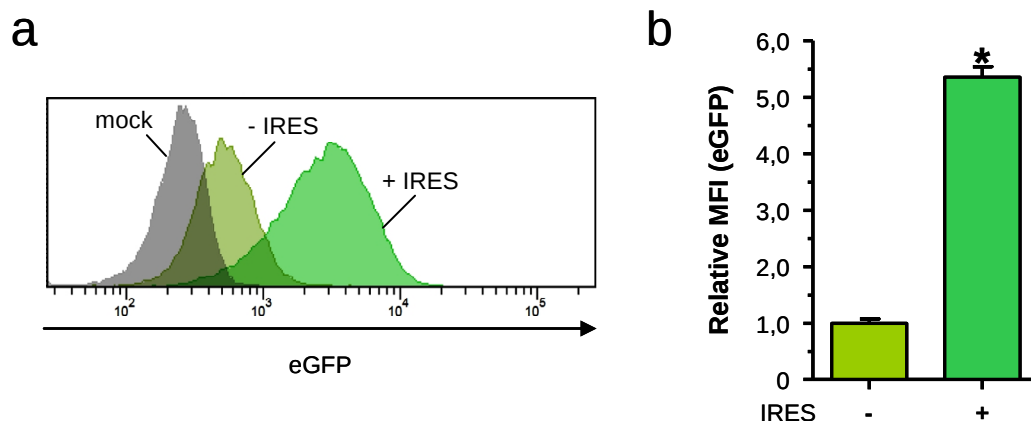


Abbildung 29 – Verbesserte Expression im NRTLTV-System durch *cap*-unabhängige Translationsinitiation. (a+b) Optimierung der Translation beim NRTLTV-System. eGFP-kodierende mRNA wurde entweder mit IRES (LeGO-iG2) oder ohne IRES (LeGO-G2) über NRTLTV transportiert und die MFI nach 2 Tagen im Durchflusszytometer gemessen. Darstellung im Histogramm (a) und Quantifizierung der Expressionssteigerung (b) durch Einsatz der IRES. Normalisierung gegen LeGO-G2 (- IRES); $n=4$; $*p < 0,005$.

3.2.4. Validierung des NRTLTV-Systems und Optimierung durch Hypothermie

Da es sich bei dem NRTLTV-System um einen reinen Transport von mRNA handelt und diese nicht ins Wirtsgenom integriert werden kann, handelt es sich um ein transientes Expressionssystem. Um dieses zu bestätigen, wurde ein Kinetik-Versuch durchgeführt. Hierfür wurden LeGO-iG2-NRTLTV hergestellt und 293T-Zellen transduziert. Die Expression des eGFP wurde zu den angegebenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von insgesamt 7 Tagen gemessen (Abbildung 30a). Die stärkste Expression wurde nach einer Inkubationsdauer von 36-48 h gemessen. Die Signalstärke ging danach zurück und war an Tag 5 wieder auf Hintergrundniveau. Diese Daten zeigen zum einen, dass es sich um ein transientes System handelt. Zum anderen machen sie aber auch deutlich, dass es kein reiner Proteintransport ist. Im Falle eines reinen Proteintransports würde die Expression nach Transduktion abfallen und nicht ansteigen [303, 304].

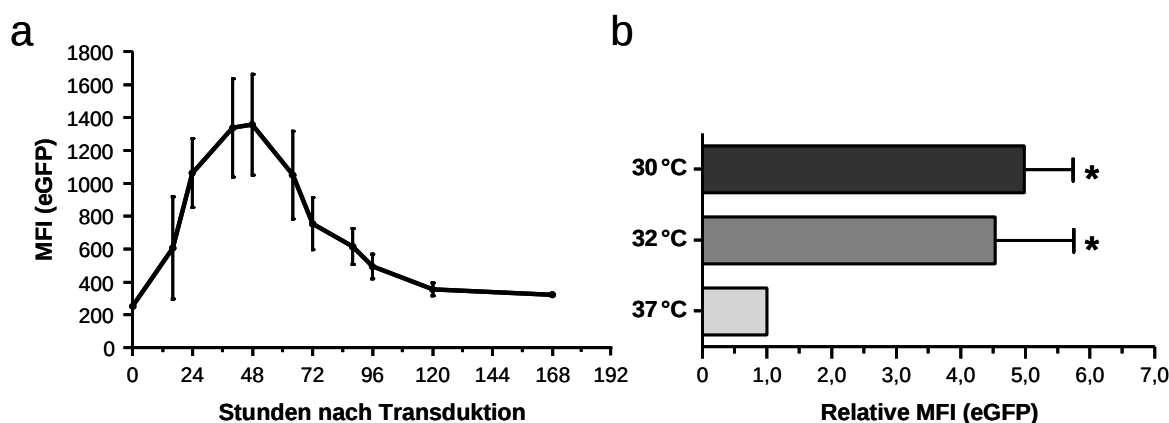


Abbildung 30 – Transiente Expression im NRTLTV-System und Optimierung durch hypothermische Kulturbedingungen. 293T-Zellen wurden mit LeGO-iG2-NRTLTV transduziert und die MFI des eGFP mittels Durchflusszytometer bestimmt. (a) Kinetik. Mittelwerte $\pm$ SEM für 3 unabhängige Virusproduktionen. (b) Steigerung der eGFP-Expression durch hypothermische Kulturbedingungen. Zellen wurden nach Transduktion für 48 h bei 30 °C, 32 °C oder 37 °C inkubiert. Darstellung der Mittelwerte $\pm$ SD der relativen MFI normalisiert gegen 37 °C. $n=3$; * $p < 0,01$.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob hypothermische Kulturbedingungen die Effizienz verbessern können. Hypothermie wurde von anderen Gruppen bereits bei der Herstellung rekombinanter Proteine für eine Steigerung der Ausbeuten eingesetzt [305–307]. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Quantifizierung des Hypothermie-Effektes 293T-Zellen mit der gleichen MOI transduziert (LeGO-iG2-NRTLTV) und für 48 h bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Die Signalstärke des eGFP wurde im Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 30b). Es wird deutlich, dass die MFI signifikant verstärkt wird, wenn die Zellen bei hypothermischen Bedingungen (30 °C oder 32 °C) kultiviert werden. Die Steigerung war im Mittel bei 30 °C zwar geringfügig höher als bei 32 °C ($5,0 \pm 0,6 \times$ gegen $4,5 \pm 1,0 \times$), die Morphologie und Proliferation der Zellen war bei 30 °C jedoch beeinträchtigt

(nicht gezeigt). Bei allen folgenden Versuchen mit NRTLTV werden die Zellen nach Transduktion daher zunächst für 48 Stunden bei 32 °C und anschließend bei 37 °C kultiviert.

3.2.5. Expression von TALE-Nukleasen über NRTLTV

Wie oben beschrieben, ist die Translation der Transgene im NRTLTV-System nur mit einer vorangeschalteten IRES effizient. Für die Expression der TALE-Nukleasen wurde daher eine weitere IRES vor den jeweiligen Arm eingesetzt (LeGO-TALEN-L-iG2 bzw. LeGO-TALEN-R-iG2). Da bei NRTLTV sowohl der interne SFFV-Promotor als auch das cPPT-Element (siehe 1.3.1) redundant sind, wurden sie aus den Vektoren entfernt. Eine schematische Darstellung der Vektoren findet sich in Abbildung 31a. Die Testung der Vektoren erfolgte erneut auf CCR5⁺-293T-Zellen (Abbildung 31b). Diese wurden entweder mit jeweils einem TALEN-Arm (L; R) oder mit beiden Armen zusammen (L+R) transduziert. Die Messung der CCR5-Expression erfolgte 5 Tage nach Transduktion im Durchflusszytometer. Es konnte ein Knock-out von $12,3 \pm 2,7$ % erreicht werden. Es ist also möglich, TALEN mit Hilfe von LVV zu transportieren, vorausgesetzt die reverse Transkriptase liegt enzymatisch inaktiv vor.

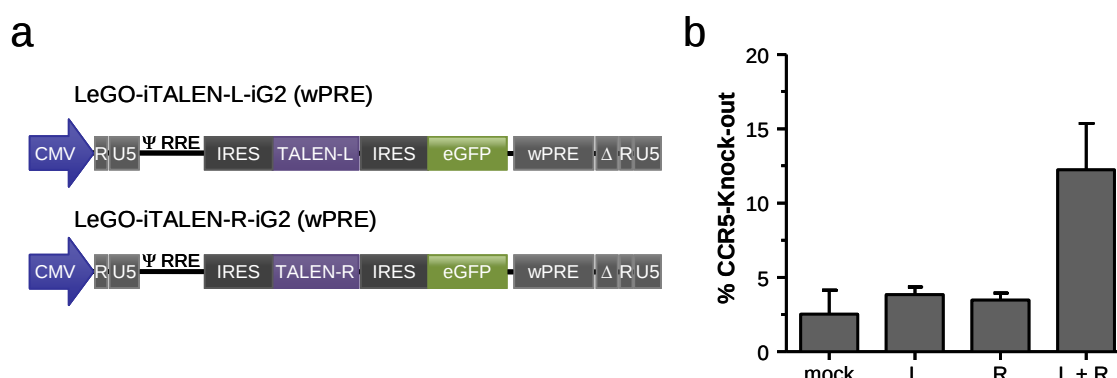


Abbildung 31 – Erfolgreicher Knock-out des CCR5 nach Transport der TALE-Nukleasen durch NRTLTV. (a) Schematische Darstellung des Vektor-Designs (nicht maßstabsgetreu). (b) Knock-out des CCR5 durch NRTLTV-applizierte CCR5-spezifische TALEN. Angegeben ist der relative Anteil CCR5-negativer Zellen an Tag 5 nach Transduktion. Als Kontrolle wurden mock-transduzierte bzw. einzeln transduzierte (L bzw. R) Zellen verwendet.

Im folgenden Abschnitt wurde nun untersucht, ob eine weitere Steigerung der Effizienz durch das Einfügen externer p(A)-Signale möglich ist. Wie bereits beschrieben wird angenommen, dass das interne p(A)-Signal der SIN-Vektoren nur unzureichend erkannt wird (siehe 1.3.1) [258, 259]. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit externe p(A)-Signale in die Vektoren eingefügt. Hierfür wurden die Signale des bovinen Wachstumshormons (*bovine growth hormone*, BGH-p(A)) und des Simian-Virus 40 (SV40-p(A)) verwendet. Es wurden zwei unterschiedliche Positionen gewählt (Abbildung 32a):

- 1.) direkt strangabwärts des Transgens (p(A)-wPRE),
- 2.) direkt strangabwärts des wPRE (wPRE-p(A)).

Die Vektoren wurden für die Produktion von viralen NRTLTV-Partikeln verwendet. Die Fähigkeit, einen Knock-out zu induzieren, wurde auf CCR5⁺-293T-Zellen getestet (Abbildung 32b). Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz externer p(A)-Signale die Effizienz der NRTLTV-transportierten CCR5-TALEN steigern kann. Die Position war dabei entscheidender als die Quelle des p(A)-Signals. Sowohl für das SV40-p(A) als auch das BGH-p(A) wurden höhere Knock-out-Raten erzielt, wenn das jeweilige p(A)-Signal strangabwärts des wPRE positioniert wurde (SV40: vor wPRE = 24 ± 4 %; nach wPRE = 31 ± 5 %; BGH: vor wPRE = 24 ± 3 %; nach wPRE = 32 ± 4 %). Die Unterschiede zwischen den beiden getesteten p(A)-Signalen waren dabei im Knock-out-Versuch minimal. Um zu überprüfen, ob die eingefügten Signale auch einen Einfluss auf die Halbwertszeit der viralen RNA haben, wurde erneut ein Kinetik-Experiment durchgeführt. Hierfür wurden 293T-Zellen mit eGFP-Vektoren und den jeweiligen p(A)-Signalen strangabwärts des wPRE transduziert und die Expression des eGFP über 7 Tage bestimmt (Abbildung 32c). Interessanterweise wurde keine Verlängerung der Halbwertszeit beobachtet. Die bereits beobachtete Steigerung der Expression wurde bestätigt (vgl. Abbildung 32b).

Wie schon im ersten Teil der Arbeit erwähnt, können LVV durch Zentrifugation aufkonzentriert werden. Hierdurch kann bei Transduktionen die MOI erhöht werden, ohne inhibierende Effekte durch zu große Volumina von bereits „verbrauchtem“ Medium der Produzentenzellen zu erzeugen. Diese Methode wurden nun für die NRTLTV angewendet (Abbildung 32d). Es wurde eine deutliche Dosis-Wirkung-Abhängigkeit zwischen MOI (bzw. Anzahl eGFP-positiver Zellen) und TALEN-Effizienz festgestellt. Durch Zentrifugation der viralen Partikel kann eine MOI von bis zu 250 pro Vektor erreicht werden, die auf der verwendeten Reporterzelllinie wiederum bei $56 \pm 1,7$ % der Zellen einen CCR5-Knock-out induziert (vgl. auch Abbildung 32e).

Für die Bestätigung des konkreten Ergebnisses auf molekularer Ebene wurde ein Endonukleaseassay durchgeführt. Hierfür wurde die genomische DNA isoliert und der CCR5-Lokus mittels PCR amplifiziert (u8/u9). Die PCR-Fragmente (544 bp) wurden denaturiert und durch Verringerung der Temperatur die Aneinanderlagerung der DNA ermöglicht. In Abhängigkeit vom Anteil mutierter Fragmente entstehen dadurch sogenannte Heteroduplexe. Diese enthalten fehlerhafte Basenpaarungen (*mismatches*), die durch eine Endonuklease erkannt und geschnitten werden können. Es entstehen zwei zusätzliche Fragmente (380 und 164 bp), die auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden können (siehe Abbildung 32f). Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Im Gegensatz zu der Frequenz, die über die Expression des CCR5 im Durchflusszytometer ermittelt wurde, ist mit dem Endonukleaseassay ein deutlich geringerer Anteil an CCR5-Mutationen detektiert worden ($18,7 \pm 0,6$ % versus $56 \pm 1,7$ % (siehe Abbildung 32d-e)). Mögliche Gründe hierfür sind zum einen die Unterschätzung der Mutationsfrequenz durch Aneinanderlagerung von Homoduplexen und zum anderen epigenetische Faktoren, die zu einer Präferenz des externen gegenüber der internen CCR5-Lozi führen (siehe 4.2.2).

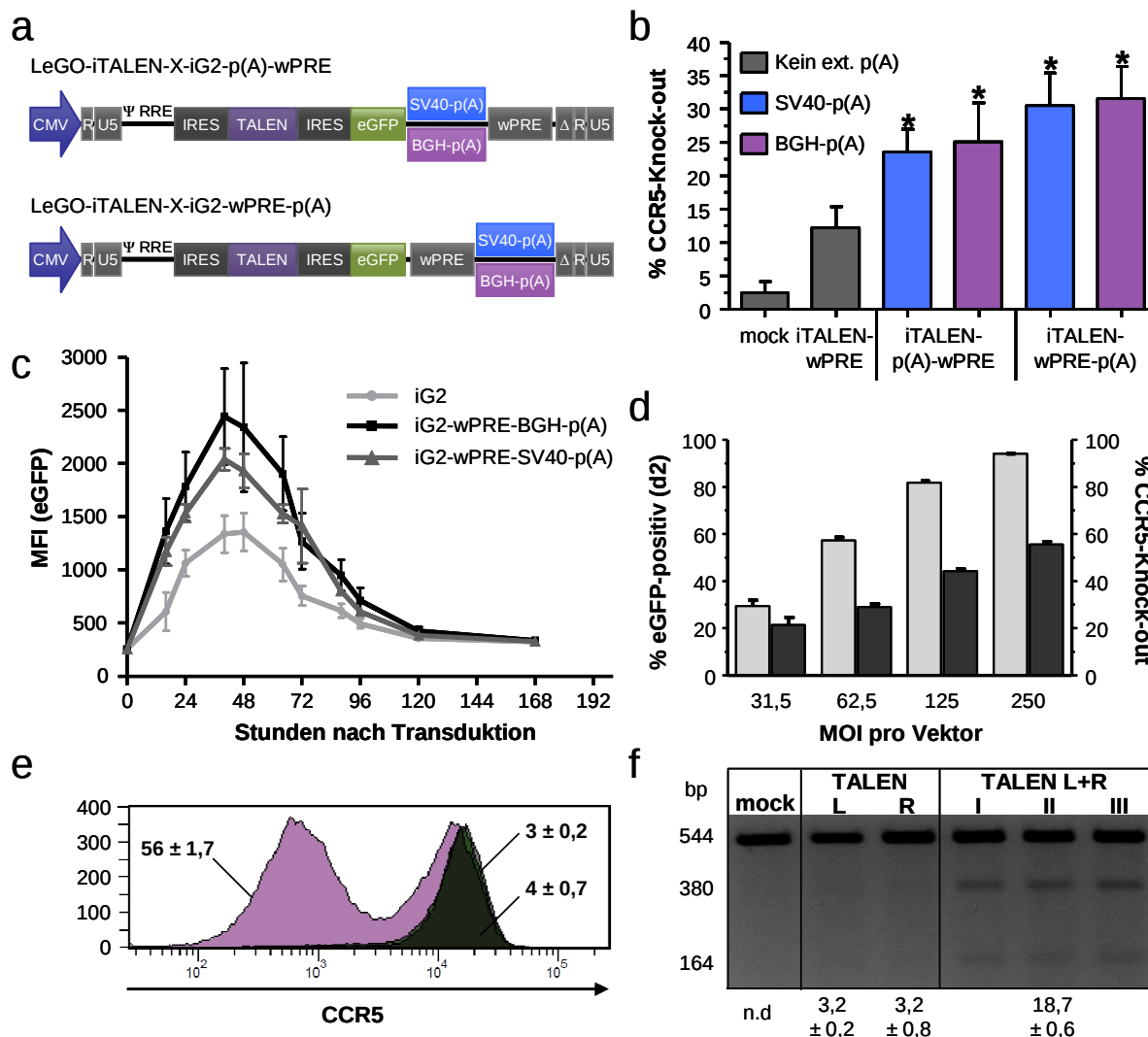


Abbildung 32 - Optimierung der NRTL-Effizienz durch Verwendung externer p(A)-Signale.

(a) Schematische Darstellung des Vektor-Designs (nicht maßstabsgetreu). Es wurden zwei unterschiedliche p(A)-Signale verwendet (BGH-p(A)/SV40-p(A)). (b) Der Effekt der beiden p(A)-Signale auf die Effizienz ist abhängig von der Position im Vektor. CCR5⁺-293T-Zellen wurden mit CCR5-spezifischen TALEN-NRTL transduziert und der Knock-out nach 5 Tagen bestimmt. Als Kontrolle dienten mock-transduzierte Zellen. iTALEN-wPRE enthält kein externes p(A)-Signal, iTALEN-p(A)-wPRE bzw. iTALEN-wPRE-p(A) repräsentieren die Konstrukte mit den p(A)-Signalen jeweils strangaufwärts bzw. strangabwärts des wPRE. Ergebnisse von 3 unabhängigen Virusproduktionen (in Duplikaten); **p*<0,001 gegenüber iTALEN-wPRE. (c) Kinetik bei Verwendung externer p(A)-Signale. Detektion der MFI des eGFP zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transduktion. Getestet wurden die p(A)-Signale strangabwärts des wPRE. iG2 (= LeGO-iG2) mit internem HIV-1 p(A)-Signal diente als Referenz; Mittelwert ± SEM (*n*=3). (d) Korrelation zwischen Transduktions- und Knock-out-Rate. CCR5⁺-293T-Zellen wurden mit ansteigenden MOIs der aufkonzentrierten iTALEN-wPRE-BGH-p(A) transduziert. Die Expression des eGFP (linke Achse, helle Balken) wurde an Tag 2, der Knock-out des CCR5 (rechte Achse, dunkle Balken) an Tag 5 nach Transduktion gemessen. (e) Darstellung des CCR5-Knock-outs nach Transduktion mit nur dem linken TALEN-Arm (grün) bzw. Kointroduktion beider Arme (violett). Untransduzierte Zellen dienten als Kontrolle (grau). Ein repräsentatives Ergebnis von dreien. (f) Endonukleaseassay zur Bestimmung der Mutationsrate des CCR5 auf genomischer Ebene. Verwendet wurden die Zellen aus (d/e). Als Kontrolle dienten mock- bzw. einzeln-transduzierte Zellen (TALEN L bzw. R). Die Mutationsfrequenz (Mittelwert ± SD) wurde densitometrisch bestimmt.

4. DISKUSSION

Lentivirale Vektoren (LVV) stellen sehr effiziente Werkzeuge für den stabilen Transport von Genen in der Forschung und potentiell auch in der Gentherapie dar. Durch ihre Eigenschaften als integrierende Vektoren kann eine dauerhafte und auf die Tochterzellen vererbte Expression der Transgene auch in sich teilenden Zellen erreicht werden. Gerade bei monogenen Erkrankungen des blutbildenden Systems, aber auch bei chronischen Erkrankungen wie z.B. der HIV-Infektion kann diese Eigenschaft von Vorteil sein.

Ein weiterer Vorteil (lenti-)viraler Vektoren besteht in ihrer Eigenschaft, ihr Genom effizient in die jeweilige Zielzelle einzubringen. Je nach Virus und Pseudotyp werden die Partikel von spezifischen Oberflächenproteinen der Zelle gebunden und können so aktiv in die Zelle eindringen. So werden Transgene auch in Zellen transportiert, die sich relativ resistent gegenüber chemischen oder physikalischen Transfektionsmethoden zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden LVV für den Transport therapeutischer Proteine entwickelt, bzw. entsprechend modifiziert. Am Beispiel von HIV-1 wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen an die lentivirale Gentherapie bearbeitet.

4.1. HIV-Gentherapie durch Expression therapeutischer Proteine in B-Zellen

HIV-Patienten müssen kontinuierlich mit den entsprechenden Therapeutika behandelt werden. Zwar ist HIV durch die kombinierte antiretrovirale Therapie zu einer chronischen Krankheit herabgestuft worden, doch sind mit der andauernden Einnahme der Medikamente Nachteile assoziiert. Hierzu gehören Toxizitäten bei Langzeiteinnahmen, Resistenzbildungen und eine sehr hohe finanzielle Belastung der einzelnen Patienten bzw. der Sozialversicherungssysteme. Peptidwirkstoffe wie der Eintrittsinhibitor Enfuvirtid können zudem nur intravenös verabreicht werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde daher versucht, über genetisch modifizierte Zellen eine Alternative zur regelmäßigen Applikation zu entwickeln. Diese Zellen könnten als eine Art körpereigene „Fabriken“ für die dauerhafte Produktion von HIV-Therapeutika dienen. Bei der Wahl der optimalen Zielzelle sollten folgende Punkte berücksichtigt werden: 1.) Die Gewinnung der Zellen aus dem Patienten sollte einfach und wenig belastend sein. Zudem sollte ein möglichst schonendes Protokoll zur Expansion und Modifikation existieren. 2.) Um eine dauerhafte Produktion des Therapeutikums zu gewährleisten, sollte die Zielzelle möglichst langlebig sein. 3.) Die lymphatischen Organe stellen einen wichtigen Replikationsort für HIV dar. Für eine hohe lokale Konzentration trotz eines geringen systemischen Levels sollte die Zielzelle daher idealerweise hämatopoetischen Ursprungs sein.

B-Lymphozyten stellen als langlebige und sekretionsaktive Zellen des hämatopoetischen Systems ein attraktives Ziel für diesen gentherapeutischen Ansatz dar. Im Folgenden werden die Ergebnisse zur stabilen Modifikation und Expression zusammengefasst und diskutiert.

4.1.1. Optimierung der lentiviralen B-Zell Transduktion

Primäre Zellen sind häufig besonders resistent gegenüber Transfektionsmethoden wie z.B. Lipofektion, Calciumphosphattransfektion oder auch Elektroporation. Hier können virale Vektoren Abhilfe schaffen, da sie über die natürlichen Infektionsmechanismen effizient in die Zelle eindringen können. Allerdings zeigten sich primäre B-Zellen in der Vergangenheit aber nicht nur resistent gegenüber Transfektionen, auch die Transduktion mit lentiviralen Vektoren war lange Zeit problematisch [308–310]. 2009 wurde erstmals gezeigt, dass über die Verwendung der verkürzten Hüllproteine H (Hämagglutinin) und F (Fusion) des Masern-Virus (MV) die lentivirale Transduktion von B-Zellen möglich ist [292, 311]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun ein weiterer Pseudotyp auf sein Potential zur B-Zell Transduktion untersucht. Das Hüllprotein des *Gibbon ape leukemia virus* (GALV) wurde bereits für die erfolgreiche Transduktion von T-Lymphozyten [312–314] und hämatopoetischen Vorläuferzellen [315] beschrieben. Zusätzlich wurden γ -retrovirale Vektoren mit diesem Pseudotyp bereits für klinische Studien verwendet [316].

Im Vergleich zu MV-pseudotypisierten LVV konnten in dieser Arbeit für GALV-pseudotypisierte LVV deutlich höhere Titer und Ausbeuten erreicht werden. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass sich die Morphologie der jeweiligen Produzentenzellen stark voneinander unterschied. Während bei der Produktion von GALV-LVV die Produzentenzellen ihre ursprüngliche Morphologie beibehielten, war bei MV-LVV deutlich die Entstehung von Synzytien zu erkennen. Dies impliziert, dass im Gegensatz zu GALV [317, 318] die Herstellung stabiler Produzentenzelllinien für MV-pseudotypisierte Vektoren nicht möglich ist. Die Produktionsbedingungen und Ausbeuten sind jedoch ein wichtiger Punkt im Hinblick auf therapeutische Anwendungen, da gerade für die klinische Applikation z.T. sehr große Virusmengen benötigt werden. Eine Alternative bieten chimäre Hüllproteine: Funke und Kollegen [292] konnten zeigen, dass durch die Fusion des Hämagglutinin-Proteins der Masern-Hüllproteine mit einem sogenannten Einzelketten-Antikörper die zellspezifische Transduktion möglich ist (z.B. α -CD20 für B-Zellen). Solche Partikel induzieren zwar die Synzytienbildung in einem geringeren Ausmaß, haben allerdings genauso wie MV-LVV im Vergleich zu GALV-LVV deutlich reduzierte Titer.

Als nächstes wurden die jeweiligen Pseudotypen für die Transduktion primärer B-Zellen verwendet. Es konnten sowohl für GALV- als auch für MV-LVV Transduktionsraten von über 50 % erreicht werden. Mit einer MOI von 1 war es bei MV-LVV sogar möglich über 80 % der Zellen zu transduzieren. Jedoch wurden bei dieser MOI deutliche Veränderungen von Proliferation und Morphologie der Zellen sichtbar (siehe unten).

Lentiviren können, wie beschrieben, im Gegensatz zu γ -Retroviren auch ruhende Zellen transduzieren, doch wurden für proliferierende Zellen höhere Effizienzen beobachtet [33]. Auch in dieser Arbeit war die Transduktionsrate bei ruhenden (nicht-aktivierten) Zellen für beide Pseudotypen deutlich reduziert. Eine mögliche Ursache kann die Größe der Kernporen sein, da im Gegensatz zu proliferierenden Zellen Kernporen ruhender Zellen einen geringeren Durchmesser aufweisen [319]. Dies könnte einen Einfluss auf die Importeffizienz des Präintegrationskomplexes haben. Auch eine Abhängigkeit des nukleären Imports von der Verfügbarkeit zellulärer Faktoren in den verschiedenen Zellzyklusphasen ist durchaus denkbar [320].

Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass GALV-pseudotypisierte Partikel generell in der Lage sind, primäre B-Zellen zu transduzieren, wurden die Transduktionsparameter optimiert. Neben der optimalen MOI, die sich im Bereich von 1 bis 5 befindet, wurde weiterhin untersucht, zu welchem Zeitpunkt nach Isolation und Stimulation sich die besten Ergebnisse erzielen lassen. Interessanterweise konnten für die ersten 6 Tage nach Isolation 50 % oder höhere Transduktionsraten erreicht werden. Erst an Tag 8 bzw. 13 wurden geringere Effizienzen beobachtet (35 % bzw. 22 %). Damit konnte der optimale Transduktionszeitpunkt primärer B-Zellen für die Tage 1-6 nach initialer Stimulation identifiziert werden. Die Expression des Reporterproteins eGFP blieb in der beobachteten Zeitspanne von über 10 Tagen weitestgehend stabil. Zudem kam es nicht zu einem Abfall des Anteils transduzierter Zellen. Zusammengefasst zeigt dies, dass die transduzierten Zellen im untersuchten Zeitraum keinen Wachstumsnachteil aufwiesen.

Ein weiterer entscheidender Punkt für die praktische Anwendung ist neben der relativen Transduktionsrate auch die absolute Ausbeute transduzierter Zellen. Gerade im Hinblick auf klinische Anwendungen ist die Zahl der isolierten Zellen meist begrenzt. Es ist daher essentiell, dass das verwendete Protokoll eine möglichst quantitative Aufarbeitung und auch Transduktion der Zellen erlaubt. Wie bereits für die Produzentenzellen beobachtet, neigen die Glykoproteine des Masern-Virus dazu, eine Verschmelzung der Zellen auszulösen. Dies konnte auch für primäre B-Zellen bei höheren MOIs gezeigt werden. Dazu passte auch die Beobachtung, dass auf Grund der Bildung dieser Synzytien für MV-pseudotypisierte LVV deutlich geringere Ausbeute erzielt werden konnten. Im direkten Vergleich wurde mit GALV-LVV eine bis zu 14 x höhere Anzahl transduzierter Zellen erreicht (Tag 2 - Abbildung 17a). Ein weiterer Faktor, der bei der Betrachtung der Ausbeuten eine Rolle spielt, ist die Verwendung von RetroNectin bei der Transduktion mit GALV-LVV. Wie von Yoshida *et al.* [321] und Garcia-Gila *et al.* [322] beschrieben, kann Fibronectin einen positiven Einfluss auf die Proliferation oder aber auch das Überleben von B-Zellen haben. RetroNectin, das rekombinante Fibronectin-Derivat CH-296 des Fibronectins, verfügt über die relevante VLA-4 bindende Domänen CS-1 [323]. In direkten Untersuchungen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nur ein geringer Einfluss des RetroNectins beobachtet werden (1,6-fach mehr Zellen bei Inkubation in Anwesenheit von RetroNectin). Es ist daher zu vermuten, dass die

deutlich höhere Ausbeute an B-Zellen bei Transduktionen mit GALV-LVV zwar durch ein Zusammenspiel beider Faktoren bedingt ist, jedoch die Bildung von Synzytien bei Verwendung der MV-Glykoproteine das offensichtlich stärkere Gewicht hat. Es ist durchaus denkbar, dass die Synzytien-Bildung ein Sicherheitsrisiko bei der klinischen Anwendung darstellen könnte. Die offensichtlich schonendere Transduktion über GALV-LVV in Kombination mit dem schützenden Effekt des RetroNectins ist daher eine attraktive Alternative für die lentiviralen Modifikation primärer B-Zellen.

4.1.2. Optimierung der Transgenexpression in primären B-Zellen

Zusätzlich zur Etablierung eines neuen Systems zur Transduktion primärer B-Zellen wurde eine Optimierung der Transgenexpression in diesen Zellen vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde ein humanes B-Zell-spezifisches *enhancer*-Element (hE μ MAR) verwendet, welches aus folgenden Komponenten besteht:

- 1.) E μ = *enhancer*. Dieses Element stammt aus dem schwere-Ketten Gen der humanen Immunglobuline. Es liegt strangabwärts der J-Region (*joining region*) und strangaufwärts der konstanten Domäne C μ und wird daher mit dem Suffix μ versehen [324]. Die B-Zell-spezifische Aktivierung assoziierter Gene erfolgt über zahlreichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z.B. PU.1 [325].
- 2.) MAR = *matrix associated region*. Diese AT-reichen Elemente flankieren E μ und fördern die Bindung der DNA an die nukleäre Matrix unter anderem durch Transkriptionsfaktoren wie Bright [326] (*B-cell regulator of immunoglobulin heavy chain transcription*). Es wurde beschrieben, dass durch die Assoziation des E μ MAR-Bereiches an die nukleäre Matrix, positionsabhängige Expressionsunterschiede ausgeglichen werden können [297].

Eine Wirksamkeit des Elements konnte bereits für den *cytomegalo virus immediate early promoter* (CMV) und den Promoter der *mouse phosphoglycerate kinase 1* (mPGK) gezeigt werden [297]. Allerdings ergab der direkte Vergleich des E μ MAR-mPGK mit dem SFFV-Promotor, dass letzterer bereits ohne *enhancer* deutlich höhere Expressionsraten vermittelte [327]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der humane E μ MAR erstmals mit dem SFFV-Promotor gekoppelt. Durch Insertion des hE μ MAR in den 5'-Bereich des SFFV-Promotors konnten höhere Expressionslevel erreicht werden. In der Tat konnte die neue Expressionskassette eine deutliche Steigerung der Transgenexpression in den meisten B-Zelllinien (bis zu 2,5-fach in EBV⁺ B-Zellen), aber vor allem in primären B-Zellen (bis zu 2,9 x) hervorrufen. Eine Reduktion des Titers durch das B-Zell-spezifische Element konnte nicht beobachtet werden.

Ein anderer Ansatz wurde von Luo und Kollegen [286] verfolgt. Sie verwendeten den B-Zell-spezifischen *enhancer* in Verbindung mit zwei B-Zell-spezifischen Promotoren (Ig κ leichte-Ketten Promotor und Ig μ schwere-Ketten Promotor) für die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen. Bei der Ausdifferenzierung der Zellen konnte so erreicht werden,

dass die Expression des Transgens nur in B-Zellen erfolgte. Dies ist bei der Sicherheitsbetrachtung im Rahmen der Modifikation von Stammzellen ein wichtiger Punkt, da gezeigt werden konnte, dass die Verwendung sogenannter physiologischer Promotoren ein deutlich geringeres Risiko der Transaktivierung und malignen Transformation birgt [328, 329]. Da in der vorliegenden Arbeit keine Stammzellen sondern bereits differenzierte B-Zellen direkt modifiziert wurden, war eine B-Zell-spezifische Expression nicht nötig. Im Gegenteil war es für den hier vorgeschlagenen Ansatz vorteilhafter, virale Promotoren wie den Promotor des SFFV zu wählen, da diese im Vergleich zu physiologischen Promotoren deutlich höhere Expressionsraten zulassen.

Die hier verwendeten MAR-Elemente können auch dann von Vorteil sein, wenn der Promotor, der mit diesen Elementen assoziiert ist, anfällig für sogenanntes *silencing*, d.h. Abschalten des Promotors in Folge epigenetischer CpG-Methylierungen, ist. Dieses wurde bereits für den hier verwendeten SFFV-Promotor beschrieben [330]. Es wäre sehr interessant, in einem zukünftigen Experiment die Methylierungsmuster des SFFV-Promotors in An- bzw. Abwesenheit der MAR-Elemente in B-Zellen und auch in nicht-B-Zellen zu vergleichen. Insgesamt konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass das neue Vektorkonstrukt sehr gut geeignet ist, um eine effizientere Transgenexpression in primären B-Zellen aber auch in B-Zelllinien zu erreichen.

Bei der Modifikation von Zellen durch z.B. lentivirale Transduktion ist es wichtig, dass der natürliche Phänotyp nicht verloren geht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob zum einen die Kultivierung auf RetroNectin und zum anderen die Transduktion mit GALV-pseudotypisierten hEμMAR-Vektoren eine Veränderung des Phänotyps zur Folge hatte. Hierfür wurden die Zellen nach dem etablierten Protokoll transduziert und die Verteilung der Subtypen im Durchflusszytometer bestimmt. Als Kontrolle dienten hierbei untransduzierte Zellen, die nicht auf RetroNectin kultiviert wurden. Es ist zu berücksichtigen, dass die Zellen vor der Transduktion durch die Ko-Kultivierung mit CD40L-exprimierenden Fibroblasten aktiviert (*Feeder*-Zellen) wurden. Im physiologischen Kontext wird die Interaktion von CD40 (auf B-Zellen) und CD40L (CD154; u.a. auf CD4⁺-T-Zellen) vor allem bei Aktivierung der B-Zellen und Einleitung des Immunglobulin-Klassenwechsels beobachtet. *In vitro* erfolgt eine Art Mimikri der B-Zell-T-Zell-Interaktion: Naïve B-Zellen proliferieren und differenzieren nach CD40L-Kontakt zu Keimzentrum B-Zellen und Gedächtnis B-Zellen, wohingegen Gedächtnis B-Zellen proliferieren und zu Immunglobulin-sezernierenden Zellen ausdifferenzieren können [331]. Gedächtnis B-Zellen müssen bei Reaktivierung, z.B. im Falle einer sekundären Immunantwort, sehr schnell expandieren können, um das bereits bekannte Pathogen effizient zu eliminieren. Daraus resultiert, dass bei Aktivierung durch CD40L *in vitro* Gedächtnis B-Zellen gegenüber naïven B-Zellen deutlich schneller die Zellteilung initiieren und dadurch ein höheres Proliferationspotential aufweisen [332]. Dies konnte auch in der

vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Machten im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Isolation naive B-Zellen noch über 60 % der B-Zellen aus, war bereits 24 Stunden nach Aktivierung eine Verschiebung in Richtung Gedächtnis B-Zellen zu erkennen. Am Tag 3 waren bereits über 70 % der Zellen Gedächtnis B-Zellen. Eine Veränderung der phänotypischen Verteilung im Vergleich zu stimulierten aber darüber hinaus unbehandelten Zellen konnte weder für die Kultivierung auf RetroNectin noch für die Transduktion mit GALV-LVV beobachtet werden. Es gibt daher keine Anzeichen für einen modulierenden Effekt des hier etablierten Protokolls.

Gerade in Hinsicht auf eine kontinuierliche Expression therapeutischer Proteine bei chronischen Erkrankungen ist es wichtig, langlebige Zellen zu verwenden. Zusätzlich ist bei der HIV-Gentherapie zu berücksichtigen, dass sekundäre lymphoide Organe (SLO) den primären Wirkungsort der Therapeutika darstellen [333]. Interessanterweise sind Gedächtnis B-Zellen nicht nur langlebig, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass in B-Zellen nach Aktivierung mit CD40L die Rezeptoren CXCR4/CCR7, CD62L und LFA-1 verstärkt exprimiert werden [334]. Über diese Rezeptoren, die sogenannte *homing triad*, werden B-Zellen durch Chemokine zu den sekundären Lymphorganen rekrutiert [335]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass CD40-aktivierte B-Zellen effizienter zu den SLO migrieren können als ruhende B-Zellen [336].

Schließlich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Mausmodell untersucht, ob die Prozedur der Transduktion einen Einfluss auf die kurzfristige Engraftment-Kapazität der Zellen ausübte. Da die Transplantation humaner Zellen in Wildtyp-Mäusen zur Abstoßung der transplantierten Zellen durch das murine Immunsystem führt, wurde für diesen Versuch das immundefiziente Mausmodell Rag2^{-/-} γc^{-/-} mit einem Balb/c-Hintergrund gewählt [337]. In diesem Modell werden durch den Doppel-Knock-out der Gene Rag2 (*recombination activating gene 2*, essentieller Bestandteil der V(D)J-Rekombination in T- und B-Zellen) und γc (*common gamma chain*, essentieller Bestandteil vieler Zytokin-Rezeptoren) keine reifen B-, T- oder NK-Zellen gebildet [338, 339]. Diese Zellen sind in immunkompetenten Organismen die Hauptverursacher von Abstoßungsreaktionen. Für die *in vivo*-Versuche wurden primäre humane B-Zellen nach dem etablierten Protokoll mit dem LeGO-hEμMAR-G2 transduziert und intravenös in Rag2^{-/-} γc^{-/-} transplantiert. Die Analyse erfolgte 2-7 Tage nach Transplantation. Aufgrund der systemischen Gabe konnten nur einige hundert primäre humane B-Zellen im Empfängerorganismus detektiert werden. Einhergehend mit den oben beschriebenen Eigenschaften CD40-aktivierter B-Zellen wurden die transplantierten Zellen vor allem in der Milz, einem bedeutenden SLO, detektiert. Interessanterweise blieb der relative Anteil GALV-transduzierter B-Zellen über den untersuchten Zeitraum stabil. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die transduzierten Zellen im Vergleich mit untransduzierten Zellen weder einen Engraftment- noch Überlebensnachteil aufwiesen.

In Zukunft wäre es sehr spannend zu untersuchen, wie sich die Transduktion auf das Langzeit-Engraftment auswirkt. Immundefiziente Mäuse verfügen meist über degenerierte

lymphoide Organe [337, 340], wodurch ein Anwachsen des Transplantats in diesem experimentellen *in vivo*-Kontext nur sehr schwer erreicht werden kann. Durch eine Ko-Transplantation mit T-Zellen könnten die B-Zellen nach der Transplantation mit humanen Zytokinen und mit weiteren Stimuli (z.B. CD40L) versorgt werden [341]. Problematisch bei der Transplantation von T-Zellen ist jedoch die sogenannte Spender-gegen-Wirt Erkrankung, bei der das Transplantat den Wirt als „fremd“ erkennt und angreift. Durch eine sogenannte „Humanisierung“ können Mausmodelle für Anwendungen dieser Art optimiert werden. Eine Möglichkeit besteht in einer sogenannten Xenotransplantation. Hierbei werden Teile einer humanen fetalen Leber oder eines Thymus transplantiert [342, 343], wodurch ein Modell geschaffen werden kann, welches zum einen physiologischere Bedingungen bietet (Entwicklung von Komponenten des Spender-Immunsystems in ansonsten immundefizienten Mäusen) und zum anderen die Aussagekraft der Versuchsergebnisse verbessert (humanes Spender-Gewebe und humane transduzierte B-Zellen). Dieses Modell kommt aufgrund der rechtlichen Lage in Deutschland sowie ethischer Bedenken allerdings nicht in Frage. Die zweite Möglichkeit besteht in der Transplantation humaner hämatopoetischer Stammzellen (HSCs). Werden HSCs in adulte Mäuse transplantiert, erfolgt zwar eine Rekonstitution der Tiere mit humanen hämatopoetischen Zellen - eine Etablierung lymphoider Organe ist aber dennoch nicht mehr möglich. Werden HSCs hingegen intrahepatisch bereits in neugeborene Tiere transplantiert, kann eine verbesserte Zellularität von Milz, Lymphknoten und Thymus erreicht werden [337]. Für dieses Modell wurde sogar eine Ausreifung humaner B-Zellen zu Plasma- und Gedächtnis B-Zellen beschrieben. Dieses Modell scheint daher für eine mögliche Untersuchung der Langzeit-Etablierung transduzierter B-Zellen geeignet zu sein.

4.1.3. Anwendung auf die Expression des HIV-Eintrittsinhibitors

Mithilfe des optimierten Transduktionsprotokolls wurde nun untersucht, ob es möglich ist, einen HIV-Eintrittsinhibitor über modifizierte B-Zellen effizient zu sezernieren. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Laer (Innsbruck) wurde der Eintrittsinhibitor sC46 (siehe 1.2.3) [145] für diese Anwendung gewählt und getestet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das bereits für die Sekretion angepasste Peptid sC46 in lentivirale Vektoren eingesetzt und die Langzeitexpression in Zelllinien untersucht. *In vitro* konnte für die Zelllinien 293T und K562 eine Sekretion von sC46 über einen Zeitraum von mehr als 10 Wochen beobachtet werden. Jedoch war eine Sekretion des sC46 durch EBV-immortalisierte B-Zellen trotz andauernder hoher intrazellulärer Expression nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis wurde in den primären B-Zellen bestätigt. Unter optimalen Bedingungen konnten maximal $5,4 \pm 1,5$ nM sC46 in B-Zell-Überständen detektiert werden. Das ist ca. 60 x weniger als für 293T-Zellen beobachtet wurde. Zuvor wurde für primäre CD4⁺-T-Zellen *in vitro* eine halbmaximale inhibitorische Konzentration von 25-90 nM gemessen – eine komplette Unterdrückung der HIV-1 Replikation wurde erst bei ~ 850 nM erreicht [145].

Zusammengefasst ist es daher unwahrscheinlich, dass das sC46-Level, welches durch die Sekretion von B-Zellen erreicht wurde, einen relevanten therapeutischen Effekt vermitteln kann. Vergleichbar geringe sC46-Level wurden auch nach Transduktion von CD4⁺-T-Zellen und mesenchymalen Stamm-/Stromazellen (MSC) erreicht (Dr. Stefan Horn (Hamburg), unveröffentlichte Daten; Egerer *et al.* [145]). Auch hier war trotz hoher Transduktionsraten und intrazellulärer Expression eine Sekretion nicht erfolgreich.

Dies deutet stark darauf hin, dass eine Optimierung des Peptids nötig ist, bevor eine Aussage über das Sekretionspotential transduzierter primärer B-Zellen getroffen werden kann. Hierfür muss aber zunächst geklärt werden, wo und warum das sC46 innerhalb der Zelle zurückgehalten wird. Lokalisationsstudien könnten zeigen, ob z.B. bereits der Transport ins ER nur unzureichend funktioniert oder ob das sC46 im Golgi-Apparat zurückgehalten wird. Ist Ersteres der Fall, könnte z.B. ein Wechsel des Signalpeptids eine Verbesserung des Eintritts in den Sekretionsweg bringen. Im sC46-Konstrukt wurde das tPA-Signalpeptid gewählt - bei Verwendung eines B-Zell-spezifischen Signalpeptids, wie z.B. von der leichten κ -Kette der Immunglobuline, wäre es denkbar, dass in B-Zellen die Sekretion verstärkt werden könnte. Diese Annahme konnte allerdings in vorläufigen Versuchen nicht bestätigt werden (nicht gezeigt); weitergehende Experimente sind notwendig, um eine endgültige Aussage zu treffen. Wird das hydrophobe sC46 Peptid allerdings im Golgi-Apparat zurückgehalten, könnte z.B. die Kopplung des C46 an Immunglobulindomänen (sogenannte Immunadhäsine [344]) die Sekretion verbessern. Wie bereits von Egerer *et al.* beschrieben, kann die Fusion des C46 an Proteine und Peptide Einfluss auf die antivirale Aktivität des C46 haben. In Analogie zum sC46-Konstrukt könnte in so einem Fall aber eine Proteaseschnittstelle Abhilfe schaffen [145].

Neben der Optimierung des sC46-Peptids im Hinblick auf das Sekretionspotential sollte auch die B-Zelle als mögliches Vehikel für die *in vivo*-Produktion weiterer therapeutischer Proteine charakterisiert werden. Es wäre sehr interessant zu untersuchen, ob sich die transduzierten B-Zellen eignen, um z.B. therapeutische Antikörper zu produzieren. Viele HIV-Patienten verfügen zwar über HIV-spezifische Antikörper, eine effiziente Neutralisierung wird allerdings selten erreicht. Verschiedene Gründe tragen dazu bei [345]:

- 1.) Die HIV-Glykoproteine gp120 und gp41 sind hochvariabel und besitzen eine hohe Konformationsflexibilität.
- 2.) Konservierte Regionen sind meist nicht exponiert und somit für Antikörper nicht zugänglich.
- 3.) Glykosylierungen schirmen immunogene Bereiche ab.

Dennoch konnte eine Reihe wirksamer neutralisierender Antikörper isoliert werden. Eine kombinierte Gabe dieser Antikörper wurde auch bereits erfolgreich im Primatenmodell getestet [346]. Bei der Transplantation antikörperproduzierender B-Zellen könnte theoretisch auf eine wiederholte Infusion der Antikörper verzichtet werden.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit durch die Etablierung der Transduktion primärer B-Zellen mit GALV-pseudotypisierten Lentiviren ein effizientes und schonendes Protokoll entwickelt werden, was es erlaubt, hohe Ausbeuten an transduzierten Zellen zu erzielen. Gerade hohe Ausbeuten und möglichst geringfügige Änderungen im Phänotyp sind ausschlaggebende Kriterien im Hinblick auf klinische Anwendungen. Zusätzlich war es möglich, durch die Kombination eines B-Zell-spezifischen *enhancer*-Elementes mit dem SFFV-Promotor die Transgenexpression in primären B-Zellen deutlich zu steigern. Weitere Untersuchungen im Hinblick auf Langzeitexpression und -engraftment stellen wichtige weiterführende Versuche dar. Eine Aussage über das Sekretionspotential der transduzierten B-Zellen konnte vorerst nicht getroffen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass weitere Optimierungen des sC46 nötig sind, um eine effizientere Sekretion in Primärzellen zu erreichen.

4.2. HIV-Gentherapie durch Knock-out essentieller Gene

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein alternativer Ansatz der HIV-Gentherapie verfolgt. Im Gegensatz zum ersten Teil der Arbeit war es nicht das Ziel, ein therapeutisches Gen möglichst stabil zu exprimieren. Vielmehr sollte hier über eine kurzfristige Expression ein internes Gen spezifisch ausgeschaltet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür der Korezeptor CCR5 gewählt, dessen Knock-out im Idealfall eine Resistenz gegenüber HIV-1 zur Folge hat [165]. Wie bereits beschrieben, können über Designer-Nukleasen zielgerichtete Knock-outs induziert werden. Da für TALEN im Vergleich zu ZFN eine geringere Zytotoxizität beschrieben ist [231], wurde in der vorliegenden Arbeit mit CCR5-spezifischen TALEN gearbeitet.

Neben Spezifität und Herstellung der Designer-Nukleasen nimmt ihr Transport in die Zielzellen eine Schlüsselstellung im Hinblick auf die praktische Nutzbarkeit an. Durch die hohe Anzahl repetitiver Domänen und die Notwendigkeit, zwei Protein-Ketten in dieselbe Zelle einzubringen (rechter + linker TALEN-Arm), ist der Transport von TALEN allerdings z.T. problematisch [232]. Wie bereits erwähnt, stellen lentivirale Vektoren attraktive Transport-Vehikel für Transgene in Säugerzellen dar. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob eine lentivirale Transduktion mit TALEN-kodierenden Vektoren möglich ist.

4.2.1. Problematik der lentiviralen Transduktion mit TALEN

Da für ZFN bereits beschrieben wurde, dass mittels lentiviralen Vektoren eine hohe Knock-out-Effizienz erreicht werden kann (vgl. Abbildung 25b) [281], wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch TALE-Nukleasen über lentivirale Systeme in die jeweiligen Zielzellen eingebracht werden können. Als Beispiel wurden CCR5-spezifische Designer-Nukleasen verwendet (CCR5-ZFN [300, 301] und CCR5-TALEN [231]). Im Gegensatz zu

dem im ersten Teil dieser Arbeit verfolgten Ansatz wäre eine stabile Expression der Designer-Nukleasen kontraproduktiv (siehe 1.3.2). Entsprechend wurde für die TALE-Nukleasen vorerst ein lentivirales System verwendet, welches durch eine inaktivierte Integrase nur eine transiente Expression erlaubt (NILV) [279].

Allerdings war bei Verwendung nicht-integrierender TALEN-LVV im Vergleich zu ZFN-LVV kein Anzeichen für einen erfolgreichen Knock-out des CCR5-Lokus detektierbar. Um auszuschließen, dass die fehlende Funktionalität auf Fehlern in den Expressionskonstrukten basierte, wurden die TALEN-Vektoren mit Reportergenen ausgestattet. Eine Transfektion der neuen Konstrukte zeigte nicht nur eine Expression der entsprechenden Reporterproteine sondern auch einen effizienten Knock-out des CCR5. Diese Daten belegen die Korrektheit der hier hergestellten TALEN-Vektoren. Interessanterweise konnte aber bei der lentiviralen Transduktion mit den TALEN-Konstrukten trotz erfolgreicher Markierung mit den Reporterproteinen erneut kein Verlust der CCR5-Expression auf den Zielzellen erreicht werden. Dies weist darauf hin, dass ausschließlich die Funktionalität der TALEN bei der lentiviralen Transduktion gestört ist. Untersuchungen der proviralen DNA integrierender TALEN-LVV ergaben schließlich eine hohe Variabilität an Deletionen und Verschiebungen innerhalb der TALEN-kodierenden Sequenzen. In keiner der 40 analysierten proviralen Sequenzen konnte ein Volllängen-Konstrukt detektiert werden. Interessanterweise blieb in 39/40 Sequenzen der offene Leserahmen aber erhalten. Auf Basis dieser und anderer Ergebnisse lässt sich der Schluss ziehen, dass es sich bei dem zugrunde liegenden Mechanismus um die sogenannte *template switch mediated recombination* handelte [347, 348]. Über diesen Mechanismus können Lentiviren [349] und andere Viren der Gattung der *Retroviridae* [350–353] beide RNA-Genome als Vorlage für die Synthese der DNA während der reversen Transkription verwenden (Abbildung 33a). Die Voraussetzung für die Bindung an das Schwester-Genom scheint eine Hybridisierung der bereits hergestellten DNA mit der RNA zu sein [102, 354, 355]. Bei repetitiven Elementen kann demnach nicht unterschieden werden, an welcher Stelle die reverse Transkription ursprünglich fortgeführt werden sollte und es kommt zu Deletionen, Vertauschungen oder Additionen (Abbildung 33b).

Nach dem derzeitigen Wissensstand erfolgt statistisch gesehen etwa alle 2 kb (oder auch häufiger) ein Strangwechsel [102, 354, 356, 357]. Die Länge eines TALEN-Monomers beträgt 102 bp. Bei den hier untersuchten 18er TALEN entspricht dies einer Länge von 1836 bp. Es wäre daher zu erwarten, dass die Mehrzahl der untersuchten Klone eine Rekombinationsfrequenz von 1 in der Monomer-Region aufweist. Tatsächlich wiesen aber 14 von 20 Klonen eine Rekombinationsfrequenz von 2 und nur 7 eine Frequenz von 1 auf. Berücksichtigt wurden in diesem Fall nur eindeutig zuzuordnende Klone aus der Einzelzellablage, da bei der Generierung der Klone aus einer Massenkultur wahrscheinlich eine Verzerrung durch die Bevorzugung kleinerer Klone erfolgen würde. Ein Erklärungsansatz für die Abweichung von der erwarteten Frequenz ist eine mögliche Unterschätzung der Anzahl der Strangwechsel bei viraler genomischer DNA durch fehlende „Fußspuren“. Meines Wissens ist dies

die erste Studie, in der die Rekombination bei einer so hohen Anzahl hochkonservierter repetitiver Elemente in diesem Umfang untersucht wurde.

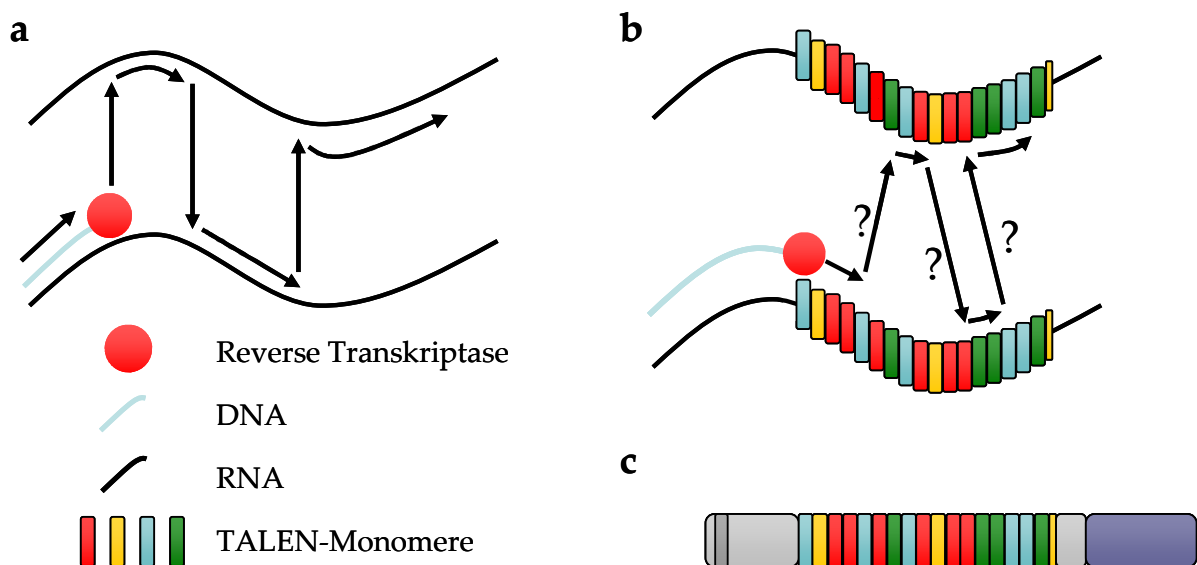


Abbildung 33 - Schematische Darstellung des Mechanismus der *template switch mediated recombination*. (a) Definierter Strangwechsel im Fall nicht-repetitiver Elemente. (b) Variabilität des Strangwechsels im Falle repetitiver Sequenzen. (c) Schematische Darstellung der repetitiven Elemente in einem TALEN-Arm. Jedes der TALEN-Monomere besteht aus einer hochkonservierten Folge von 34 Aminosäuren. Durch die Sequenzhomologien kann beim Strangwechsel während der reversen Transkription eine Hybridisierung an jedem beliebigen Monomer erfolgen. Dieses führt zu den beschriebenen Rekombinationen.

Zusammenfassend deuten diese Daten in Übereinstimmung mit einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Holkers *et al.* [358] darauf hin, dass über lentivirale Systeme, die auf revers transkribierter DNA basieren, keine Expression von Vollängen-TALEN möglich ist. Zugleich setzt der hier postulierte Mechanismus voraus, dass die TALEN-kodierende RNA noch intakt ist. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die verpackte, virale RNA in den lentiviralen Partikeln noch über die volle erwartete Länge verfügte.

4.2.2. Entwicklung und Anwendung der NRTL

Wie bereits erwähnt, wurden für eine transiente Expression nach lentiviraler Transduktion bislang nicht-integrierende lentivirale Vektoren verwendet. Für eine transiente Expression ist das Umschreiben von RNA in DNA jedoch nicht zwingend notwendig. Da die virale RNA der Lentiviren auch direkt als mRNA verwendet werden kann, wurde im Folgenden untersucht, ob verpackte TALEN-mRNA auch direkt translatiert werden kann. Hierbei musste berücksichtigt werden, dass die RNA im Laufe der reversen Transkription abgebaut wird. Dieser Abbau erfolgt durch die RNaseH-Untereinheit der reversen Transkriptase nach

Erkennung des entstandenen RNA/DNA-Hybrids [302]. Um zum einen die RNA für die Translation zu erhalten und zum anderen die Entstehung nicht-translatierbarer RNA/DNA-Hybride zu vermeiden, wurde daher die reverse Transkriptase in der vorliegenden Arbeit genetisch inaktiviert. Das neue lentivirale Vektorsystem, welches auf dem reinen Transport von RNA als kodierende Nukleinsäure basiert, wurde durch gezielte Mutationen des aktiven Zentrums der DNA-Polymerase-Untereinheit [359] der reversen Transkriptase hergestellt (D185V; D186V). Da die RNaseH nur RNA/DNA-Hybride schneidet [302], war anzunehmen, dass eine separate Inaktivierung der RNaseH in diesem Kontext nicht notwendig ist. Lentivirale Vektoren, die mit der neuartigen inaktiven reversen Transkriptase produziert wurden, wurden in Analogie zu integrierenden (ILV) und nicht-integrierenden Vektoren (NILV), nicht-revers transkribierende lentivirale Vektoren (NRTLTV) genannt. Eine schematische Darstellung der Funktionsweise eines NRTLTV findet sich in Abbildung 34.

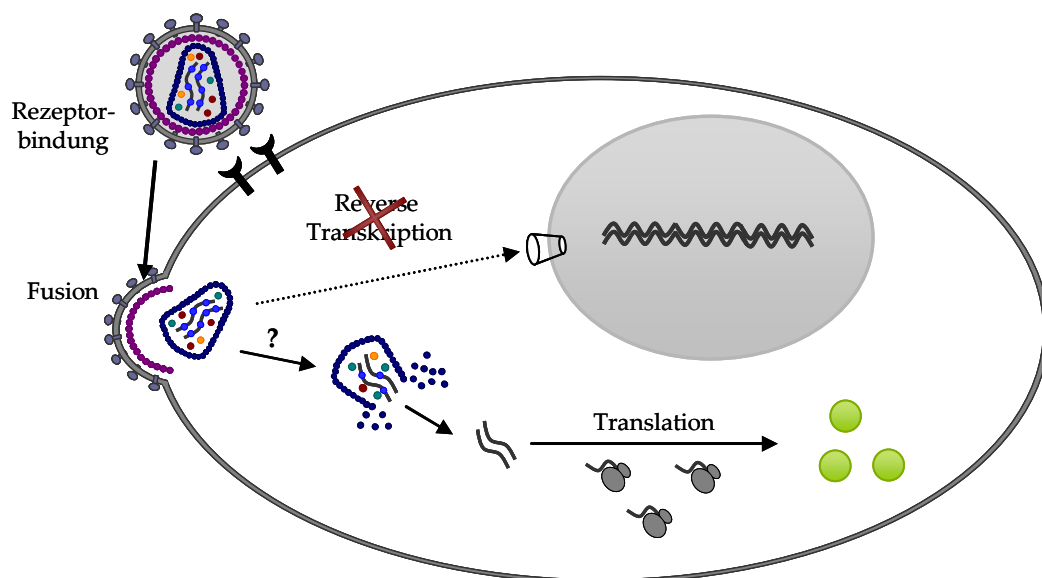


Abbildung 34 - Funktionsweise nicht-revers transkribierender lentiviraler Vektoren. Nach Rezeptorbindung und Fusion mit der Zielzelle erfolgt die Freisetzung des Kapsids ins Zytoplasma. Durch die Blockade der reversen Transkription wird die virale RNA nicht über die RNaseH abgebaut, sondern kann als einzelsträngige (m)RNA direkt für die Translation der Transgene verwendet werden. Der genaue Mechanismus der Auflösung des Kapsids und Freisetzung der RNA ist nicht bekannt und daher mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Es ist beschrieben, dass die Auflösung des Kapsids erst bei vollständiger Bildung der proviralen DNA an der Kernpore erfolgt (siehe 1.1.2) [24–26]. Bei NRTLTV wird jedoch keine DNA synthetisiert, die Bildung des Präintegrationskomplexes findet demnach nicht statt. Angesichts der hier erhobenen Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich, dass die Auflösung des Kapsids in dem hier vorgestellten System auch ohne reverse Transkription im Zytoplasma stattfinden kann. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, es wäre aber interessant zu bestimmen, ob das *uncoating* bei NRTLTV ein aktiver Prozess ist oder die virale RNA über den Zerfall des Kapsids aufgrund einer Destabilisierung über die Zeit erfolgt.

Bei direkter Translation der viralen Vektor-RNA muss berücksichtigt werden, dass bisherige Vektor-RNAs über eine relativ lange 5'-untranslatierte Region (5'UTR) mit einer Vielzahl an putativen Start- und Stopcodons verfügen. Wie erwartet, war demnach die Expression durch den *cap*-abhängigen Vektor LeGO-G2 relativ schwach (vgl. Abbildung 29b). Alternativ zur *cap*-abhängigen Translationsinitiation kann durch Verwendung einer sogenannten internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) eine *cap*-unabhängige Translation initiiert werden [252, 360]. Tatsächlich resultierte die IRES strangaufwärts des Transgens in einer ca. 5 x höheren Expression im NRTLTV-System. Aus diesem Grund wurde im Folgenden bei nicht-revers transkribierenden lentiviralen Vektoren vor den jeweiligen Transgenen eine IRES eingefügt. Die Halbwertszeit von mRNA in einer Zelle ist aufgrund der Notwendigkeit einer flexiblen Anpassung des Expressionsmusters auf äußere und innere Einflüsse stark reguliert und dadurch limitiert. Ein System, welches auf dem Transport von RNA basiert, ist daher transienter Natur. Um dieses zu überprüfen, wurde in einem Kinetik-Experiment gemessen, wie sich die Expression eines Reporterproteins nach Transduktion durch einen NRTLTV in Abhängigkeit von der Zeit verhält. Die Expressionskurve zeigte ein Maximum bei 36-48 h nach Transduktion und den vollständigen Abfall auf das Hintergrundniveau nach ab Tag 5. Zusammen mit den Daten für die *cap*-unabhängige Translationsinitiation konnte so nachgewiesen werden, dass es sich hier nicht um einen reinen Proteintransport [303, 304] sondern um eine aktive Expression der Transgene handelt.

Natürlich ist im Vergleich mit integrierenden und nicht-integrierenden Vektoren das Expressionsniveau der nicht-revers transkribierenden Vektoren deutlich geringer. Bei den zuerst genannten Systemen erfolgt nach der reversen Transkription über die aktive Transkription in der Zielzelle eine Amplifikation der RNA-Moleküle. Dieses ist im NRTLTV-System nicht der Fall. Hier kann tatsächlich nur die Menge der transportierten RNA-Moleküle für die Translation verwendet werden. Um auf anderem Wege eine Verstärkung des Signals zu erreichen, wurde getestet, welchen Einfluss hypothermische Kulturbedingungen auf die Expression haben. Hierbei war nicht von vorn herein klar, ob ein positiver Effekt zu erwarten ist. Ergebnisse vorangegangener Studien waren nicht eindeutig, da sowohl eine Verringerung [361, 362], ein Gleichbleiben [363] als auch eine Steigerung der Expression [305–307] des jeweiligen Transgens beschrieben wurde. Andere Gruppen stellten zudem eine Zelltyp-Abhängigkeit fest [364, 365].

Für den hier vorgestellten Hypothermie-Versuch wurden die transduzierten Zellen statt bei 37 °C, bei 32 °C bzw. 30 °C inkubiert und die Expressionshöhe des Reporterproteins nach 48 h gemessen. Interessanterweise war eine deutliche Steigerung der Expression bei Hypothermie zu erkennen. Zwar war bei 30 °C die Expression geringfügig höher als bei 32 °C, allerdings war die Fitness der Zellen bei der geringeren Temperatur beeinträchtigt (vgl. auch [305]). Die verbesserte Expression kann folgende Gründe haben: Zum einen kann durch den Zellzyklus-Arrest bei hypothermischen Bedingungen eine Akkumulation der viralen RNA/des Proteins stattfinden [366]. Zum anderen ist es aber auch denkbar, dass die

Stabilität der RNA/des Proteins unter hypothermischen Bedingungen direkt erhöht wird. Es wäre sehr interessant in weiteren Studien zu untersuchen, welcher Faktor im NRTLTV-System eine größere Rolle spielt. Messungen der RNA-Mengen sowie Bestimmungen der RNA- oder Protein-Halbwertszeit könnten hier zu einem Erkenntnisgewinn beitragen.

Nach Steigerung der Expression durch Optimierung der Translationsinitiation sowie der Kulturbedingungen wurde untersucht, ob dieses System nun tatsächlich für den Transport der TALE-Nukleasen geeignet ist. In der Tat konnte hier erstmals gezeigt werden, dass ein Gen-Knock-out nach lentiviralem Transport von TALE-Nukleasen prinzipiell, wenn auch mit geringer Effizienz möglich ist. Um die Effizienz des NRTLTV-Systems zu verbessern, wurde im Folgenden untersucht, welchen Einfluss mRNA-stabilisierende Elemente auf die Knock-out-Effizienz haben. Wie bereits erwähnt, wurde bei den in dieser Arbeit verwendeten SIN-Vektoren ein Teil der U3-Region deletiert [245]. Dies kann zu einer unzureichenden Polyadenylierung und somit auch zu einer Reduktion der Genexpression führen (1.3.1) [258, 259]. In lentiviralen Systemen war es bislang nicht möglich, die Genexpression über die Verwendung stärkerer p(A)-Signale zu verstärken, da es infolge der Verkürzung des viralen Genoms durch frühzeitige Terminierung vor dem 3'LTR zu einer erheblichen Reduktion des funktionellen Titers kommt [367, 368]. Bei NRTLTV hingegen wird die virale genomische RNA direkt translatiert. Somit kann auf den 3'LTR, der vor allem für die reverse Transkription und Integration essentiell ist, in diesem Kontext verzichtet werden.

In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Einführung externer p(A)-Signale eine deutliche Steigerung der Expression über NRTLTV erreicht werden. Bedingt durch die verstärkte Expression konnte auch ein Anstieg des CCR5-Knock-out durch die Verwendung der p(A)-Signale in TALEN-kodierenden NRTLTV detektiert werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den hier verwendeten Signalen BGH-p(A) (als Beispiel für ein zelluläres p(A)-Signal) und (SV40-p(A) als ein starkes virales p(A)-Signal) wurde nicht festgestellt. Hingegen scheint die Position des regulatorischen Elementes wPRE von Bedeutung zu sein. Bei einer Transkriptionsterminierung strangaufwärts des wPRE (iTALEN-p(A)-wPRE) konnten niedrigere Effizienzen beobachtet werden. Dies geht einher mit der bereits beschriebenen Steigerung der Transgenexpression und Polyadenylierung durch dieses Element (1.3.1; [263, 264]). Interessanterweise wurde durch die externen p(A)-Signale keine Verlängerung der Halbwertszeit beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Art und Lage der p(A)-Signale zwar einen Einfluss auf die Effizienz der Polyadenylierung hat, nicht jedoch auf die Stabilität der RNA in Folge der Polyadenylierung. Weitergehende Experimente im Hinblick auf den Einfluss der frühzeitigen Transkriptionsterminierung auf die Expression der viralen RNA bereits in den Produzentenzellen sind in der Arbeitsgruppe bereits geplant.

Durch eine Aufkonzentrierung der NRTLTV war es in weiteren Versuchen möglich, die Knock-out-Rate noch weiter zu steigern. Maximal konnte so bei fast 60 % der behandelten Zellen ein CCR5-Expressionsverlust detektiert werden. Eine Analyse auf molekularer Ebene

per Endonukleaseassay ergab jedoch eine deutlich geringere Mutationsrate. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen kann durch das Aneinanderlagern der passenden Fragmente die eigentliche Mutationsfrequenz im Endonukleaseassay unterschätzt werden. Zum anderen werden bei diesem Assay nicht nur der ektope CCR5-Lokus sondern auch die beiden internen CCR5-Lozi amplifiziert. Da diese Lozi allerdings in der Reporterzelllinie nicht transkribiert werden, ist es wahrscheinlich, dass sie durch epigenetische Modifikationen wie DNA-Methylierung [369] und Histonmodifikationen [370] stillgelegt sind (*silencing*). Es lässt sich daher vermuten, dass in diesem Experiment der externe CCR5-Lokus bevorzugt von den TALEN gebunden und geschnitten wird.

Zusammenfassend konnte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit ein neues lentivirales System für den transienten Gentransfer entwickelt werden. Mit der Herstellung einer enzymatisch inaktiven reversen Transkriptase und deren Verpackung in lentivirale Partikel gelang es, einen reinen Transport von mRNA zu gewährleisten. Dies ist gerade dann von Vorteil, wenn durch das Vorkommen repetitiver Elemente wie z.B. bei TALEN die Integrität des viralen Genoms nicht sichergestellt ist. Am Beispiel der TALEN wurde gezeigt, dass verschiedene Anpassungen des Systems zur Steigerung der Effizienz nötig sind. Neben der Optimierung der Translationsinitiation durch interne ribosomale Eintrittsstellen und Anpassungen der Kulturbedingungen resultierte auch die Verwendung externer Polyadenylierungssignale in einer signifikanten Steigerung der Transgenexpression. In einem Reportersystem war es möglich, den HIV-Korezeptor CCR5 sehr effizient auszuschalten. Wie bereits in einigen präklinischen Studien [301, 371] und auch im Fall des „Berlin-Patienten“ (siehe 1.2.4) [165, 166] gezeigt wurde, kann durch die Deletion des CCR5-Rezeptors eine HIV-Resistenz erreicht werden.

5. AUSBLICK

Die HIV-Therapie stellt noch immer eine große Herausforderung für die medizinische Forschung dar. Trotz erheblicher Verbesserungen der Lebenserwartung und -qualität von HIV-Patienten durch die kombinierte antiretrovirale Therapie konnte durch diese Therapieform bislang keine Heilung erreicht werden. Eine Heilung von HIV ist nur möglich, wenn alle HIV-Reservoirs eliminiert werden und/oder die Ausbreitung der Viren dauerhaft verhindert werden kann. Durch eine HIV-Gentherapie kann dieses theoretisch erreicht werden. In dieser Arbeit wurde an zwei möglichen Ansätzen gearbeitet: 1.) der Überexpression therapeutischer Gene durch B-Zellen und 2.) dem Ausschalten endogener, HIV-relevanter Gene durch die kurzfristige Expression von Designer-Nukleasen.

Für den ersten Ansatz konnte erfolgreich ein neues Transduktionsprotokoll entwickelt und die Transgenexpression in primären B-Zellen optimiert werden [372]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Sekretion des Eintrittsinhibitors sC46 in therapeutisch relevanten Mengen in primären Zellen nur sehr eingeschränkt möglich war. Im zweiten Teil wurde ein neues System zur transienten Expression von sequenzspezifischen Designer-Nukleasen entwickelt. Es wurde in einem Reporterzellsystem charakterisiert und optimiert. Der nächste Schritt ist nun die Anwendung des Systems in primären Zellen. Es wäre durchaus sinnvoll, beide Gentherapieansätze miteinander zu verbinden. Beim Knock-out des CCR5-Rezeptors könnten z.B. über homologe Rekombination Eintrittsinhibitoren oder Restriktionsfaktoren in den Locus integriert werden [373]. Dieses hätte den Vorteil, dass nicht nur modifizierte sondern auch nicht-modifizierte Zellen geschützt wären (*bystander effect*) [145]. Da die Ansätze auch an unterschiedlichen Stellen des HIV-Eintritts greifen, reduzierte sich dadurch auch die Gefahr von Kreuzresistenzbildungen. Zusätzlich wäre über die gerichtete Integration therapeutischer Gene das Risiko der Insertionsmutagenese, die einen wichtigen Sicherheitsaspekt in der Gentherapie darstellt, minimiert [374].

Natürlich sind die in dieser Arbeit hergestellten Vektoren nicht auf die HIV-Gentherapie beschränkt. Das hier etablierte Protokoll zur schonenden Transduktion primärer B-Zellen könnte z.B. in immunologischen Studien, bei der Weiterentwicklung der Toleranzinduktion in Autoimmunerkrankungen [375, 376], sowie bei der Generierung von spezifischen Antigen-präsentierenden B-Zellen für die adaptive Immuntherapie [377–379] Anwendung finden. Des Weiteren ist denkbar, dass nicht-revers transkribierenden Lentiviren für die transiente Expression toxischer Proteine [380–382] oder von Rekombinasen [383, 384] genutzt werden können. Dadurch, dass über die hier entwickelten NRTLTV nur mRNA transportiert wird und kein Umschreiben in DNA erfolgt, ist außerdem die Gefahr der spontanen Integration minimiert. Dies ist bei der Sicherheitsbetrachtung ein großer Vorteil gegenüber nicht-integrierenden lentiviralen Vektoren [279, 280, 282] bzw. auch adenoviralen [284] sowie adeno-assoziierten Vektoren [283].

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Buchstabencode für Aminosäuren:

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

°C	Grad Celsius
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrom</i>)
alpha (α)	anti-
APC	Allophycocyanin
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G</i>
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BGH	bovines Wachstumshormon (<i>bovine growth hormone</i>)
BGH-p(A)	p(A)-Signal des BGH
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C μ	konstante Region der IgM-Immunglobuline
CA	struktureller Bestandteil des HIV-1 (Kapsid-Protein)
cART	kombinierte antiretrovirale Therapie (<i>combined anti-retroviral therapy</i>)
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	komplemetäre DNA
CMV	<i>cytomegalo virus immediate early promoter</i>
CPE	zytopathischer Effekt
cPPT	zentraler Polypurin-Trakt

CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
C-terminal	carboxyterminal
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	Tag (<i>day</i>)
delta (Δ)	deletierter Bereich des 3'LTR
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
D-PBS	Dulbeccos PBS
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTT	Dithiotreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	Teil der konstanten Kette des Antikörpers
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärts-Streulich (<i>forward scatter</i>)
g	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
gag	gruppenspezifische Antigene
GALV	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>
GALV-LVV	GALV-pseudotypisierte lentivirale Vektoren
gp	Glykoprotein
gp120	Oberflächenprotein des HIV-1 (120 kDA)
gp41	Transmembranprotein des HIV-1 (41 kDA)
h	Stunde (<i>hour</i>)
HBSS	Hanks' Salzlösung (<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>)
hE μ MAR	humaner schwere-Ketten <i>enhancer</i>
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HR	<i>heptad repeat</i>
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
ILV	integrierende lentivirale Vektoren
IN	Integrase des HIV-1
inkl.	inklusive
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
k.A.	keine Angaben

k.o.	knock-out
kb	kilobase
L	linker TALEN Arm
LB	<i>lysogeny broth</i>
LeGO	<i>lentiviral gene ontology</i>
LNT	lenti-
LTR	<i>long terminal repeats</i>
LVV	Lentivirale Vektoren
MA	struktureller Bestandteil des HIV-1 (Matrix-Protein)
maC46	membranverankertes C46
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MAR	<i>matrix associated region</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
MOI	Partikelzahl/Zelle (<i>multiplicity of infection</i>)
mPGK	<i>mouse phosphoglycerate kinase 1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MV	Masern-Virus
MV-LVV	MV-pseudotypisierte lentivirale Vektoren
n.d.	nicht detektierbar
NC	struktureller Bestandteil des HIV-1 (Nukleokapsid-Protein)
nef	akzessorisches Gen des HIV
NILV	nicht-integrierende lentivirale Vektoren
NNRTIs	Nicht-nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren
NRTIs	Nukleosidische bzw. nukleotidische reverse Transkriptase-Inhibitoren
NRTL V	nicht-revers transkribierende lentivirale Vektoren
N-terminal	aminoterminal
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p(A)	Polyadenylierungssignal
p.a.	<i>per annum</i>
p6	struktureller Bestandteil des HIV-1
p7	struktureller Bestandteil des HIV-1 (Nukleokapsid-Protein)
p11	Protease des HIV-1
p17	struktureller Bestandteil des HIV-1 (Matrix-Protein)
p24	struktureller Bestandteil des HIV-1 (Kapsid-Protein)
p32	Integrase des HIV-1
p66	reverse Transkriptase des HIV-1
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
Ph	Phasenkontrast
PI	Propidiumiodid
pol	Polymerase
PR	Protease des HIV-1
psi (ψ)	Verpackungssignal

R	R-Region des HIV-LTR
R	rechter TALEN Arm
RCL	<i>replication competent lentiviruses</i>
rev	regulatorisches Gen des HIV
RN	RetroNectin
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Medium entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRE	<i>Rev response element</i>
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase des HIV-1
sC46	sezernierbares C46
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SFFV	Promoter des <i>spleen focus forming virus</i>
SIN	selbst-inaktivierend
SLO	sekundäre lymphoide Organe
SSC	Seitwärts-Streulicht (<i>side scatter</i>)
SU	Oberflächenprotein des HIV-1
SV40	Simian Virus 40
SV40-p(A)	p(A)-Signal SV40
t _{1/2}	Halbwertszeit
TALE	<i>Transcription activator like effectors</i>
TALEN	<i>Transcription activator like effector nucleases</i>
tat	regulatorisches Gen des HIV
TM	Transmembranprotein des HIV-1
TMB	3,3',5,5'-tetra-methylbenzidine
tracr-RNA	<i>trans-activating crRNA</i>
TU	Transfereinheit
U	Einheit (<i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
U3	U3-Region des HIV-LTR
U5	U5-Region des HIV-LTR
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
vif	akzessorisches Gen des HIV
VLA	<i>very late antigen</i>
vpr	akzessorisches Gen des HIV
vpu	akzessorisches Gen des HIV
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
VSV-G	Glykoprotein des <i>vesicular stomatitis virus</i>
wPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
x	-fach
z.T.	zum Teil
ZFN	Zinkfinger-Nuklease

LITERATUR

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983, **220**:868–871.
2. Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, Shearer G, Kaplan M, Haynes B, Palker T, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham P: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984, **224**:500–503.
3. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC: Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984, **224**:497–500.
4. Simon V, Ho DD: HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy. *Nature Reviews Microbiology* 2003, **1**:181–190.
5. Daar E, Moudgil T, Meyer R, Ho D: Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine* 1991, **324**:961–964.
6. Legrand E, Pellegrin I, Neau D, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Dupon M, Guillemain B, Fleury HJ: Course of specific T lymphocyte cytotoxicity, plasma and cellular viral loads, and neutralizing antibody titers in 17 recently seroconverted HIV type 1-infected patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1997, **13**:1383–1394.
7. State of the Epidemic. In *UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic*. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; :8–15; Zugriff am 08.04.2013.
8. Motomura K, Chen J, Hu W-S: Genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2, two distinct human lentiviruses. *Journal of Virology* 2008, **82**:1923–1933.
9. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT: Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical Infectious Diseases* 2011, **52**:780–787.
10. Frankel AD, Young JA: HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry* 1998, **67**:1–25.
11. Gelderblom H, Hausmann E, Özel M, Pauli G, Koch M: Fine Structure of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Immunolocalization of Structural Proteins. *Virology* 1987, **156**:171–176.
12. Gelderblom H, Özel M, Hausmann E, Winkel T, Pauli G, Koch M: Fine structure of Human Immunodeficiency Virus (HIV), immunolocalization of structural proteins and virus-cell relation. *Micron and Microscopica* 1988, **19**:41–60.
13. Tazi J, Bakkour N, Marchand V, Ayadi L, Aboufirassi A, Branlant C: Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *The FEBS Journal* 2010, **277**:867–876.
14. Lee S-K, Potempa M, Swanstrom R: The choreography of HIV-1 proteolytic processing and virion assembly. *The Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**:40867–40874.
15. Bell NM, Lever AML: HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends in Microbiology* 2012, **21**:136–144.
16. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984, **312**:763–767.
17. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman J-C, Montagnier L: T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984, **312**:767–768.
18. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton R, Hill C, Davis C, Peiper S, Schall T, Littman D, Landau N: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996, **381**:661–666.

19. Dragic T, Litwin V, Allaway G, Martin S, Huang Y, Nagashima K, Cayan C, Maddon P, Koup R, Moore J, Paxton W: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996, **381**:667–673.
20. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW: A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996, **85**:1149–1158.
21. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996, **272**:872–877.
22. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B: The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996, **382**:833–835.
23. Arhel N: Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 2010, **7**.
24. Dismuke DJ, Aiken C: Evidence for a Functional Link between Uncoating of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core and Nuclear Import of the Viral Preintegration Complex. *Journal of Virology* 2006, **80**:3712–3720.
25. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prévost M-C, Allen TD, Charneau P: HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO journal* 2007, **26**:3025–3037.
26. Di Nunzio F, Danckaert A, Fricke T, Perez P, Fernandez J, Perret E, Roux P, Shorte S, Charneau P, Diaz-Griffero F, Arhel NJ: Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration. *PloS one* 2012, **7**:e46037.
27. Hu W-S, Hughes SH: HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012, **2**:1–22.
28. Miller MD, Farnet CM, Bushman FD: Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of Virology* 1997, **71**:5382–5390.
29. Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Leet M, Gendelman HE, Ratner LEE, Stevenson M, Emerman M: The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**:7311–7315.
30. Nie Z, Bergeron D, Subbramanian R, Yao X-J, Checrounge F, Rougeau N, EA C: The putative alpha helix 2 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *Journal of Virology* 1998, **72**:4104–4115.
31. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO: Integration of murine leukemia depends on mitosis. *The EMBO Journal* 1993, **12**:2099–2108.
32. Lewis PF, Emerman M: Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology* 1994, **68**:510–516.
33. Lewis P, Hensel M, Emerman M: Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *The EMBO Journal* 1992, **11**:3053–3058.
34. Bukrinsky M, Haggerty S, Dempsey M, Sharova N, Adzhubei A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Emerman M, Stevenson M: A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 1993, **365**:666–669.
35. Fassati A: HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem. *Retrovirology* 2006, **3**.
36. Lee K, Ambrose Z, Martin TD, Oztot I, Mulky A, Julias JG, Vandegraaff N, Baumann JG, Wang R, Yuen W, Takemura T, Shelton K, Taniuchi I, Li Y, Sodroski J, Littman DR, Coffin JM, Hughes SH, Unutmaz D, Engelman A, KewalRamani VN: Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host & Microbe* 2010, **7**:221–233.

37. Jones K, Peterlin M: Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annual Review of Biochemistry* 1994, **63**:717–743.
38. Purcell D, Martin M: Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of Virology* 1993, **67**:6365–6378.
39. Pollard VW, Malim MH: The Hiv-1 Rev Protein. *Annual Review of Microbiology* 1998, **52**:491–532.
40. Decroly E, Vandenbranden M, Ruyschaert J-M, Cogniaux J, Jacob GS, Howard SC, Marshall CG, Kompelli A, Basak A, Jean F, Lazure C, Benjannet S, Chrétien M, Day R, Seidah N: The Convertases Furin and PC1 Can Both Cleave the Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Envelope Glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM). *The Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**:12240–12247.
41. Kantanen M, Leinikki P, Kuismanen E: Endoproteolytic gp160 envelope precursor occurs after exit from the trans-Golgi network (TGN). *Archives of Virology* 1995, **140**:1441–1449.
42. Moulard M, Decroly E: Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, **1469**:121–132.
43. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K: Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of Virology* 1992, **66**:7193–7200.
44. Garcia J, Miller A: Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 1991, **350**:508–511.
45. Wildum S, Schindler M, Münch J, Kirchhoff F: Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *Journal of Virology* 2006, **80**:8047–8059.
46. Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard J-M: Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine* 1996, **2**:338–342.
47. Martin-Serrano J, Neil SJD: Host factors involved in retroviral budding and release. *Nature Reviews Microbiology* 2011, **9**:519–31.
48. Poznansky M, Lever A, Bergeron L, Haseltine W, Sodroski J: Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type. *Journal of Virology* 1991, **65**:532–536.
49. D'Souza V, Summers MF: How retroviruses select their genomes. *Nature Reviews Microbiology* 2005, **3**:643–655.
50. Gross I, Hohenberg H, Kräusslich HG: In vitro assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus. *European Journal of Biochemistry* 1997, **249**:592–600.
51. Accola MA, Strack B, Göttlinger HG: Efficient Particle Production by Minimal Gag Constructs Which Retain the Carboxy-Terminal Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid-p2 and a Late Assembly Domain. *Journal of Virology* 2000, **74**:5395–5402.
52. Göttlinger HG: The HIV-1 Assembly. *AIDS* 2001, **15**(Suppl 5):S13–S20.
53. Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF: Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**:11364–11349.
54. Carlson L-A, Briggs JAG, Glass B, Riches JD, Simon MN, Johnson MC, Müller B, Grünewald K, Kräusslich H-G: Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host & Microbe* 2008, **4**:592–599.
55. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Pornillos O: Assembly and Architecture of HIV. *Viral Molecular Machines* 2012, **726**:441–465.
56. Jacks T: Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1990, **157**:93–124.

57. Hoxie JA, Fitzharris TP, Youngbar PR, Matthews DM, Rackowski JL, Radka SF: Nonrandom association of cellular antigens with HTLV-III virions. *Human Immunology* 1987, **18**:39–52.
58. Arthur LO, Bess JW, Sowder RC, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE: Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992, **258**:1935–1938.
59. Orentas R, Hildreth J: Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1993, **9**:1157–1165.
60. Fortin J, Cantin R, Lamontange G, Tremblay M: Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *Journal of Virology* 1997, **71**:3588–3596.
61. Rizzuto CD, Sodroski JG: Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *Journal of Virology* 1997, **71**:4847–4851.
62. Fortin J-F, Cantin R, Tremblay MJ: T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with Human Immunodeficiency Virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *Journal of Virology* 1998, **72**:2105–2112.
63. Carlton JG, Martin-Serrano J: Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 2007, **316**:1908–1912.
64. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD: Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008, **451**:425–430.
65. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J: The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host & Microbe* 2008, **3**:245–252.
66. Yang H, Wang J, Jia X, McNatt MW, Zang T, Pan B, Meng W, Wang H-W, Bieniasz PD, Xiong Y: Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**:18428–18432.
67. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, Bieniasz PD: Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 2009, **139**:499–511.
68. Hammonds J, Wang J-J, Yi H, Spearman P: Immunoelectron microscopic evidence for Tetherin/BST2 as the physical bridge between HIV-1 virions and the plasma membrane. *PLoS Pathogens* 2010, **6**:e1000749.
69. Fitzpatrick K, Skasko M, Deerinck TJ, Crum J, Ellisman MH, Guatelli J: Direct restriction of virus release and incorporation of the interferon-induced protein BST-2 into HIV-1 particles. *PLoS Pathogens* 2010, **6**:e1000701.
70. Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, Jepson M, Banting G: A CD317/Tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* 2009, **184**:721–736.
71. Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, Sata T, Tokunaga K: HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**:35060–35072.
72. Vigan R, Neil SJD: Determinants of tetherin antagonism in the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Journal of virology* 2010, **84**:12958–12970.
73. Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, Navaratnam N: An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 2002, **79**:285–296.
74. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D: Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 2003, **424**:99–103.
75. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L: The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 2003, **424**:94–98.

76. Sundquist WI, Kräusslich H-G: HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012, **2**:a006924.
77. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA: The CCR5 and CXCR4 Coreceptors—Central to Understanding the Transmission and Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2004, **20**:111–126.
78. Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Mori T, Ohtsuki T, Apichartpiyakul C, Uchiumi H, Nojima Y, Hoshino H: Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of HIV. *AIDS* 2009, **23**:761–769.
79. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW: Molecular Mechanism of HIV-entry. In *Viral Molecular Machines. Volume 726*. Edited by Rossmann MG, Rao VB. Boston, MA: Springer Science and Business Media; 2012:223–242.
80. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR: Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *The Journal of Experimental Medicine* 1997, **185**:621–628.
81. Chan DC, Kim PS: HIV Entry and Its Inhibition. *Cell* 1998, **93**:681–684.
82. Sattentau Q, Moore J, Vignaux F, Traincard F, P P: Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *Journal of Virology* 1993, **67**:7383–7393.
83. Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J: Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *Journal of Virology* 1993, **67**:3978–3988.
84. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA: Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998, **393**:648–659.
85. Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley J, Olson W, Allaway G, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon P, Moore J: CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996, **384**:184–187.
86. Wu L, Gerard N, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso A, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J: CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996, **384**:179–183.
87. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison S, Skehel J, Wiley D: Atomic structure of ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 1997, **387**:426–430.
88. Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC: A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1989, **5**:431–440.
89. Delwart E, Mosialos G: Retroviral Envelope Glycoproteins Contain a “Leucine Zipper”-like Repeat. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1990, **6**:703–706.
90. Lu M, Blacklow SC, Kim PS: A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nature Structural Biology* 1995, **2**:1075–1082.
91. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997, **89**:263–273.
92. Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS: Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *The Journal of Cell Biology* 2000, **151**:413–423.
93. Melikyan GB: Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* 2008, **5**.

94. Blumenthal R, Durell S, Viard M: HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *The Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**:40841–40849.
95. Ho D, Neumann A, Perelson A, Chen W, Leonard J, Markowitz M: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995, **373**:123–126.
96. Wei X, Ghosh S, Taylor M, Johnson V, Emini E, Deutsch P, Lifson J, Bonhoeffer S, Nowak M, Hahn B, Saag M, Shaw G: Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995, **373**:117–122.
97. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho D: HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time. *Science* 1996, **271**:1582–1586.
98. Preston B, Poiesz B, Loeb L: Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988, **242**:1168–1171.
99. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA: The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988, **242**:1171–1173.
100. Mansky L, Temin H: Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *Journal of Virology* 1995, **69**:5087–5094.
101. Charpentier C, Nora T, Tenaillon O, Clavel F, Hance A: Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasispecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients. *Journal of Virology* 2006, **80**:2472–2484.
102. Onafuwa-Nuga A, Telesnitsky A: The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2009, **73**:451–480.
103. Pomerantz RJ, Horn DL: Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Medicine* 2003, **9**:867–873.
104. Obel N, Omland LH, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen C, Pedersen G, Sørensen HT, Gerstoft J: Impact of non-HIV and HIV risk factors on survival in HIV-infected patients on HAART: a population-based nationwide cohort study. *PloS one* 2011, **6**:e22698.
105. Hoffmann C, Rockstroh J: Substanzklassen, Medikamentenübersicht. In *HIV 2012*. 2012th edition. Hamburg: Medizin Fokus Verlag; 2012:64–77.
106. Pomerantz RJ: Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clinical Infectious Diseases* 2002, **34**:91–97.
107. Coiras M, López-Huertas MR, Pérez-Olmeda M, Alcami J: Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nature Reviews Microbiology* 2009, **7**:798–812.
108. Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir D V, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD: Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997, **278**:1291–1295.
109. García F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G, Pumarola T, Gallart T, Miró JM, Gatell JM: Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999, **13**:F79–86.
110. Chun TW, Davey RT, Engel D, Lane HC, Fauci AS: Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* 1999, **401**:874–875.
111. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF: Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature Medicine* 2003, **9**:727–728.
112. Chubineh S, McGowan J: Nausea and vomiting in HIV: a symptom review. *International Journal of STD & AIDS* 2008, **19**:723–728.
113. Carr A, Cooper DA: Adverse effects of antiretroviral therapy. *The Lancet* 2010, **356**:1423–1430.
114. Baril J-G, Junod P, Leblanc R, Dion H, Therrien R, Laplante F, Falutz J, Côté P, Hébert M-N, Lalonde R, Lapointe N, Lévesque D, Pinault L, Rouleau D, Tremblay C, Trottier B, Trottier S, Tsoukas C, Weiss K:

- HIV-associated lipodystrophy syndrome: A review of clinical aspects. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* 2005, **16**:233–243.
115. Cherry C, Skolasky R, Lal L, Creighton J, Hauer P, Raman SP, Moore R, Carter K, Thomas D, Ebenezer GJ, Wesselingh SL, McArthur JC: Antiretroviral use and other risks for HIV-associated neuropathies in an international cohort. *Neurology* 2006, **66**:867–873.
116. Price J, Thio C: Liver Disease in the HIV-Infected Individual. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2010, **8**:1002–1012.
117. Miller V, De Béthune MP, Kober A, Stürmer M, Hertogs K, Pauwels R, Stoffels P, Staszewski S: Patterns of resistance and cross-resistance to human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors in patients treated with the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor loviride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998, **42**:3123–3129.
118. Rhee S-Y, Taylor J, Fessel WJ, Kaufman D, Towner W, Troia P, Ruane P, Hellinger J, Shirvani V, Zolopa A, Shafer RW: HIV-1 protease mutations and protease inhibitor cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, **54**:4253–4261.
119. Baltimore D: Intracellular Immunization. *Nature* 1988, **335**:395–396.
120. Von Laer D, Baum C, Protzer U: Antiviral gene therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2009, **189**:265–297.
121. Von Laer D, Hasselmann S, Hasselmann K: Gene therapy for HIV infection: what does it need to make it work? *The Journal of Gene Medicine* 2006, **8**:658–667.
122. Tilton JC, Doms RW: Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research* 2010, **85**:91–100.
123. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M: Maraviroc (UK-427 , 857), a potent , orally bioavailable , and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005, **49**:4721–4732.
124. Fätkenheuer G, Pozniak AL, Johnson MA, Plettenberg A, Staszewski S, Hoepelman AIM, Saag MS, Goebel FD, Rockstroh JK, Dezube BJ, Jenkins TM, Medhurst C, Sullivan JF, Ridgway C, Abel S, James IT, Youle M, Van der Ryst E: Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nature Medicine* 2005, **11**:1170–1172.
125. Lieberman-Blum SS, Fung HB, Bandres JC: Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. *Clinical Therapeutics* 2008, **30**:1228–1250.
126. Ayoub A, Alston S, Goodrich J, Heera J, Hoepelman AIM, Lalezari J, Mchale M, Nelson M, Van der Ryst E, Mayer H: Hepatic safety and tolerability in the maraviroc clinical development program. *AIDS* 2010, **24**:2743–2755.
127. Kondru R, Zhang J, Ji C, Mirzadegan T, Rotstein D, Sankuratri S, Dioszegi M: Molecular Interactions of CCR5 with Major Classes of Small-Molecule Anti-HIV CCR5 Antagonists. *Molecular Pharmacology* 2008, **73**:789–800.
128. Moore J, Kuritzkes D: A piece de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. *Current Opinion in HIV and AIDS* 2009, **4**:118–124.
129. Ray N: Maraviroc in the treatment of HIV infection. *Drug Design, Development and Therapy* 2008, **2**:151–161.
130. Liles WC, Rodger E, Broxmeyer HE, Dehner C, Badel K, Calandra G, Christensen J, Wood B, Price TH, Dale DC: Augmented mobilization and collection of CD34 + hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transplantation and Cellular Engineering* 2005, **45**:295–300.

131. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB, Calandra G, Bridger G, Dale DC, Srouf EF: Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *The Journal of Experimental Medicine* 2005, **201**:1307–1318.
132. Lack NA, Green B, Dale DC, Calandra GB, Lee H, MacFarland RT, Badel K, Liles WC, Bridger G: A pharmacokinetic-pharmacodynamic model for the mobilization of CD34+ hematopoietic progenitor cells by AMD3100. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2005, **77**:427–436.
133. Brave M, Farrell A, Ching Lin S, Ocheltree T, Pope Miksinski S, Lee S-L, Saber H, Fourie J, Tornoe C, Booth B, Yuan W, He K, Justice R, Pazdur R: FDA review summary: Mozobil in combination with granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic stem cells to the peripheral blood for collection and subsequent autologous transplantation. *Oncology* 2010, **78**:282–288.
134. Wild C, Oas T, McDanal C, Bolognesi D, Matthews T: A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**:10537–10541.
135. Wild C, Greenwell T: A Synthetic Peptide from HIV-1 gp41 Is a Potent Inhibitor of Virus-Mediated Cell-Cell Fusion. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1993, **9**:1051–1053.
136. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson MR, Nowak MA, Shaw GM, Saag MS: Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine* 1998, **4**:1302–1307.
137. Eckert DM, Kim PS: Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**:11187–11192.
138. Robertson D: US FDA approves new class of HIV. *Nature Biotechnology* 2003, **21**:470–471.
139. Ball R, Kinchelow T: Injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2003, **49**:826–831.
140. Maggi P, Ladisa N, Cinori E, Altobella A, Pastore G, Filotico R: Cutaneous injection site reactions to long-term therapy with enfuvirtide. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004, **53**:678–681.
141. Rimsky LT, Shugars DC, Matthews TJ: Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to gp41-Derived Inhibitory Peptides. *Journal of Virology* 1998, **72**:986–993.
142. Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, Saag MS, Wu X, Shaw GM, Kappes JC: Emergence of Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Patients Receiving Fusion Inhibitor (T-20) Monotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002, **46**:1896–1905.
143. Sista PR, Melby T, Davison D, Jin L, Mosier S, Mink M, Nelson EL, DeMasi R, Cammack N, Salgo MP, Matthews TJ, Greenberg ML: Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *AIDS* 2004, **18**:1787–1794.
144. Egelhofer M, Brandenburg G, Martinius H, Schult-Dietrich P, Melikyan G, Kunert R, Baum C, Choi I, Alexandrov A, Von Laer D: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *Journal of Virology* 2004, **78**:568–575.
145. Egerer L, Volk A, Kahle J, Kimpel J, Brauer F, Hermann FG, Von Laer D: Secreted antiviral entry inhibitory (SAVE) peptides for gene therapy of HIV infection. *Molecular Therapy* 2011, **19**:1236–1244.
146. Chan DC, Chutkowski CT, Kim PS: Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**:15613–15617.
147. Dwyer JJ, Hasan A, Wilson KL, White JM, Matthews TJ, Delmedico MK: The hydrophobic pocket contributes to the structural stability of the N-terminal coiled coil of HIV gp41 but is not required for six-helix bundle formation. *Biochemistry* 2003, **42**:4945–53.

148. Dwyer JJ, Wilson KL, Davison DK, Freel SA, Seedorff JE, Wring SA, Tvermoes NA, Matthews TJ, Greenberg ML, Delmedico MK: Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**:12772–12777.
149. Lohrengel S, Hermann F, Hagmann I, Oberwinkler H, Scrivano L, Hoffmann C, Laer D Von, Dittmar MT: Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Membrane-Anchored gp41-Derived Peptides. *Journal of Virology* 2005, **79**:10237–10246.
150. Melikyan GB, Egelhofer M, Von Laer D: Membrane-anchored inhibitory peptides capture human immunodeficiency virus type 1 gp41 conformations that engage the target membrane prior to fusion. *Journal of Virology* 2006, **80**:3249–3258.
151. Van Lunzen J, Glaunsinger T, Stahmer I, Von Baehr V, Baum C, Schilz A, Kuehlcke K, Naundorf S, Martinius H, Hermann F, Giroglou T, Newrzela S, Müller I, Brauer F, Brandenburg G, Alexandrov A, Von Laer D: Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus. *Molecular Therapy* 2007, **15**:1024–1033.
152. Kimpel J, Braun SE, Qiu G, Wong FE, Conolle M, Schmitz JE, Brendel C, Humeau LM, Dropulic B, Rossi JJ, Berger A, Von Laer D, Johnson RP: Survival of the fittest: positive selection of CD4+ T cells expressing a membrane-bound fusion inhibitor following HIV-1 infection. *PloS one* 2010, **5**:e12357.
153. Pennica D, Holmes W, Kohr E, Harkins R, Vehar G, Ward C, Bennett W, Yelverton E, Seeburg P, Heyneker H, Goeddel D, Collen D: Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 1983, **301**:214–221.
154. Eskridge EM, Shields D: Cell-free processing and segregation of insulin precursors. *The Journal of Biological Chemistry* 1983, **258**:11487–11491.
155. Okun MM, Eskridge EM, Shields D: Truncations of a secretory protein define minimum lengths required for binding to signal recognition particle and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 1990, **265**:7478–7484.
156. Lucotte G: Frequencies of 32 base pair deletion of the (Delta 32) allele of the CCR5 HIV-1 co-receptor gene in Caucasians: A comparative analysis. *Infection, Genetics and Evolution* 2002, **1**:201–205.
157. Novembre J, Galvani AP, Slatkin M: The geographic spread of the CCR5 Delta32 HIV-resistance allele. *PLoS Biology* 2005, **3**:e339.
158. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cogniaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M: Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996, **382**:722–725.
159. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R: Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the CCR5 Structural Gene. *Science* 1996, **273**:1856–1862.
160. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR: Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996, **86**:367–377.
161. Huang Y, Paxton W, Wolinsky S, Neumann A, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin T, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau N, Phair J, Ho D, Koup R: The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine* 1996, **2**:1240–1243.
162. Meyer L, Magierowska M, Hubert J, Rouzioux C, Deveau C, Sanson F, Debre P, Delfraissy J-F, Theodorou I: Early protective effect of CCR-5Δ32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. *AIDS* 1997, **11**:F73–F78.

163. Hoffman TL, MacGregor RR, Burger H, Mick R, Doms RW, Collman RG: CCR5 genotypes in sexually active couples discordant for human immunodeficiency virus type 1 infection status. *The Journal of Infectious Diseases* 1997, **176**:1093–1096.
164. De Roda Husman A-M, Koot M, Cornelissen M, Keet IP, Brouwer M, Broersen SM, Bakker M, Roos MT, Prins M, De Wolf F, Coutinho RA, Miedema F, Goudsmit J, Schuitemaker H: Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *Annals of Internal Medicine* 1997, **127**:882–890.
165. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E: Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2009, **360**:692–698.
166. Allers K, Hütter G, Hofmann J, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E, Schneider T: Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood* 2011, **117**:2791–2799.
167. Hütter G, Schneider T, Thiel E: Transplantation of selected or transgenic blood stem cells - a future treatment for HIV/AIDS? *Journal of the International AIDS Society* 2009, **12**.
168. Rossi JJ, June CH, Kohn DB: Genetic therapies against HIV. *Nature Biotechnology* 2007, **25**:1444–1454.
169. Hoxie JA, June CH: Novel cell and gene therapies for HIV. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012, **2**:a007179.
170. Uhlenbeck O: A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* 1987, **328**:596–600.
171. Haseloff J, Gerlach W: Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 1988, **334**:585–591.
172. González MA, Serrano F, Llorente M, Abad JL, García-Ortiz MJ, Bernad A: A hammerhead ribozyme targeted to the human chemokine receptor CCR5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, **251**:592–596.
173. Bai J, Rossi J, Akkina R: Multivalent anti-CCR ribozymes for stem cell-based HIV type 1 gene therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2001, **17**:385–399.
174. Banerjee A, Li M-J, Remling L, Rossi J, Akkina R: Lentiviral transduction of Tar Decoy and CCR5 ribozyme into CD34 + progenitor cells and derivation of HIV-1 resistant T cells and macrophages. *AIDS Research and Therapy* 2004, **1**.
175. Jacque J-M, Triques K, Stevenson M: Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002, **418**:435–438.
176. Qin X-F, An DS, Chen ISY, Baltimore D: Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**:183–188.
177. Qureshi A, Zheng R, Parlett T, Shi X, Balaraman P, Cheloufi S, Murphy B, Guntermann C, Eagles P: Gene silencing of HIV chemokine receptors using ribozymes and single-stranded antisense RNA. *The Biochemical Journal* 2006, **394**(Pt 2):511–518.
178. An DS, Donahue RE, Kamata M, Poon B, Metzger M, Mao S-H, Bonifacino A, Krouse AE, Darlix J-L, Baltimore D, Qin FX-F, Chen ISY: Stable reduction of CCR5 by RNAi through hematopoietic stem cell transplant in non-human primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**:13110–13115.
179. Liang M, Kamata M, Chen KN, Pariente N, An D, Chen ISY: Inhibition of HIV-1 infection by a unique short hairpin RNA to chemokine receptor 5 delivered into macrophages through hematopoietic progenitor cell transduction. *The Journal of Gene Medicine* 2010, **12**:255–265.
180. Ringpis G-EE, Shimizu S, Arokium H, Camba-Colón J, Carroll M V, Cortado R, Xie Y, Kim PY, Sahakyan A, Lowe EL, Narukawa M, Kandarian FN, Burke BP, Symonds GP, An DS, Chen ISY, Kamata M: Engineering HIV-1-resistant T-cells from short-hairpin RNA-expressing hematopoietic stem/progenitor cells in humanized BLT mice. *PloS one* 2012, **7**:e53492.

181. Anderson J, Li M-J, Palmer B, Remling L, Li S, Yam P, Yee J-K, Rossi J, Zaia J, Akkina R: Safety and efficacy of a lentiviral vector containing three anti-HIV genes--CCR5 ribozyme, tat-rev siRNA, and TAR decoy--in SCID-hu mouse-derived T cells. *Molecular Therapy* 2007, **15**:1182–1188.
182. DiGiusto DL, Krishnan A, Li L, Li H, Li S, Rao A, Mi S, Yam P, Stinson S, Kalos M, Alvarnas J, Lacey SF, Yee J-K, Li M, Couture L, Hsu D, Forman SJ, Rossi JJ, Zaia JA: RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Science Translational Medicine* 2010, **2**:36ra43.
183. Walker JE, Chen RX, McGee J, Nacey C, Pollard RB, Abedi M, Bauer G, Nolta JA, Anderson JS: Generation of an HIV-1-resistant immune system with CD34(+) hematopoietic stem cells transduced with a triple-combination anti-HIV lentiviral vector. *Journal of Virology* 2012, **86**:5719–5729.
184. Yang AG, Bai X, Huang XF, Yao C, Chen S: Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR-5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**:11567–11572.
185. Schroers R, Davis CM, Wagner H-J, Chen S-Y: Lentiviral transduction of human T-lymphocytes with a RANTES intrakine inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection. *Gene Therapy* 2002, **9**:889–897.
186. Thompson LH: Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutation Research* 2012, **751**:158–246.
187. Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M: Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**:5172–5177.
188. Brnzei D, Foiani M: Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008, **9**:297–308.
189. San Filippo J, Sung P, Klein H: Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry* 2008, **77**:229–257.
190. Moynahan ME, Jasin M: Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010, **11**:196–207.
191. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS: Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985, **317**:230–234.
192. Urnov FD, Miller JC, Lee Y-L, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC: Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005, **435**:646–651.
193. Moehle EA, Rock JM, Lee Y-L, Jouvenot Y, DeKolver RC, Gregory PD, Urnov FD, Holmes MC: Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**:3055–3060.
194. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K: Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003, **4**:712–720.
195. Lieber MR: The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry* 2010, **79**:181–211.
196. Hentze MW, Kulozik AE: A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 1999, **96**:307–310.
197. Marraffini LA, Sontheimer EJ: CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics* 2010, **11**:181–190.
198. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012, **337**:816–821.

199. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim J-S: Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* 2013, **31**:230–232.
200. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013, **339**:819–823.
201. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM: RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013, **339**:823–826.
202. Moure CM, Gimble FS, Quijcho FA: Crystal structure of the intein homing endonuclease PI-SceI bound to its recognition sequence. *Nature Structural Biology* 2002, **9**:764–770.
203. Stoddard BL: Homing endonuclease structure and function. *Quarterly Reviews of Biophysics* 2005, **38**:49–95.
204. Fajardo-Sanchez E, Stricher F, Pâques F, Isalan M, Serrano L: Computer design of obligate heterodimer meganucleases allows efficient cutting of custom DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 2008, **36**:2163–2173.
205. Ulge UY, Baker DA, Monnat RJ: Comprehensive computational design of mCrel homing endonuclease cleavage specificity for genome engineering. *Nucleic Acids Research* 2011, **39**:4330–4339.
206. Li H, Ulge UY, Hovde BT, Doyle LA, Monnat RJ: Comprehensive homing endonuclease target site specificity profiling reveals evolutionary constraints and enables genome engineering applications. *Nucleic Acids Research* 2012, **40**:2587–2598.
207. Klug A: The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of Biochemistry* 2010, **79**:213–231.
208. Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO: DNA recognition by Cys2His2 Zinc Finger Proteins. *Annual Review of Biophysics und Biomolecular Structure* 2000, **29**:183–212.
209. Isalan M, Klug A, Choo Y: Comprehensive DNA recognition through concerted interactions from adjacent zinc fingers. *Biochemistry* 1998, **37**:12026–12033.
210. Sander JD, Zaback P, Joung JK, Voytas DF, Dobbs D: An affinity-based scoring scheme for predicting DNA-binding activities of modularly assembled zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Research* 2009, **37**:506–515.
211. Kim S, Lee MJ, Kim H, Kang M, Kim J-S: Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. *Nature Methods* 2011, **8**:7.
212. Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi Y, Pierick CJ, Hoffman E, Maeder ML, Khayter C, Reyon D, Dobbs D, Langenau DM, Stupar RM, Giraldez AJ, Voytas DF, Peterson RT, Yeh J-RJ, Joung JK: Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nature Methods* 2011, **8**:67–69.
213. Isalan M, Choo Y, Klug A: Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**:5617–5621.
214. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S: Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**:1156–1160.
215. Händel E-M, Alwin S, Cathomen T: Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Molecular Therapy* 2009, **17**:104–111.
216. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaeppl C, Nowrouzi A, Bartholomae CC, Wang J, Friedman G, Holmes MC, Gregory PD, Glimm H, Schmidt M, Naldini L, Von Kalle C: An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nature Biotechnology* 2011, **29**:816–823.

217. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR: Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature Methods* 2011, **8**:765–770.
218. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U: Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 2009, **326**:1509–1512.
219. Moscou MJ, Bogdanove AJ: A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009, **326**:1501.
220. Boch J, Bonas U: Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* 2010, **48**:419–436.
221. Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu J-K, Shi Y, Yan N: Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* 2012, **335**:720–723.
222. Mak AN-S, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL: The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* 2012, **335**:716–719.
223. Streubel J, Blücher C, Landgraf A, Boch J: TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nature Biotechnology* 2012, **30**:593–595.
224. Cong L, Zhou R, Kuo Y-C, Cunniff M, Zhang F: Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nature Communications* 2012, **3**:1–6.
225. Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia N, Bogdanove AJ, Voytas DF: Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acid Research* 2011, **39**:e82.
226. Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F: A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protocols* 2012, **7**:171–192.
227. Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK: FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology* 2012, **30**:460–465.
228. Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Höning K, Hornung V: A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nature Biotechnology* 2012, **31**:76–81.
229. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF: Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 2010, **186**:757–761.
230. Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow K a, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ: A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* 2011, **29**:143–148.
231. Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T: A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research* 2011, **39**:9283–9293.
232. Schiffer JT, Aubert M, Weber N, Mintzer E, Stone D, Jerome KR: Targeted DNA mutagenesis for the cure of chronic viral infections. *Journal of Virology* 2012, **86**:8920–8936.
233. Romano G, Micheli P, Pacilio C, Giordano A: Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 2000, **18**:19–39.
234. Wei C-M, Gibson M, Spear PG, Scolnick EM: Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 1981, **39**:935–944.
235. Shimotohno K, Temin HM: Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* 1981, **26**:67–77.
236. Shimada T, Fujii H, Mitsuya H, Nienhuis AW: Targeted and highly efficient gene transfer into CD4+ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *The Journal of Clinical Investigation* 1991, **88**:1043–1047.

237. Cockrell AS, Kafri T: Gene delivery by lentivirus vectors. *Molecular Biotechnology* 2007, **36**:184–204.
238. Wiznerowicz M, Trono D: Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends in Biotechnology* 2005, **23**:42–47.
239. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y: Lentiviral vectors: basic to translational. *The Biochemical Journal* 2012, **443**:603–618.
240. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D: In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996, **272**:263–267.
241. Parolin C, Taddeo B, Palú G, Sodroski J: Use of cis- and trans-acting viral regulatory sequences to improve expression of human immunodeficiency virus vectors in human lymphocytes. *Virology* 1996, **222**:415–422.
242. Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M: Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**:15266–15271.
243. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D: Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature Biotechnology* 1997, **15**:871–875.
244. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L: A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology* 1998, **72**:8463–8471.
245. Zufferey R, Dull T, Bukovsky A, Mandel RJ, Quiroz D, Naldini L, Trono D: Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. *Journal of Virology* 1998, **72**:9873–9880.
246. Wahle E, Keller W: The biochemistry of polyadenylation. *Trends in Biochemical Sciences* 1996, **21**:247–250.
247. Logan J, Falck-Pedersen E, Darnell JE, Shenk T: A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**:8306–8310.
248. Connelly S, Manley JL: A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes & Development* 1988, **2**:440–452.
249. Decker CJ, Parker R: A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes & Development* 1993, **7**:1632–1643.
250. Parker R, Song H: The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology* 2004, **11**:121–127.
251. Jackson RJ, Standart N: Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 1990, **62**:15–24.
252. Sachs AB, Sarnow P, Hentze MW: Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 1997, **89**:831–838.
253. Preiss T, Hentze M: Dual function of the messenger RNA cap structure in poly (A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* 1998, **392**:516–520.
254. Valsamakis A, Zeichnert S, Carswell S, Alwine JC: The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: A 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**:2108–2112.
255. Zhao J, Hyman L, Moore C: Formation of mRNA 3'ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1999, **63**:405–445.

256. Valsamakis A, Schek N, Alwine J: Elements upstream of the AAUAAA within the human immunodeficiency virus polyadenylation signal are required for efficient polyadenylation in vitro. *Molecular and Cellular Biology* 1992, **12**:3699–3705.
257. Graveley B, Gilmartin G: A common mechanism for the enhancement of mRNA 3' processing by U3 sequences in two distantly related lentiviruses. *Journal of Virology* 1996, **70**:1612–1617.
258. Zaiss A-K, Son S, Chang L-J: RNA 3' Readthrough of Oncoretrovirus and Lentivirus: Implications for Vector Safety and Efficacy. *Journal of Virology* 2002, **76**:7209–7219.
259. Schambach A, Galla M, Maetzig T, Loew R, Baum C: Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. *Molecular Therapy* 2007, **15**:1167–1173.
260. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B: A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular Therapy* 2008, **16**:698–706.
261. Weber K, Mock U, Petrowitz B, Bartsch U, Fehse B: Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Therapy* 2010, **17**:511–520.
262. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ: Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *Journal of Virology* 1999, **73**:2886–2892.
263. Higashimoto T, Urbinati F, Perumbeti A, Jiang G, Zarzuela A, Chang L, Kohn DB, Malik P: The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors. *Gene Therapy* 2007, **14**:1298–1304.
264. Popa I, Harris ME, Donello JE, Hope TJ: CRM1-dependent Function of a cis-acting RNA export element. *Molecular and Cellular Biology* 2002, **22**:2057–2067.
265. Barry SC, Harder B, Brzezinski M, Flint LY, Seppen J, Osborne WR: Lentivirus vectors encoding both central polypurine tract and posttranscriptional regulatory element provide enhanced transduction and transgene expression. *Human Gene Therapy* 2001, **12**:1103–1108.
266. Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Dubart-Kupperschmitt A, Charneau P: The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Gene Therapy* 2000, **96**:4103–4110.
267. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L: Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nature Genetics* 2000, **25**:217–222.
268. Baum C, Hegewisch-Becker S, Eckert H-G, Stocking C, Ostertag W: Novel Retroviral Vectors for Efficient Expression of the Multidrug Resistance (mdr-1) Gene in Early Hematopoietic Cells. *Journal of Virology* 1995, **69**:7541–7547.
269. Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M, Thrasher AJ: High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Human Gene Therapy* 2002, **13**:803–813.
270. Baum C, Düllmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, Von Kalle C: Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 2003, **101**:2099–2114.
271. Baum C, Kustikova O, Modlich U, Li Z, Fehse B: Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Human Gene Therapy* 2006, **17**:253–263.
272. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JL, De Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts

- TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003, **302**:415–419.
273. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval J-L, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A: A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine* 2003, **348**:255–256.
274. Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder ARW, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD: Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biology* 2004, **2**:e234.
275. Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, Barr S, Leipzig J, Hannenhalli S, Hoffmann C: Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nature Reviews Microbiology* 2005, **3**:848–858.
276. Cattoglio C, Facchini G, Sartori D, Antonelli A, Miccio A, Cassani B, Schmidt M, Von Kalle C, Howe S, Thrasher AJ, Aiuti A, Ferrari G, Recchia A, Mavilio F: Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 2007, **110**:1770–1778.
277. Zaiss A-K, Liu Q, Bowen GP, Wong NCW, Bartlett JS, Muruve DA: Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology* 2002, **76**:4580–4590.
278. Vargas J, Gusella GL, Najfeld V, Klotman ME, Cara A: Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Human Gene Therapy* 2004, **15**:361–372.
279. Yáñez-Muñoz RJ, Balagán KS, MacNeil A, Howe SJ, Schmidt M, Smith AJ, Buch P, MacLaren RE, Anderson PN, Barker SE, Duran Y, Bartholomae C, Von Kalle C, Heckenlively JR, Kinnon C, Ali RR, Thrasher AJ: Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nature Medicine* 2006, **12**:348–353.
280. Leavitt AD, Robles G, Alesandro N, Varmus HE: Human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants retain in vitro integrase activity yet fail to integrate viral DNA efficiently during infection. *Journal of Virology* 1996, **70**:721–728.
281. Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee Y-L, Kim KA, Ando D, Urnov FD, Galli C, Gregory PD, Holmes MC, Naldini L: Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nature Biotechnology* 2007, **25**:1298–1306.
282. Cornu TI, Cathomen T: Targeted genome modifications using integrase-deficient lentiviral vectors. *Molecular Therapy* 2007, **15**:2107–2113.
283. Miller DG, Rutledge EA, Russell DW: Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nature Genetics* 2002, **30**:147–148.
284. Stephen SL, Montini E, Sivanandam VG, Al-Dhalimy M, Kestler HA, Finegold M, Grompe M, Kochanek S: Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo. *Journal of Virology* 2010, **84**:9987–9994.
285. Mussolino C, Cathomen T: TALE nucleases: Tailored genome engineering made easy. *Current Opinion in Biotechnology* 2012, **23**:644–650.
286. Luo XM, Maarschalk E, O'Connell RM, Wang P, Yang L, Baltimore D: Engineering human hematopoietic stem/progenitor cells to produce a broadly neutralizing anti-HIV antibody after in vitro maturation to human B lymphocytes. *Blood* 2009, **113**:1422–1431.
287. Kuhmann SE, Platt EJ, Kozak SL, Kabat D: Polymorphisms in the CCR5 genes of African green monkeys and mice implicate specific amino acids in infections by simian and human immunodeficiency viruses. *Journal of Virology* 1997, **71**:8642–8656.
288. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A: Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 2012, **9**:676–682.

289. Ke S-H, Madison EL: Rapid and efficient site-directed mutagenesis by the single-tube megaprimer PCR method. *Nucleic Acids Research* 1997, **25**:3371–3372.
290. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, Vogt RF, Marti GE, Rawstron A, Van Zelm MC, Van Dongen JJM, Johnsen HE, Klein B, Orfao A: Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry Part B (Clinical cytometry)* 2010, **78**(May):S47–60.
291. Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, Von Laer D: Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: Generation, concentration, and broad host range. *Journal of Virology* 2002, **76**:1488–1495.
292. Funke S, Maisner A, Mühlebach MD, Koehl U, Grez M, Cattaneo R, Cichutek K, Buchholz CJ: Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Molecular Therapy* 2008, **16**:1427–1436.
293. Kustikova OS, Wahlers A, Kuhlcke K, Stahle B, Zander AR, Baum C, Fehse B: Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood* 2003, **102**:3934–3937.
294. Cornetta K, Anderson WF: Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *Journal of Virological Methods* 1989, **23**:187–194.
295. Hanenberg H, Xiao X, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams D: Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nature Medicine* 1996, **2**:876–882.
296. Mühlebach MD, Schmitt I, Steidl S, Stitz J, Schweizer M, Blankenstein T, Cichutek K, Uckert W: Transduction efficiency of MLV but not of HIV-1 vectors is pseudotype dependent on human primary T lymphocytes. *Journal of Molecular Medicine* 2003, **81**:801–810.
297. Lutzko C, Senadheera D, Skelton D, Petersen D, Kohn DB: Lentivirus vectors incorporating the immunoglobulin heavy chain enhancer and matrix attachment regions provide position-independent expression in B lymphocytes. *Journal of Virology* 2003, **77**:7341–7351.
298. Fehse B, Kustikova OS, Bubenheim M, Baum C: Poisson--it's a question of dose... *Gene Therapy* 2004, **11**:879–881.
299. Zapata-Hommer O, Griesbeck O: Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP. *BMC Biotechnology* 2003, **3**.
300. Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee Y-L, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ: An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology* 2007, **25**:778–785.
301. Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich V V, Lee Y-L, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH: Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* 2008, **26**:808–816.
302. Sarafianos SG, Marchand B, Das K, Himmel DM, Parniak MA, Hughes SH, Arnold E: Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *Journal of Molecular Biology* 2009, **385**:693–713.
303. Voelkel C, Galla M, Maetzig T, Warlich E, Kuehle J, Zychlinski D, Bode J, Cantz T, Schambach A, Baum C: Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**:7805–7810.
304. Maetzig T, Baum C, Schambach A: Retroviral Protein Transfer: Falling Apart to Make an Impact. *Current Gene Therapy* 2012, **12**:389–409.
305. Chen Z-L, Wu B-C, Liu H, Liu X-M, Huang P-T: Temperature shift as a process optimization step for the production of pro-urokinase by a recombinant Chinese hamster ovary cell line in high-density perfusion culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2004, **97**:239–243.

306. Fox SR, Patel UA, Yap MGS, Wang DIC: Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **85**:177–184.
307. Sunley K, Tharmalingam T, Butler M: CHO Cells Adapted to Hypothermic Growth Produce High Yields of Recombinant β -Interferon. *Biotechnology Process* 2008, **24**:898–906.
308. Janssens W, Chuah MKL, Naldini L, Follenzi A, Collen D, Saint-Remy J-M, VandenDriessche T: Efficiency of onco-retroviral and lentiviral gene transfer into primary mouse and human B-lymphocytes is pseudotype dependent. *Human Gene Therapy* 2003, **14**:263–276.
309. Bovia F, Salmon P, Matthes T, Kvell K, Nguyen TH, Werner-Favre C, Barnet M, Nagy M, Leuba F, Arrighi J-F, Piguet V, Trono D, Zubler RH: Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* 2003, **101**:1727–1733.
310. Serafini M, Naldini L, Introna M: Molecular evidence of inefficient transduction of proliferating human B lymphocytes by VSV-pseudotyped HIV-1-derived lentivectors. *Virology* 2004, **325**:413–424.
311. Frecha C, Costa C, Lévy C, Nègre D, Russell SJ, Maisner A, Salles G, Peng K-W, Cosset F-L, Verhoeven E: Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* 2009, **114**:3173–3180.
312. Bunnell BA, Muul LM, Donahue RE, Blaese RM, Morgan RA: High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**:7739–7743.
313. Ayuk F, Li Z, Kühlcke K, Lindemann C, Schade U, Eckert HG, Zander A, Fehse B: Establishment of an optimised gene transfer protocol for human primary T lymphocytes according to clinical requirements. *Gene Therapy* 1999, **6**:1788–1792.
314. Kühlcke K, Fehse B, Schilz A, Loges S, Lindemann C, Ayuk F, Lehmann F, Stute N, Fauser AR, Zander AR, Eckert H-G: Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Molecular Therapy* 2002, **5**:473–478.
315. Von Kalle C, Kiem HP, Goehle S, Darovsky B, Heimfeld S, Torok-Storb B, Storb R, Schuening FG: Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector. *Blood* 1994, **84**:2890–2897.
316. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kühlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Lüthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, Von Kalle C, Seger R, Grez M: Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nature Medicine* 2006, **12**:401–409.
317. Miller AD, Garcia J V, Von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden M V: Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *Journal of Virology* 1991, **65**:2220–2224.
318. Strang BL, Ikeda Y, Cosset F-L, Collins MKL, Takeuchi Y: Characterization of HIV-1 vectors with gammaretrovirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells. *Gene Therapy* 2004, **11**:591–598.
319. Feldherr CM, Akin D: The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cell cultures. *The Journal of Cell Biology* 1990, **111**:1–8.
320. Feldherr C, Akin D: Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. *Experimental Cell Research* 1993, **205**:179–186.
321. Yoshida H, Nishiura T, Karasuno T, Matsumura I, Ishikawa J, Yoshimura M, Yokota T, Okajima Y, Ogawa M, Kanakura Y, Tomiyama Y, Matsuzawa Y: Effect of the interaction between fibronectin and VLA-4 on the proliferation of human B cells, especially a novel human B-cell line, OPM-3. *British Journal of Haematology* 1998, **103**:804–812.

322. Garcia-Gila M, Lopez-Martin EM, Garcia-Pardo A: Adhesion to fibronectin via alpha4 integrin (CD49d) protects B cells from apoptosis induced by serum deprivation but not via IgM or Fas/Apo-1 receptors. *Clinical and Experimental Immunology* 2002, **127**:455–462.
323. Kimizuka F, Taguchi Y, Ohdate Y, Kawase Y, Shimojo T, Hashino K, Kato I, Sekiguchi K, Titani K: Production and Characterization of Functional Domains of Human Fibronectin Expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry* 1991, **110**:284–291.
324. Banerji J, Olson L, Schaffner W: A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 1983, **33**:729–740.
325. Nikolajczyk BS, Sanchez JA, Sen R: ETS protein-dependent accessibility changes at the immunoglobulin mu heavy chain enhancer. *Immunity* 1999, **11**:11–20.
326. Herrscher RF, Kaplan MH, Lelsz DL, Das C, Scheuermann R, Tucker PW: The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: A B cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes & Development* 1995, **9**:3067–3082.
327. Taher TE, Tulone C, Fatah R, D'Acquisto F, Gould DJ, Mageed RA: Repopulation of B-lymphocytes with restricted gene expression using haematopoietic stem cells engineered with lentiviral vectors. *Gene Therapy* 2008, **15**:998–1006.
328. Modlich U, Böhne J, Schmidt M, Von Kalle C, Knöss S, Schambach A, Baum C: Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 2006, **108**:2545–2553.
329. Zychlinski D, Schambach A, Modlich U, Maetzig T, Meyer J, Grassman E, Mishra A, Baum C: Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Molecular Therapy* 2008, **16**:718–725.
330. Zhang F, Frost AR, Blundell MP, Bales O, Antoniou MN, Thrasher AJ: A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors. *Molecular Therapy* 2010, **18**:1640–1649.
331. Van Kooten C, Banchereau J: CD40-CD40 ligand. *Journal of Leukocyte Biology* 2000, **67**(January):2–17.
332. Tangye SG, Avery DT, Deenick EK, Hodgkin PD: Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *Journal of Immunology* 2003, **170**:686–694.
333. Hufert FT, Van Lunzen J, Janossy G, Bertram S, Schmitz J, Haller O, Racz P, Von Laer D: Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. *AIDS* 1997, **11**:849–857.
334. Von Bergwelt-Baildon M, Shimabukuro-Vornhagen A, Popov A, Klein-Gonzalez N, Fiore F, Debey S, Draube A, Maecker B, Menezes I, Nadler LM, Schultze JL: CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: Potential as cellular adjuvants. *Blood* 2006, **107**:2786–2789.
335. Von Andrian UH, Mempel TR: Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature Reviews Immunology* 2003, **3**:867–878.
336. Klein-Gonzalez N, Balkow S, Kondo E, Liebig T, Shimabukuro-Vornhagen A, Grabbe S, Bloch W, Von Bergwelt-Baildon MS: CD40-activated B cells migrate towards secondary lymphoid organs and interact dynamically with T cells. *Bone Marrow Transplantation* 2010, **45** Suppl2:S1.
337. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti J-C, Lanzavecchia A, Manz MG: Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004, **304**:104–107.
338. Goldman JP, Blundell MP, Lopes L, Kinnon C, Di Santo JP, Thrasher AJ: Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *British Journal of Haematology* 1998, **103**:335–342.
339. Mazurier F, Fontanellas A, Salesse S, Taine L, Landriaux S, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Peault B, Di Santo JP, De Verneuil H: A novel immunodeficient mouse model - RAG2 x common cytokine receptor

- gamma chain double mutants - requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 1999, **19**:533–541.
340. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall M, Alt F: RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992, **68**:855–867.
 341. Mårtensson C, Kristensson K, Kalliomäki S, Borrebaeck CA, Carlsson R: Antigen-specific human immunoglobulin production in SCID mice transplanted with human peripheral lymphocytes is dependent on CD4⁺ CD45RO⁺ T cells. *Immunology* 1994, **83**:171–179.
 342. Roncarolo MG, Carballido JM, Rouleau M, Namikawa R, De Vries JE: Human T-and B-cell functions in SCID-hu mice. *Seminars in Immunology* 1996, **8**:207–213.
 343. Yurasov S, Kollmann T, Kim A, Raker C, Hachamovitch M, Wong-Staal F, Goldstein H: Severe combined immunodeficiency mice engrafted with human T cells, B cells, and myeloid cells after transplantation with human fetal bone marrow or liver cells and implanted with human fetal thymus: a model for studying human gene therapy. *Blood* 1997, **89**:1800–1810.
 344. Capon D, Chamow S, Mordenti J, Marsters S, Gregory T, Mitsuya H, Byrn R, Lucas C, Wurm F, Groopman J, Broder S, Smith D: Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 1989, **337**:525–531.
 345. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT: The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nature Reviews Microbiology* 2008, **6**:143–155.
 346. Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, Beary H, Hayes D, Frankel SS, Birx DL, Lewis MG: Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature Medicine* 2000, **6**:207–210.
 347. An W, Telesnitsky A: Frequency of direct repeat deletion in a human immunodeficiency virus type 1 vector during reverse transcription in human cells. *Virology* 2001, **286**:475–482.
 348. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA: Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single “self-cleaving” 2A peptide-based retroviral vector. *Nature Biotechnology* 2004, **22**:589–594.
 349. Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP: High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *Journal of Virology* 2000, **74**:1234–1240.
 350. Coffin J: Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *Journal of General Virology* 1979, **42**:1–26.
 351. Stuhlmann H, Berg P: Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *Journal of Virology* 1992, **66**:2378–2388.
 352. Roda RH, Balakrishnan M, Hanson MN, Wohrl BM, Le Grice SFJ, Roques BP, Gorelick RJ, Bambara RA: Role of the Reverse Transcriptase, Nucleocapsid Protein, and Template Structure in the Two-step Transfer Mechanism in Retroviral Recombination. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**:31536–31546.
 353. Gärtner K, Wiktorowicz T, Park J, Mergia A, Rethwilm A, Scheller C: Accuracy estimation of foamy virus genome copying. *Retrovirology* 2009, **6**.
 354. An W, Telesnitsky A: HIV-1 genetic recombination: experimental approaches and observations. *AIDS Review* 2002, **4**:195–212.
 355. Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA: Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Research* 2008, **134**:19–38.
 356. Rhodes T, Wargo H, Hu W: High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *Journal of Virology* 2003, **77**:11193–11200.

357. Chen J, Powell D, Hu W-S: High frequency of genetic recombination is a common feature of primate lentivirus replication. *Journal of Virology* 2006, **80**:9651–9658.
358. Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, Recchia A, Cathomen T, Gonçalves MA: Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Research* 2012, **41**:e63.
359. Wakefield JK, Jablonski SA, Morrow CD: In vitro enzymatic activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants in the highly conserved YMDD amino acid motif correlates with the infectious potential of the proviral genome. *Journal of Virology* 1992, **66**:6806–6812.
360. Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T: Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009, **1789**:542–557.
361. Reuveny S, Velez D, Macmillan JD, Miller L: Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of Immunological Methods* 1986, **86**:53–59.
362. Barnabé N, Butler M: Effect of temperature on nucleotide pools and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma. *Biotechnology and Bioengineering* 1994, **44**:1235–1245.
363. Bloemkolk JW, Gray MR, Merchant F, Mosmann TR: Effect of temperature on hybridoma cell cycle and MAbs production. *Biotechnology and Bioengineering* 1992, **40**:427–431.
364. Borth N, Heider R, Assadian A, Katinger H: Growth and production kinetics of human x mouse and mouse hybridoma cells at reduced temperature and serum content. *Journal of Biotechnology* 1992, **25**:319–331.
365. Chuppa S, Tsai YS, Yoon S, Shackleford S, Rozales C, Bhat R, Tsay G, Matanguihan C, Konstantinov K, Naveh D: Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* 1997, **55**:328–338.
366. Rao PN, Engelberg J: HeLa Cells: Effects of Temperature on the Life Cycle. *Science* 1965, **148**:1092–1094.
367. Blø M, Micklem DR, Lorens JB: Enhanced gene expression from retroviral vectors. *BMC Biotechnology* 2008, **8**.
368. Hager S, Frame FM, Collins AT, Burns JE, Maitland NJ: An internal polyadenylation signal substantially increases expression levels of lentivirus-delivered transgenes but has the potential to reduce viral titer in a promoter-dependent manner. *Human Gene Therapy* 2008, **19**:840–850.
369. Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 2002, **16**:6–21.
370. Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* 2001, **293**:1074–1080.
371. Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC, Cannon PM: Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nature Biotechnology* 2010, **28**:839–847.
372. Mock U, Thiele R, Uhde A, Fehse B, Horn S: Efficient lentiviral transduction and transgene expression in primary human B cells. *Human Gene Therapy Methods* 2012, **23**(December):408–415.
373. Voit RA, McMahon MA, Sawyer SL, Porteus MH: Generation of an HIV Resistant T-cell Line by Targeted “Stacking” of Restriction Factors. *Molecular Therapy* 2013, **21**:786–795.
374. Cathomen T, Joung JK: Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Molecular Therapy* 2008, **16**:1200–1207.
375. Zambidis ET, Kurup A, Scott DW: Genetically transferred central and peripheral immune tolerance via retroviral-mediated expression of immunogenic epitopes in hematopoietic progenitors or peripheral B lymphocytes. *Molecular Medicine* 1997, **3**:212–224.
376. Skupsky J, Zhang A-H, Su Y, Scott DW: B-cell-delivered gene therapy induces functional T regulatory cells and leads to a loss of antigen-specific effector cells. *Molecular Therapy* 2010, **18**:1527–1535.

-
377. Kondo E, Topp MS, Kiem H-P, Obata Y, Morishima Y, Kuzushima K, Tanimoto M, Harada M, Takahashi T, Akatsuka Y: Efficient generation of antigen-specific cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40-activated B cells. *Journal of Immunology* 2002, **169**:2164–2171.
378. Coughlin CM, Vance BA, Grupp SA, Vonderheide RH: RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood* 2004, **103**:2046–2054.
379. Zanetti M, Castiglioni P, Rizzi M, Wheeler M, Gerloni M: B lymphocytes as antigen-presenting cell-based genetic vaccines. *Immunological Reviews* 2004, **199**:264–278.
380. Kawai T, Choi U, Cardwell L, DeRavin SS, Naumann N, Whiting-Theobald NL, Linton GF, Moon J, Murphy PM, Malech HL: WHIM syndrome myelokathexis reproduced in the NOD/SCID mouse xenotransplant model engrafted with healthy human stem cells transduced with C-terminus-truncated CXCR4. *Blood* 2007, **109**:78–84.
381. Zhang X, Beard BC, Trobridge GD, Wood BL, Sale GE, Sud R, Humphries RK, Kiem H-P: High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *The Journal of Clinical Investigation* 2008, **118**:1502–1510.
382. Galla M, Schambach A, Falk CS, Maetzig T, Kuehle J, Lange K, Zychlinski D, Heinz N, Brugman MH, Göhring G, Izsvák Z, Ivics Z, Baum C: Avoiding cytotoxicity of transposases by dose-controlled mRNA delivery. *Nucleic Acids Research* 2011, **39**:7147–7160.
383. Ivics Z, Izsvák Z: Transposons for gene therapy! *Current Gene Therapy* 2006, **6**:593–607.
384. Moldt B, Staunstrup NH, Jakobsen M, Yáñez-Muñoz RJ, Mikkelsen JG: Genomic insertion of lentiviral DNA circles directed by the yeast F1p recombinase. *BMC Biotechnology* 2008, **8**.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, April 2013

Ulrike Mock

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe vieler schlauer und lieber Menschen nicht zustande gekommen.

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. Boris Fehse für seine großartige Betreuung! Ich danke Dir für ein faszinierendes Thema, deinen Rückhalt, für eine stets offene Tür und für die Freiheit, neuen Ideen nachzugehen. Dein Überblick, Wissen und Dein Vertrauen in meine Arbeit hat mich stets erstaunt und vorangetrieben.

Ich danke auch Prof. Dr. Thomas Dobner für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft, die Begutachtung meiner Arbeit zu übernehmen.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Meike von Laer und Dr. Waseem Qasim danke ich für die Zusammenarbeit aus und in der Ferne. Vielen Dank, dass ihr mir die Möglichkeit gegeben habt, meinen Horizont zu erweitern. Außerdem danke ich Prof. Dr. Toni Cathomen für das Bereitstellen der CCR5-spezifischen TALEN und die kritischen Anmerkungen zu meiner Arbeit.

Und nun zur Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie: Ihr Lieben, ich danke Euch allen für eine großartige Zeit und Eure Hilfe!!! Stefan Horn, Meister der Systematik, ich habe viel von Dir gelernt! Deine Sorgfalt und Genauigkeit haben mich enorm beeindruckt und ich danke dir für deine unentbehrliche Hilfe bei dieser Arbeit! Kristoffer Weber, ääh, Riecken, ein schier unerschöpflicher Brunnen nützlicher (und manchmal auch unnützer) Informationen! Du warst dir nie zu schade, Fragen auch zwei- oder dreimal zu beantworten und ich danke Dir aufrichtig für Deine Hilfe! Regine Thiele und Almut Uhde, Euch danke ich (nicht nur) für die großartige Unterstützung bei der Transduktion nahezu unendlich vieler B-Zellen! Ich konnte mich immer auf eure helfenden Hände verlassen! Johannes Polke, die gute Seele der Molekularbiologie. Ein ganz herzliches Dankeschön auch dir! Und dann danke ich natürlich auch: Doreen, Tanja, Birgit, Kerstin, Ercan, Melanie, Constanze und Anita. Zu guter Letzt danke ich aber meiner Leidensgenossin Belinda Berdien! Mit schrägen Schrebergärten, Best-of-7 und vielen, vielen, weiteren *competitions* hast ausgerechnet Du (!!!) mir enorm geholfen!!!

Ich danke auch den Arbeitsgruppen in Innsbruck (ehemals Frankfurt) bzw. London für Ihre Unterstützung: Lisa Egerer, Andreas Volk und Janine Kimpel bzw. Emma Chan, Sue Ballard and Jude Nwanze. A quite special thanks goes to my coffee-and-burger-buddy Christos Georgiadis. Außerdem danke ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die Unterstützung meines Aufenthaltes in der Molecular Immunologie Unit des University College in London.

Dem ASMB-Team und ganz besonders Irm Hermans-Borgmeyer mit ihrem unerschütterlichen Enthusiasmus danke ich für die Unterstützung und Möglichkeit, mich während meiner Promotion auch mit anderen Themen zu beschäftigen.

All meinen Freunden danke ich für ihre Geduld!!! Nora und Friederike, ohne euch wäre das gesamte Studium nur halb so schön gewesen. Ich hoffe, dass wir uns – sollten wir auch getrennte Wege gehen – immer mal wieder auf ein Mittagessen in irgendeiner Kantine treffen.

Und natürlich: Meine Familie plus Pierre. Meine Eltern sowie meine Geschwister Ursula und Jan haben mich bis hierher gebracht und mir diese Ausbildung ermöglicht! Alle zusammen habt ihr euch mitgeföhrt und mitgeärgert, ihr habt mich angeschoben und zu den richtigen Zeitpunkten zur Ruhe ermahnt. Ich danke euch sehr für Rücken- und Gegenwind!