

# Entwicklung lentiviraler Vektoren für die B-zellspezifische Expression von Transgenen *in vivo*

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von  
Karin Nopora  
aus München

München,  
15. Dezember 2009

Erstgutachterin:

Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Charles N. David

Betreuer der Arbeit:

Prof. Dr. Thomas Brocker  
(Sondergutachter)

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Januar 2010

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit flossen in folgende Publikationen ein:

Nopora, K., Brocker T. (2010). “B-cell specific gene expression mediated by lentiviral vectors”, *Manuskript in Vorbereitung*.

Nopora, K., Marconi P., Brocker T. (2010). “Crosspresentation is an evolutionary consequence of viral immune subversion”, *Manuskript in Vorbereitung*.



<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
3.1	EINFÜHRUNG IN DAS IMMUNSYSTEM .....	10
3.1.1	<i>Die Entwicklung der T-Zellen.....</i>	<i>11</i>
3.1.2	<i>T-Zellfunktion .....</i>	<i>12</i>
3.1.3	<i>Die Entwicklung der B-Zellen .....</i>	<i>14</i>
3.1.4	<i>B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen .....</i>	<i>17</i>
3.2	GENTRANSFER DURCH RETROVIRALE VEKTOREN .....	18
3.2.1	<i>Struktur und Replikationszyklus der Retroviren .....</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Gammaretrovirale Vektoren.....</i>	<i>21</i>
3.2.3	<i>Induzierbare gammaretrovirale Vektoren .....</i>	<i>23</i>
3.3	LENTIVIRALE VEKTOREN .....	25
3.3.1	<i>Struktur und Replikationszyklus der Lentiviren am Beispiel von HIV-1.....</i>	<i>26</i>
3.3.2	<i>Gentransfer durch lentivirale Vektoren.....</i>	<i>27</i>
3.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
4.1	MATERIAL.....	30
4.1.1	<i>Antikörper.....</i>	<i>30</i>
4.1.2	<i>Chemikalien.....</i>	<i>31</i>
4.1.3	<i>Geräte .....</i>	<i>31</i>
4.1.4	<i>Lösungen und Medien.....</i>	<i>31</i>
4.1.5	<i>Mausstämme .....</i>	<i>35</i>
4.1.6	<i>Peptide, Proteine und Oligonukleotide.....</i>	<i>36</i>
4.1.7	<i>Vektoren.....</i>	<i>36</i>
4.1.8	<i>Verbrauchsmaterialien .....</i>	<i>37</i>
4.2	METHODEN .....	38
4.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden .....</i>	<i>38</i>
4.2.2	<i>Zell- und immunbiologische Methoden.....</i>	<i>43</i>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
5.1	ENTWICKLUNG B-ZELLSPEZIFISCHER LENTIVIRALER VEKTOREN.....	57
5.2	SYSTEMISCHE ANWENDUNG LENTIVIRALER VEKTOREN .....	63
5.2.1	<i>Expressionsanalyse des Reportergens GFP nach systemischer Anwendung.....</i>	<i>63</i>
5.3	B-ZELLSPEZIFISCHE EXPRESSION EINES MODELLANTIGENS IN VIVO .....	69
5.3.1	<i>Stimulation antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen .....</i>	<i>72</i>
5.3.2	<i>Stimulation des endogenen T-Zellrepertoires.....</i>	<i>76</i>
5.3.3	<i>Antikörper-Antwort nach lentiviraler Immunisierung .....</i>	<i>79</i>
5.4	ENTWICKLUNG EINES INDUZIERBAREN GAMMARETROVIRALEN VEKTORSYSTEMS .....	80
5.4.1	<i>Untersuchung von unspezifischer Hintergrundexpression und Induzierbarkeit der Genexpression.....</i>	<i>82</i>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>87</b>
6.1	ENTWICKLUNG B-ZELLSPEZIFISCHER LENTIVIRALER VEKTOREN.....	87
6.2	SYSTEMISCHE ANWENDUNG LENTIVIRALER VEKTOREN .....	89
6.2.1	<i>Stimulation eines transgenen bzw. polyklonalen CD8<sup>+</sup>T-Zellrepertoires.....</i>	<i>91</i>
6.2.2	<i>Antikörperantwort nach lentiviraler Immunisierung .....</i>	<i>95</i>
6.3	ENTWICKLUNG EINES INDUZIERBAREN RETROVIRALEN VEKTORSYSTEMS.....	97
6.4	SCHLUSSBETRACHTUNGEN .....	103
<b>7</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>119</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>121</b>
<b>10</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>123</b>

## 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> ) oder <i>Allophycocyanin</i> in Zusammenhang mit der Durchflusszytometrie
BCR	B-Zellrezeptor ( <i>B cell receptor</i> )
CD	Oberflächenantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
CMV	Cytomegalovirus
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidylester
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DOX	Doxycyclin
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter ( <i>fluorescence activated cell sorter</i> )
FBS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
Fc, FcR	Fc-Rezeptor ( <i>Fragment crystallizable</i> ),
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanate</i>
5-FU	5-Fluoro-Uracil
HIV	Humanes Immundefizienzvirus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HSPC	hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen ( <i>hematopoietic stem and progenitor cells</i> )
HSV	Herpes Simplex Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- $\alpha\beta$	Interferon- $\alpha\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
i.v.	intravenös
kb, kbp	Kilobasen, Kilobasenpaare
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	lange terminale Wiederholung ( <i>long-terminal repeat</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MLV	Maus Leukämie Virus
MOI	Vielzahl der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
OD	Optische Dichte
OVA	Hühnerei-Albumin
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>buffered saline solution</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlophyll-a Protein

PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Transaktivator
rtetR	reverses Tetracyclin Repressor-Protein
SA	Streptavidin
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
SIN	selbst-inaktivierend ( <i>self-inactivating</i> )
SIINFEKL	OVA <sub>257-264</sub>
s.c.	subkutan ( <i>subcutaneous</i> )
TCR	T-Zellrezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TD	T-zellabhängig ( <i>T dependent</i> )
tetO	tet-Operatorsequenz
Th1	T-Helferzelle 1
Th2	T-Helferzelle 2
Th17	T-Helferzelle 17
Tfh	follikuläre T-Helferzelle
TI	T-zellunabhängig ( <i>T independent</i> )
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TU	transduzierende Einheiten ( <i>transducing units</i> )
TfrOVA	membranständiges OVA (Transferrin-OVA)
Treg	regulatorische T-Zelle
Ubi	Ubiquitin
UV	Ultraviolettes Licht
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein G</i>
v/v	Volumen pro Volumen
vs	versus
WPRE	posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers ( <i>woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element</i> )
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

Angegeben sind Abkürzungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten und Aminosäuren entsprechend ihres Einbuchstabenkodes abgekürzt. Für die Abkürzungen gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde gemäß Duden verfahren.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Der Transfer von Genen ist eine unverzichtbare Methode für die Erforschung von Genfunktionen *in vivo*, für die gezielte Expression von Proteinen oder RNA-Molekülen, sowie für die Entwicklung von Gentherapien z.B. gegen Krebserkrankungen oder genetische Defekte. Gerade unter gentherapeutischen Gesichtspunkten sind virale Gentransfervektoren von Interesse, mit deren Hilfe beispielsweise fehlende bzw. eingeschränkte Genfunktionen wiederhergestellt werden können. Ebenso vorstellbar ist der Einsatz viraler Vektoren für Immunisierungen, die z.B. zur Auslösung tumorspezifischer zellulärer Immunantworten führen.

Wünschenswert ist in diesem Zusammenhang besonders eine zellspezifische Expression von Transgenen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb lentivirale Vektoren entwickelt, mit deren Hilfe eine konstitutive Genexpression in B-Zellen ermöglicht wurde. Die Beschränkung der Genexpression auf B-Zellen wurde durch die Wahl eines entsprechenden zellspezifischen Promotors gewährleistet. Lentivirale Vektoren haben sich in jüngster Zeit zu interessanten Werkzeugen für die Gentherapie sowie zu vielversprechenden Vakzinkandidaten entwickelt. Mit Hilfe dieser Gentransfervektoren können zahlreiche verschiedene Zelltypen, darunter auch hämatopoetische Zellen einschließlich der Immunzellen, *in vitro* und *in vivo* transduziert werden, wobei die Spezifität der Antigenexpression auf der Wahl eines entsprechenden Promotors beruht.

Als Transgene wurden das verbesserte grün-fluoreszierende Protein eGFP (*enhanced green fluorescent protein*; im Folgenden als „GFP“ bezeichnet) und das Hühnerei-Albumin (im Folgenden als „OVA“ bezeichnet) exprimiert. Anhand umfangreicher Analysen der GFP-Expression in Knochenmarkschimären konnte die B-Zellspezifität der generierten Vektoren überprüft werden. Desweiteren wurden die lentiviralen Vektoren auch systemisch (intravenös) angewandt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Spezifität der Genexpression mit dieser Applikationsroute erhalten bleibt, wohingegen die Expressionsstärke im Vergleich zu den Chimären erheblich zurückgeht. Funktionelle Studien mit B-zellspezifischen, OVA-kodierenden lentiviralen Vektoren konnten jedoch belegen, dass die Expressionsstärke nach systemischer Anwendung noch ausreichend war, um eine OVA-spezifische zelluläre Immunität zu stimulieren. Damit erwies sich das System auch hinsichtlich möglicher therapeutischer Anwendungen, z.B. als Vakzine, als funktionell. Eine humorale Antikörperantwort gegen virale Hüllproteine bzw. gegen OVA konnte nicht

nachgewiesen werden. Zusammenfassend belegen diese Daten, dass die systemische Anwendung B-zellspezifischer lentiviraler Vektoren möglich ist und einen interessanten Ansatz zur Generierung neuer Vakzine bieten kann. Denkbar wäre beispielsweise eine Anwendung bei der Unterstützung therapeutischer Vakzinierungen.

Ein weiterer interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Rolle der B-Zelle als antigenpräsentierende Zelle, die mit Hilfe einer temporären Kontrolle der Genexpression genauer untersucht werden könnte. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch ein induzierbares gammaretrovirales Genexpressionssystem entwickelt, um ein gezieltes An- und Abschalten der Genexpression in B-Zellen zu erreichen. Die Beschränkung auf B-Zellen wurde hier ebenfalls durch die Wahl eines entsprechenden zellspezifischen Promotors gewährleistet. Detaillierte *in vivo*-Analysen des Expressionssystems in Knochenmarkschimären zeigten jedoch, dass es einerseits nach Induktion nur zu einer schwachen Transgenexpression kam und es andererseits eine unerwünschte Hintergrundexpression sowohl in B-Zellen als auch in Nicht-B-Zellen gab. Aus diesen Gründen musste von der Anwendung dieses Systems für geplante Studien zur Rolle der Genexpression während verschiedener Stadien der B-Zellentwicklung abgesehen werden.

### 3 EINLEITUNG

#### 3.1 Einführung in das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus durch eine Vielzahl von Mechanismen vor Krankheitserregern wie eindringenden Mikroorganismen, Parasiten oder Viren. Dabei lassen sich die verschiedenen Funktionen in zwei Hauptbereiche gliedern: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem verfügt zwar nur über ein begrenztes Spektrum an Rezeptoren zur Antigenerkennung, doch es zeichnet sich durch seine schnelle Wirkungsweise aus, da es auf angeborenen Effektormechanismen beruht, mit deren Hilfe eindringende Mikroorganismen effizient eliminiert werden können. Dies beginnt bereits bei physikalischen Barrieren, wie z.B. den Epithelien der Haut und der Schleimhäute, die das Eindringen von Krankheitserregern u.a. durch die Sekretion von antimikrobiellen Enzymen und Peptiden erschweren. Sobald Bakterien, Viren oder Parasiten in den Körper eingedrungen sind, sehen sie sich Makrophagen gegenüber, die mit ihren zahlreichen Oberflächenrezeptoren eine Reihe verschiedener Pathogene erkennen und phagozytieren können. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR), mit deren Hilfe z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) oder Peptidoglykane erkannt werden. Die Aktivierung von Makrophagen durch die Aufnahme von Mikroorganismen führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die zusätzlich das Komplementsystem aktiviert und phagozytierende Neutrophile anlockt. Häufig wird so bereits die Entstehung einer Infektion verhindert. Gelingt dies jedoch nicht, muss das erworbene Immunsystem eingeschaltet werden. Dieses zeichnet sich durch eine spezifische Erkennung und Bekämpfung von Fremdartigen sowie durch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses aus, das häufig Schutz vor wiederholten Infektionen mit demselben Pathogen bietet. Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sowie deren Funktionen stehen nicht sofort zur Verfügung, sondern müssen erst induziert werden, was einige Tage in Anspruch nimmt. Eine wichtige Rolle spielen die antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs), wie dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs), Makrophagen und B-Zellen, die in den Blut- und Lymphgefäßen des Körpers zirkulieren, Antigene aufnehmen und sie in kleinere Peptidstücke prozessieren. Diese werden dann auf ihrer Oberfläche im Kontext der Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I oder II Moleküle (*major histocompatibility complex*, MHC I oder MHC II) antigenspezifischen

CD8<sup>-</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup>T-Zellen präsentiert, wodurch meist zytotoxische Immunantworten zur Bekämpfung intrazellulärer Mikroorganismen induziert werden.

Im Falle einer Aktivierung von CD4<sup>+</sup>T-Zellen können aber auch humorale Immunantworten unterstützt werden.

Die humorale Immunantwort wird von B-Zellen vermittelt und richtet sich mit der Bildung von Antikörpern hauptsächlich gegen extrazelluläre Pathogene. Sowohl B-Zellen als auch T-Zellen verfügen auf ihrer Oberfläche über zahlreiche Antigenrezeptoren, mit deren Hilfe sie eine nahezu unbegrenzte Anzahl möglicher Antigene erkennen können.

### 3.1.1 Die Entwicklung der T-Zellen

T-Zellen entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark, die bereits früh in den Thymus wandern, wo sie den Großteil ihrer Entwicklung zu reifen T-Lymphozyten durchlaufen. Der Thymus lässt sich in zwei Hauptbereiche gliedern: den peripheren Kortex und die zentrale Medulla. In diesen Kompartimenten durchlaufen die T-Zellen eine Reihe von Entwicklungsstadien, die auch durch die differentielle Expression verschiedener Korezeptormoleküle (CD4 und CD8) auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet sind. Am Ende dieser Entwicklung steht die Expression eines funktionellen T-Zellrezeptors (*T cell receptor*, TCR) [Marrack and Kappler, 1987; von Boehmer et al., 1989]. Die Reifung beginnt im Kortex, wo die Thymozyten zunächst als doppelt-negative Vorläuferzellen vorliegen. Zu Beginn dieses Stadiums wird die  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors durch Rearrangement der entsprechenden Gensegmente gebildet. Ein erfolgreiches Genrearrangement, das zur Expression eines funktionellen Proteins führt, dient der Zelle als Signal um in die nächste Entwicklungsstufe einzutreten. Dies ist in diesem Fall die Bildung des Prä-TCR, bestehend aus der  $\beta$ -Kette und einer vorläufigen  $\alpha$ -Kette, sowie die Expression der Korezeptormoleküle CD4 und CD8. Nun beginnen die doppelt-positiven Thymozyten die  $\alpha$ -Kette zu rearrangieren und den vollständigen TCR auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Letztendlich wird nur eines der beiden Korezeptormoleküle zusammen mit dem TCR exprimiert, was eine Einteilung in CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>T Zellen erlaubt [Haas and von Boehmer, 1984; Swain, 1983]. Thymozyten, die Peptide im Kontext des MHC I Moleküls erkennen, exprimieren CD8, während Thymozyten, die Peptide im Kontext von MHC II binden, CD4 auf ihrer Oberfläche tragen [Zinkernagel, 1974]. Die wichtige

Aufgabe des T-Zellrezeptors ist es, Antigene, die von antigenpräsentierenden Zellen im Kontext der MHC-Moleküle präsentiert werden, zu erkennen und die nötige Signalweiterleitung innerhalb der T-Zelle zu ermöglichen. Im Zuge der positiven Selektion wird die Fähigkeit des TCRs zur Erkennung und niedrig-affinen Bindung von MHC-Selbstpeptid Komplexen überprüft [Sprent & Webb, 1995]. Nach erfolgreicher positiver Selektion der Thymozyten erfolgt der Übergang vom doppelt-positiven zum einfach-positiven Stadium. Die T-Zellen wandern nun vom Kortex in die Medulla, wo der nächste Selektionsprozess stattfindet. Die sogenannte negative Selektion soll verhindern, dass T-Zellen, die Selbstantigene erkennen, in die Peripherie entlassen werden und so möglicherweise Autoimmunerkrankungen auslösen [Kappler *et al.*, 1987; Kisielow *et al.*, 1988]. Durch die verschiedenen Genumlagerungsprozesse während der Entwicklung der Thymozyten können theoretisch zwischen  $10^{15}$  und  $10^{18}$  verschiedene Spezifitäten des TCR erzeugt werden [Haars *et al.*, 1986]. Einerseits wird durch diese hohe Diversität sichergestellt, dass die peripheren T-Lymphozyten möglichst viele verschiedene Fremdantigene erkennen, andererseits birgt die ungerichtete Rekombination aber auch die Gefahr der Bildung autoreaktiver T-Zellen. Diese potenziellen autoreaktiven Zellen werden im Thymus durch Apoptose eliminiert [Kyewski and Derbinski, 2004]. Die Stärke des Signals, die ein Thymozyt während positiver und negativer Selektion durch den TCR erhält, ist für seine weitere Entwicklung von entscheidender Bedeutung, da beide Selektionsprozesse prinzipiell mit Hilfe derselben MHC-Selbstpeptid Komplexe ablaufen. Das Modell der differentiellen Avidität geht davon aus, dass eine schwache bis mittlere Bindungsstärke des TCR zu positiver Selektion führt, wohingegen Interaktionen zwischen TCR und MHC-Komplex mit hoher Bindungsaffinität zur negativen Selektion führen [Sprent *et al.*, 1988; Ashton-Rickardt *et al.*, 1994; Giraio *et al.*, 1997; Sebzda *et al.*, 1994]. Die Thymozyten verbringen schätzungsweise 12 Tage in der Medulla, bevor sie als reife, naive T-Zellen den Thymus verlassen [Egerton, 1990].

#### **3.1.2 T-Zellfunktion**

Sobald die Thymozyten ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen haben, zirkulieren sie als reife naive T-Zellen im Blut und wandern auf der Suche nach Antigen in die verschiedenen peripheren Lymphorgane ein. Um an einer adaptiven Immunantwort

mitwirken zu können, muss eine naive T-Zelle zunächst ihr spezifisches Antigen als Peptid : MHC-Komplex auf der Oberfläche von sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*professional antigen presenting cells*, pAPC) erkennen und weitere kostimulatorische Signale erhalten. Dies führt zur Aktivierung und klonalen Expansion der T-Zelle. In diesem Zusammenhang spielen dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen als pAPCs eine wichtige Rolle. Sie präsentieren für CD8<sup>+</sup>T-Zellen endogene Antigene über MHC I und exogene Antigene im Kontext von MHC II für CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Die beiden T-Zellpopulationen erfüllen im Verlauf einer adaptiven Immunantwort ganz unterschiedliche Aufgaben. CD8<sup>+</sup>T-Zellen entwickeln sich zu zytotoxischen Effektorzellen, die die Eliminierung infizierter oder entarteter Körperzellen einleiten. Naive CD4<sup>+</sup>T-Zellen dagegen können sich nach Aktivierung zu verschiedenen Effektorzelltypen entwickeln. Dazu gehören die klassischen T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) und 2 (Th2), sowie die erst in neuerer Zeit beschriebenen Th17-Zellen, die folliculären T-Helferzellen (Tfh) sowie die induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg). Die Entscheidung, in welche Richtung die Differenzierung verläuft, fällt bereits früh nach dem ersten Antigenkontakt und wird hauptsächlich durch das lokale Zytokinmilieu beeinflusst. In gewissem Maße scheint auch die Bindungsstärke zwischen TCR und Antigen dabei eine Rolle zu spielen [Boyton and Altmann, 2002]. So werden in Gegenwart von IL-12 und INF- $\gamma$  Th1 Antworten bevorzugt, wohingegen die Sekretion von IL-4 zur Ausbildung des Th2 Phänotyps führt. Während Th1-Zellen hauptsächlich Makrophagen aktivieren und damit die zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Mikroorganismen unterstützen, sind vor allem Th2-Zellen in der Lage, Signale an B-Zellen zu übermitteln, und spielen damit eine Rolle bei der humoralen Immunantwort.

Werden nach einer Infektion überwiegend IL-6 und TGF- $\beta$  von APCs sekretiert, entwickeln sich bevorzugt Th17-Zellen, welche durch die Produktion von IL-17 und IL-22 zur Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze vor allem auf Schleimhäuten beitragen. In Anwesenheit von TGF- $\beta$  können sich naive CD4<sup>+</sup>T-Zellen aber auch zu iTregs entwickeln, die, anders als die klassischen thymusabhängigen Treg-Zellen, in der Peripherie entstehen [Josefowicz and Rudensky, 2009]. Ihnen wird beispielsweise eine Rolle bei der Unterdrückung von Th1 und Th2 Immunantworten zugeschrieben [Kim et al., 2007].

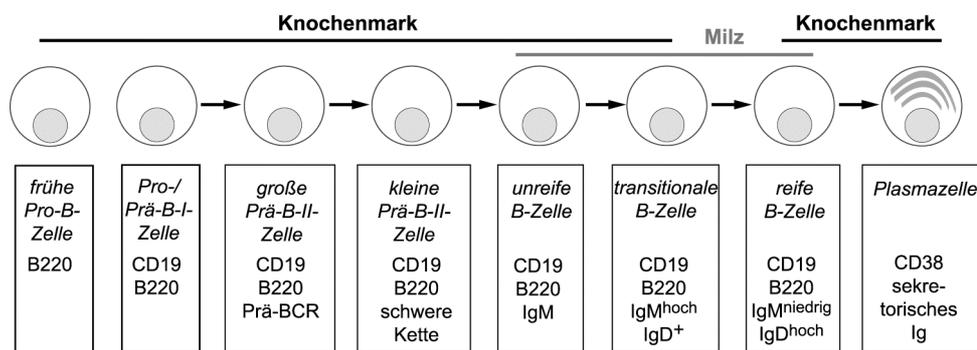
Tfh-Zellen schließlich stellen eine Population der T-Helferzellen dar, die die Reifung von B-Zellantworten regulieren. Zur Differenzierung dieser Zellen wird das Zytokin IL-21 benötigt [Vogelzang *et al.*, 2008] und möglicherweise auch der Transkriptionsfaktor Bcl-6 [Fazilleau *et al.*, 2009].

### 3.1.3 Die Entwicklung der B-Zellen

B-Zellen entwickeln sich schrittweise aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und werden später in der Milz zu reifen B Zellen, die die wichtigsten Effektorzellen der humoralen Immunantwort darstellen. Mit ihrem membrangebundenen Antikörpermolekül, dem B-Zellrezeptor (*B cell receptor*, BCR) können sie Antigene in ihrer nativen Form erkennen und nach Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle große Mengen von Antikörpern derselben Spezifität sekretieren. Der B-Zellrezeptor besteht aus je zwei identischen Polypeptidketten, deren Sequenz durch Genumlagerungsvorgänge erzeugt wurde [Tonegawa, 1983]. Während ihrer Entwicklung im Knochenmark durchlaufen sie, analog den T-Zellvorläufern im Thymus, Selektionsprozesse, die sowohl die Funktionalität als auch die Selbst-Toleranz gewährleisten. Als unreife B-Zellen verlassen sie das Knochenmark und wandern in periphere lymphatische Organe, wie beispielsweise die Milz, wo die Entwicklung zu reifen B-Zellen stattfindet. Begegnen sie nun Antigen, das durch ihren BCR erkannt wird, können sie aktiviert werden und anschließend Antikörper, die sekretierte Form des BCR mit identischer Spezifität, in großen Mengen produzieren. Auch sind B-Zellen in der Lage, sich zu langlebigen Gedächtniszellen zu entwickeln, die im Falle eines erneuten Auftretens des gleichen Antigens sofort massiv hochspezifische Antikörper sekretieren können.

Die verschiedenen Entwicklungsstadien auf dem Weg von der pluripotenten Vorläuferzelle zur reifen B-Zelle wurden in den vergangenen Jahrzehnten detailliert untersucht und lassen sich jeweils durch eine distinkte Expression von Oberflächenmarkern phänotypisch voneinander unterscheiden [Ishihara *et al.*, 1991; Rolink *et al.*, 1995; Winkler *et al.*, 1995]. In der Maus entwickeln sich B-Zellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen in der fötalen Leber, bzw. nach der Geburt im Knochenmark. Aus diesen Stammzellen bilden sich zunächst verschiedene multipotente Vorläufer (*multipotent progenitor cell*, MPP; *earliest lymphoid progenitor*, ELP; *common lymphoid progenitor*, CLP), aus denen neben

B-Zellen auch andere Zelltypen entstehen können [Spangrude *et al.*, 1988]. Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung spielen dabei die Stroma-Zellen des Knochenmarks, die einerseits mit Hilfe spezifischer Adhäsionsmoleküle Kontakt zu den B-Zellen haben und andererseits Faktoren produzieren, die für ihre Entwicklung und Reifung von Bedeutung sind. Dazu gehören lösliche und membrangebundene Zytokine und Chemokine, wie z.B. IL-7, IL-11, Stammzellen-Faktor (*stem cell factor*, SCF) und Flt3L [Adolfsson *et al.*, 2001; McKenna and Morrissey, 1998].



**Abb. 2.1: Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark und in der Milz.** Die B-Zellen stammen von einer hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark ab und differenzieren über das Pro-B- und Prä-B-Zellstadium zu unreifen und transitionalen B-Zellen. Die unreifen und transitionalen B-Zellen wandern zur Milz und entwickeln sich dort zu reifen B-Zellen, welche durch das Blut, Knochenmark und die Lymphe zirkulieren. Binden reife B-Zellen mit ihrem B-Zellrezeptor ihr spezifisches Antigen, so werden sie aktiviert und differenzieren zu Plasmazellen, die große Mengen des spezifischen Antikörpers sezernieren. Die unterschiedlichen Entwicklungsstufen können anhand der differentiellen Expression bestimmter Marker wie B220, CD19, IgM und IgD unterschieden werden.

Ab dem späten CLP-Stadium können nur noch B-Zellen gebildet werden und hier entsteht auch mit der frühen Pro-B-Zelle der erste „echte“ B-Zellvorläufer [Li *et al.*, 1996]. Einer der frühesten Oberflächenmarker der B-Zelllinie ist CD19, ein Mitglied der Ig-Superfamilie, Signaltransduktionsmolekül und Teil des B-Zell-Korezeptors. CD19 ist mit Ausnahme terminal differenzierter Plasmazellen während der gesamten B-Zellentwicklung (Tab. 2.1) in Mensch und Maus vom Pro-/Prä-B-Zellstadium an exprimiert [Nadler *et al.*, 1983; Sato *et al.*, 1997; Tedder and Isaacs, 1989]. Typischerweise beginnen im Stadium der frühen Pro-B-Zelle die Umlagerungen der Immunglobulingene, die letztlich zur Bildung eines funktionellen BCR führen. Der Prozess beginnt mit der D<sub>H</sub> zu J<sub>H</sub> Umlagerung und wird durch Verknüpfung von V<sub>H</sub> mit DJ<sub>H</sub> im späten pro B-Zellstadium fortgesetzt. Erst im Falle einer produktiven Umlagerung, die zu Expression einer schweren

Kette führt, kann der sogenannte pre-BCR bestehend aus zwei identischen schweren Ketten, im Komplex mit zwei sogenannten Ersatz-L-Ketten (*surrogate light chain*, SLC) sowie  $Ig\alpha$  und  $Ig\beta$  exprimiert werden [Sanchez et al., 1993]. Mit der Oberflächenexpression des pre-BCR erhält die sich entwickelnde B-Zelle das Signal [Meffre et al., 2000; Niirö and Clark, 2002], die Umlagerungen des V-Lokus der schweren Kette zu beenden und zu proliferieren [Cancro and Kearney, 2004; Nussenzweig et al., 1987]. Nach der Expression des pre-BCR und Proliferation fährt die pre-B-Zelle mit Umlagerungen im V-Locus der leichten Kette fort. Sind diese ebenfalls erfolgreich, kann nun der vollständige BCR exprimiert werden. Gleichzeitig verläßt die unreife B-Zelle das Knochenmark. Der Isotyp des exprimierten BCR ist dabei zum Großteil IgM, jedoch exprimieren unreife B-Zellen ebenfalls IgD. Dies wird durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts möglich, welches sowohl die Sequenz für die konstante Region des IgM- als auch des IgD-Isotyps enthält [Liu et al., 1980].

Um potentiell autoreaktive Zellen zu eliminieren, werden die B-Zellen während ihrer Entwicklung zwei Selektionsprozessen unterzogen. Der erste findet in Prä-B-II-Zellen statt und soll gewährleisten, dass nur jene Zellen expandieren und die leichte Kette rearrangieren können, welche eine produktive Umordnung der schweren Kette im Leseraster haben und folglich einen Prä-B-Zellrezeptor exprimieren können. Der zweite Selektionsprozess findet in unreifen und transitionalen B-Zellen statt. Da durch die somatische Rekombination der für die schwere und leichte Kette kodierenden Gensegmente eine Vielfalt von unterschiedlichen B-Zellrezeptoren entsteht, müssen diese auf ihre Autoreaktivität (negative Selektion) überprüft werden. Daher werden autoreaktive B-Zellen bereits im Knochenmark klonal deletiert [Hartley et al., 1991; Murakami et al., 1992; Nemazee and Burki, 1989]. Alternativ können diese ihren B-Zellrezeptor durch sekundäre Rearrangements der leichten Kette editieren [Radic et al., 1993; Tiegs et al., 1993], mit dem Ziel ein nicht autoreaktives Rezeptormolekül zu generieren. Aufgrund eines nicht funktionellen (positive Selektion) oder autoreaktiven (negative Selektion) B-Zellrezeptors sterben 70 % aller täglich produzierten B-Zellen durch Apoptose [Deenen et al., 1990; Melchers et al., 1993; Osmond, 1993]. Doch auch nach Verlassen des Knochenmarks können autoreaktive B-Zellen noch toleriert werden. Schätzungsweise  $1 - 2 \times 10^7$  neu gebildete B-Zellen verlassen täglich das Knochenmark und ebensoviele sterben in der Peripherie. Abgesehen von Phasen einer adaptiven Immunantwort bleibt der Pool

peripherer reifer B-Zellen lebenslang stabil [Rathmell, 2004]. Es werden also hauptsächlich die unreifen peripheren B-Zellen eliminiert, welche eine durchschnittliche Lebensdauer von drei Tagen haben. Bekommen die Zellen innerhalb dieses Zeitraumes keinen Zugang zu einem Follikel der peripheren lymphatischen Organe, erhalten sie nicht die notwendigen Überlebenssignale. Wenn die neu gebildeten B-Zellen jedoch in ein Follikel gelangen und dort positiv selektioniert werden, können sie als reife naive B-Zellen mit einer Lebensspanne von 3 – 8 Wochen in der Peripherie rezirkulieren [Levine *et al.*, 2000; Rolink *et al.*, 2002].

Gemäß des beschriebenen Schemas entwickeln sich follikuläre B-Zellen sowie die B-Zellen der marginalen Zone der Milz. Funktionell erfüllen diese beiden Populationen unterschiedliche Aufgaben. Follikuläre B-Zellen tragen hauptsächlich zu Thymus-abhängigen (*thymus dependent*, TD) Immunantworten bei, die in Keimzentren von Milz und Lymphknoten stattfinden. B-Zellen der marginalen Zone hingegen sind für Thymus-unabhängige (*thymus independent*, TI) Immunantworten verantwortlich. Sie können im langsam fließenden Blutstrom des marginalen Sinus der Milz bakterielle Krankheitserreger detektieren und auch ohne Beteiligung des BCR große Mengen IgM sekretieren [Allman and Pillai, 2008; Zandvoort and Timens, 2002]. Aufgrund einer starken Expression von kostimulatorischen Molekülen wie B7.1 und B7.2 können sie jedoch auch zu TD-Immunantworten gegen diese Antigene beitragen [Oliver *et al.*, 1999; Pillai *et al.*, 2004].

Im Peritoneum und Pleuraraum existiert eine weitere B-Zellpopulation, die B-1-B-Zellen, welche in der fötalen Leber gebildet werden und vermutlich die adulte Milz zu ihrer Generierung oder zum Überleben benötigen [Kretschmer *et al.*, 2004; Wardemann *et al.*, 2002]. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen B-Zellpopulationen produzieren diese sogenannte natürliche Antikörper, d.h. Antikörper welche maßgeblich vom Subtyp IgM sind, mehrere ähnliche Antigene mit niedriger Affinität erkennen und damit die erste Verteidigungslinie bei einer Infektion darstellen, bevor die humorale Antwort nach etwa einer Woche greift.

### **3.1.4 B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen**

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, entwickeln sich B-Zellen schrittweise aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und später in der Milz zu reifen B-

Zellen, die die wichtigsten Effektorzellen der humoralen Immunantwort darstellen. Mit ihrem membrangebundenen Antikörpermolekül, dem B-Zellrezeptor, können sie Antigene in ihrer nativen Form erkennen und nach Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle große Mengen von Antikörpern derselben Spezifität sekretieren. B-Zellen wirken auch als pAPCs, sind dabei aber weniger effizient als Makrophagen und DCs. Dies hat verschiedene Gründe, z.B. die geringe Frequenz antigenspezifischer naiver B-Zellen, ihr Fehlen in Haut und Schleimhäuten und ihre Abhängigkeit von Aktivierung durch CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Dennoch sind B-Zellen in der Lage, selbst geringe Mengen Fremdartigen zu konzentrieren und effizient zu präsentieren, was zur Aktivierung oder – bei fehlender Kostimulation – zur Tolerisierung von T-Zellen führen kann. Gebundenes Antigen wird von der B-Zelle zusammen mit dem BCR über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und gelangt zunächst in Endosomen, die später mit MHC II enthaltenden Vesikeln fusionieren. Es folgt die Beladung der MHC II Moleküle mit Peptiden und der Transport der MHC : Peptidkomplexe zur Zelloberfläche.

Generell muss die Antigenerkennung durch naive T-Zellen nicht notwendigerweise zur Induktion einer adaptiven Immunantwort führen. Abhängig davon, ob zusätzliche kostimulatorische oder inhibitorische Signale zum Zeitpunkt der Antigenerkennung übermittelt werden, kann es auch zu Anergie oder abortiver Proliferation der T-Zellen kommen, oder zur Differenzierung von regulatorischen oder Suppressor T-Zellen [Steinman *et al.*, 2003].

### **3.2 Gentransfer durch retrovirale Vektoren**

Die langfristige und individuelle Korrektur immunologischer Defekte des Menschen ist ein ehrgeiziges Ziel der modernen Medizin. Von großem Interesse sind hier vor allem die Behandlung von Gendefekten, die gezielte Induktion von Immunantworten, z.B. gegen Tumore, die der Überwachung durch das Immunsystem normalerweise entgehen, oder auch die Induktion von Toleranz, z.B. bei fortschreitenden Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose.

Die Entwicklung viraler Vektoren für den Gentransfer hat dazu einen entscheidenden Beitrag geleistet. Verschiedene virale Systeme werden für die Gentherapie genutzt z.B. Adenoviren, Herpes Simplex Viren und Retroviren [Nienhuis, 2008]. Letztere sind in

diesem Zusammenhang besonders interessant. Es handelt sich bei Retroviren um einzelsträngige RNA-Viren, die ihre genetische Information langfristig in das Genom der Wirtszelle integrieren können. Auf Struktur und Lebenszyklus der Retroviren, sowie die Entwicklung induzierbarer retroviraler Gentransfer-Vektoren soll nun genauer eingegangen werden.

### **3.2.1 Struktur und Replikationszyklus der Retroviren**

Die Familie der Retroviren ist eine heterogene Gruppe, deren Mitglieder in sieben Genera unterteilt werden: Retroviren vom Typ B bzw. D, Alpha-, Gamma- und Deltaretroviren, Spumaviren und Lentiviren [Vogt,1997]. Die in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektoren basieren auf dem Maus Leukämie Virus (MLV) und gehören zum Genus der Gammaretroviren. Auf Lentiviren und die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit entwickelten zellspezifischen lentiviralen Vektoren wird später noch genauer eingegangen.

Ein gemeinsames Merkmal aller Retroviren ist ihre Eigenschaft, nach Infektion einer Wirtszelle das virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA revers zu transkribieren. Daher die Bezeichnung „Retro“viren. Darüber hinaus haben sie die Struktur des Virions gemeinsam. Dieses misst etwa 100nm im Durchmesser und besteht aus einem Nukleokapsid, das von einer Lipidmembran umgeben ist [Aloia *et al.*, 1988]. In dieser Membran sind virale Glykoproteine verankert, die die Bindung des Viruspartikels an Rezeptoren der Wirtszellmembran erlauben.

Das Nukleokapsid ist umgeben von Matrixproteinen und enthält zwei identische Kopien des einzelsträngigen viralen RNA-Genoms mit einer Größe von 7 bis 10 kb. Zusätzlich befinden sich im Nukleokapsid die Integrase, Reverse Transkriptase und Protease.

Das Genom besteht aus kodierenden Bereichen, die in der internen Region liegen und nichtkodierenden Bereichen, die wichtige regulatorische Signalsequenzen enthalten und sich in den terminalen Regionen befinden. Analog zur zellulären mRNA besitzt das virale Genom am 5' Ende eine Cap-Gruppe und am 3' Ende eine Polyadenylierungsstelle. Der kodierende Bereich wird von der Leitsequenz (*Leader*), die das Verpackungssignal  $\psi$  für virale RNA enthält, sowie von der Primer-Bindungsstelle (*primer binding site*, PBS), von der Poly-Purin-Sequenz (*polypurine tract*, PPT) und am 3' und 5' Ende von den langen terminal wiederholten Sequenzen (*long terminal repeat*, LTR) flankiert. Die LTR-Regionen

setzen sich aus der redundanten Region R, der U5-Region am 5' Ende und der U3-Region am 3' Ende zusammen. Die U3- und U5-Regionen enthalten Sequenzen, die für die Replikation, die Integration des Virusgenoms in das Wirtszellgenom und die Transkription des Provirus wichtig sind. Die viralen Promotor- und Enhancer-Elemente befinden sich in der U3-Region und besitzen Erkennungsmotive für die zelluläre RNA-Polymerase und zellulären Transkriptionsfaktoren [Cullen, 1991]. Für die Expression des Provirus wird die Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle genutzt.

Gammaretroviren verfügen, im Vergleich zu anderen Vertretern aus der Familie der Retroviren, wie z.B. Lentiviren, über eine recht einfache genetische Organisation des zentralen kodierenden Bereichs. Er enthält lediglich die Gene für die viralen Polyproteine Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Glykoproteine der Virushülle). Die *pro*-Region kodiert eine Protease, die für die Spaltung der Polyproteine verantwortlich ist. Aus Gag entstehen die Strukturproteine Matrix (MA), Kapsid (*capsid*, CA) und Nukleokapsid (*nucleocapsid*, NC). Pol enthält zwei Proteine, die in der frühen Phase des viralen Replikationszyklus von Bedeutung sind: die reverse Transkriptase (RT) sowie die Integrase (IN). Env schließlich wird zu zwei Glykoproteinen der Virushülle prozessiert. Das größere der beiden, das Oberflächenprotein (*surface protein*, SU), ist für die Erkennung von Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle verantwortlich. Das kleinere Transmembranprotein (TM) verankert den Proteinkomplex in der Virushülle und enthält Domänen für die Fusion viraler und zellulärer Membranen.

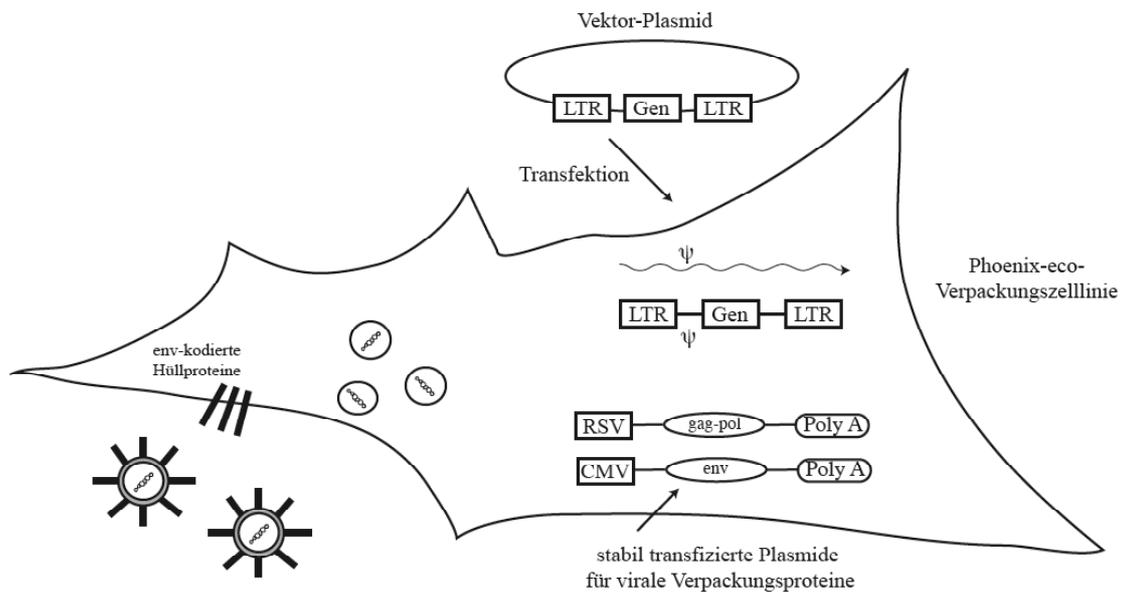
Der retrovirale Lebenszyklus kann in zwei Phasen unterteilt werden; die erste hängt von bereits existierenden viralen Proteinen und die zweite von der zellulären Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Wirtszelle ab [Coffin JM, 1997]. Es werden folgende Stadien unterschieden: 1. Infektion der Zelle, 2. reverse Transkription des viralen Genoms, 3. nukleäre Lokalisation und Integration, 4. Transkription der viralen RNA, 5. Prozessierung der RNA und Synthese viraler Proteine, und schließlich 5. Assemblierung und Freisetzung der neugebildeten viralen Partikel.

Der Rezeptor für ecotrophe Gammaretroviren, die nur murine Zellen infizieren können, ist ein basischer Aminosäuretransporter [Wang *et al.*, 1991; Weiss and Tailor, 1995]. Nach Binden des Virus an den Rezeptor fusioniert die virale Hülle mit der Zellmembran und das Nukleokapsid penetriert die Zelle. Im Zytoplasma wird das virale RNA-Genom im Nukleokapsid in doppelsträngige DNA revers-transkribiert und transloziert anschließend

mit den bereits existierenden viralen Proteinen in den Nukleus der Wirtszelle. Im Zellkern wird die virale DNA in die zelluläre DNA integriert und von diesem Zeitpunkt an als Provirus bezeichnet. Es kann dabei zu mehreren Integrationsereignissen pro Zelle kommen [Odawara *et al.*, 1998]. Das Provirus wird von der zellulären Transkriptionsmaschinerie in mRNA transkribiert. Die so gebildeten viralen Proteine verbleiben im Zytoplasma, wohingegen das Hüllprotein zur Wirtszellmembran transportiert wird. Es kommt zur Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche. Nach der Freisetzung erfolgt die Reifung zu infektiösen Viruspartikeln.

### **3.2.2 Gammaretrovirale Vektoren**

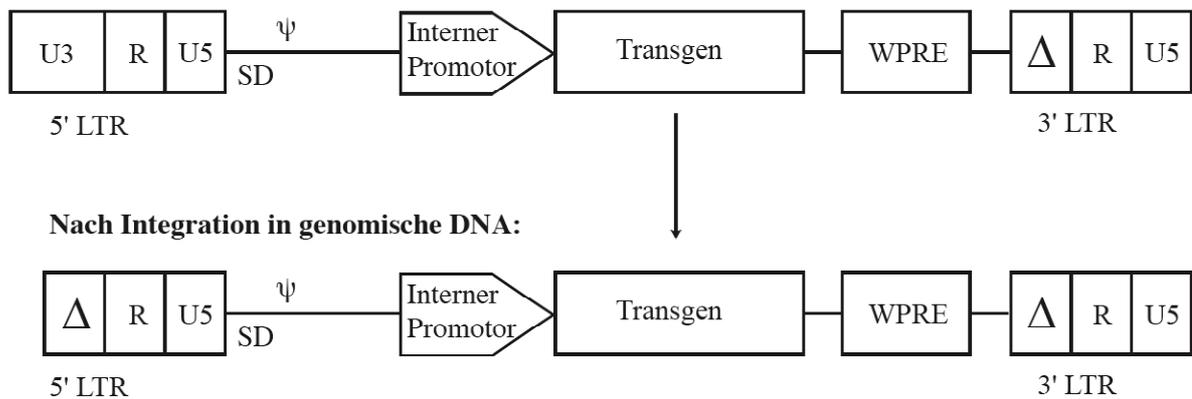
In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen eines induzierbaren Genexpressionssystems gammaretrovirale SIN-Vektoren verwendet, die auf MLV (Maus Leukämie Virus) basieren. Zur Generierung retroviraler Vektoren werden in der Regel alle kodierenden Bereiche des viralen Genoms entfernt, die nicht auf demselben Nukleinsäurestrang vorliegen müssen. Dies schafft einerseits Platz für das Einfügen nicht-viraler Gene (Transgene) und führt andererseits dazu, dass das Virus seine Fähigkeit zur Replikation verliert. Nur der 5'LTR und 3'LTR, sowie die Leitsequenz  $\psi$  mit einem kurzen Abschnitt von *gag* müssen in *cis*, d.h. auf demselben Nukleinsäurestrang vorliegen. Die Vermehrung der viralen Vektoren kann nur noch in sogenannten Verpackungszellen erfolgen. Hierbei handelt es sich um Zellen, die stabil mit zwei Plasmiden transfiziert sind, welche für verschiedene Strukturproteine kodieren (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Produktion gammaretroviraler Vektoren.** Für die Generierung gammaretroviraler Vektorüberstände werden Phoenix-eco-Verpackungszellen mit dem Vektor-Plasmid transfiziert. Virale Partikel können sich ausschließlich in Zellen vermehren, welche die von gag, pol und env kodierten Proteine exprimieren. Phoenix-eco-Verpackungszellen sind stabil mit zwei Plasmiden transfiziert, welche diese in *trans* benötigten Proteine kodieren. CMV, Promotor des Cytomegalovirus; RSV, Promotor des Rous-Sarcoma-Virus; gag, env und pol: kodieren für virale Polyproteine; LTR, lange terminale Wiederholungssequenz (*long terminal repeat*); Poly A, Polyadenylierungssignal;  $\psi$ , Verpackungssignal.

Die Trennung der kodierenden Sequenzen dieser Proteine auf zwei Plasmide minimiert die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von replikationskompetenten Viren, da dazu mindestens drei simultan und unabhängig voneinander auftretende Rekombinationsereignisse stattfinden müssten [Pear *et al.*, 1993]. Es gibt eine Vielzahl von unterschiedlichen Verpackungszellen, die sich maßgeblich im Wirtstropismus des produzierten Env unterscheiden. In dieser Arbeit wurden Phoenix-eco-Zellen verwendet, welche eine ecotrophe Hülle produzieren, d.h. die produzierten Viren können nur murine Zellen infizieren. Um infektiöse aber replikationsdefiziente Viruspartikel zu generieren, müssen Phoenix-eco-Zellen lediglich mit dem retroviralen Transfervektor transfiziert werden. Die neugebildeten Viruspartikel werden in das umgebende Zellkulturmedium abgegeben.

Weit verbreitete retrovirale Vektoren sind die sogenannten Selbst-Inaktivierenden-Vektoren (SIN). Hier wurden die in der U3-Region des 3'LTRs lokalisierten viralen Promotor- und Enhancer-Elemente deletiert (Abb. 2.3).

**Plasmid-DNA:**

**Abb. 2.3: Schematische Darstellung eines SIN-Vektors.** Die viralen Promotor/Enhancer-Elemente in der U3-Region des 3'LTR wurden deletiert. Nach reverser Transkription der viralen RNA und Integration der cDNA in das Genom der Wirtszelle steht die Expression des Transgens daher unter der Kontrolle des internen Promotors.  $\Delta$ U3; Deletion in der U3 Region (untranslatierte Region); SD, Splice Donor Stelle;  $\Psi$ , Verpackungssignal; WPRE, posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers (*woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element*).

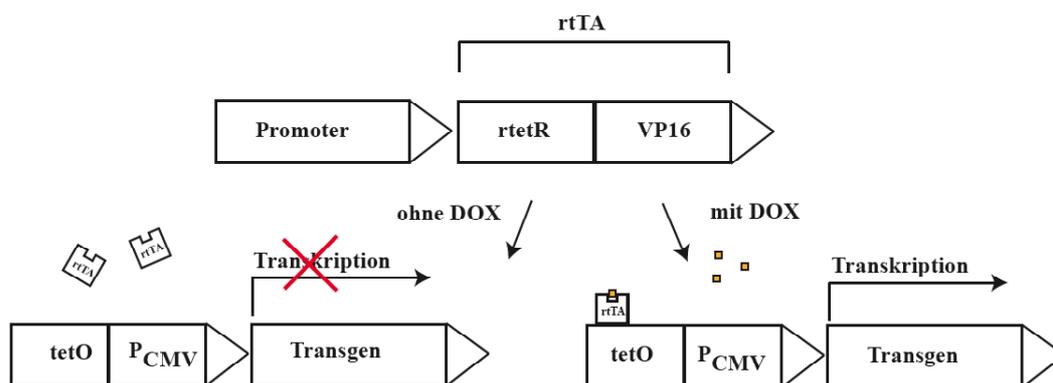
Dies bedeutet, dass virale Partikel in einer Verpackungszelle hergestellt werden können, da der 5'LTR noch intakt und funktionell ist. Nach Integration des Virus in das Genom der Wirtszelle befindet sich aufgrund des Replikationszyklus der Retroviren die Promotor/Enhancer-deletierte U3-Region des 3'LTRs auch im 5'LTR. Damit hängt die Transkription des Transgens ausschließlich von einem internen Promotor ab, der viralen oder auch zellulären Ursprungs sein kann.

### 3.2.3 Induzierbare gammaretrovirale Vektoren

Ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung viraler Vektoren ist neben der zell- oder gewebspezifischen Genexpression auch die zeitliche Kontrolle der Expression. Um dies zu erreichen, ist eine genaue Regulierung der Genexpression nötig, denn die zeitlich unangemessene Expression eines Transgens kann negative oder schädliche Effekte haben, z.B. während der Entwicklung. Induzierbare Vektorsysteme bieten die Möglichkeit einer genau regulierbaren transienten Genexpression. Seit mehr als zehn Jahren wird das sogenannte tet-System hierfür genutzt und ständig weiterentwickelt. Die Induzierbarkeit basiert auf dem Tetracyclin-Resistenzoperon von *E.coli* [Gossen and Bujard, 1992] und erlaubt im Rahmen des sogenannten Tet-on Systems die Expression eines Transgens nur in

Gegenwart des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin. Tetracycline sind kleine lipophile Verbindungen, die in eukaryontische Zellen leicht durch passive Diffusion gelangen können. Als Modulatoren der Genexpression werden sie seit Jahren in der Human- und Veterinärmedizin ohne nennenswerte Nebenwirkungen eingesetzt. Doxycyclin ist dabei das am häufigsten verwendete Tetracyclin-Derivat [Blau and Rossi, 1999; Gossen *et al.*, 1995]. Das Tet-on System besteht aus zwei regulatorischen Elementen: einem reversen Transaktivator (rtTA) und der tet-Operatorsequenz (tetO) (Abb. 2.4). Der rtTA ist ein Fusionsprotein bestehend aus dem reversen Tetracyclin-Repressorprotein (rTetR), sowie der Aktivierungsdomäne des VP16 Proteins des Herpes Simplex Virus, durch welche die Aktivierung der Transkription in Eukaryonten ermöglicht wird. TetO besteht aus sieben direkten Wiederholungen der tet-Operatorsequenz, welche mit mindestens einem minimalen viralen Promotor fusioniert sind, von dem die Transkription des nachgeschalteten Transgens ausgeht. Die bidirektionale Fusion von tetO mit einem zweiten minimalen viralen Promotor erlaubt die gleichzeitige Induktion der Expression zweier Transgene [Baron *et al.*, 1995].

Sobald Doxycyclin an den reversen Transaktivator bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung dieses Moleküls, die eine Bindung an tetO erlaubt. Dies wiederum ermöglicht die Initiation der Transkription. Die Genexpression hängt also allein von der gleichzeitigen Verfügbarkeit des Transaktivators und des Effektormoleküls Doxycyclin ab.



**Abb. 2.4: Schema der Doxycyclin-induzierbaren Genexpression.** Der reverse Transaktivator (rtTA) ist ein Fusionsprotein aus dem reversen Tetracyclin-Repressor Protein rtetR und der Aktivierungsdomäne des VP16 Proteins des Herpes Simplex Virus. rtTA bindet in Gegenwart des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin (DOX) an die tet-Operatorsequenz tetO und ermöglicht so die Transkription des Transgens, ausgehend von einem minimalen Promotor des Cytomegalovirus ( $P_{CMV}$ ). Zellspezifische Genexpression wird erreicht, wenn die

Expression von rtTA unter die Kontrolle eines entsprechenden Promotors gestellt wird. In Abwesenheit von DOX kann rtTA nicht an tetO binden und es findet keine Genexpression statt.

Eine zell- oder gewebsspezifische Genexpression wird dadurch ermöglicht, dass die Expression des rtTA unter die Kontrolle eines entsprechenden Promotors gestellt wird.

Eine genaue Regulation sowie ein hohes Maß an Expressionsaktivität wird durch die Verwendung eines dualen Vektorsystems erreicht, wobei die beiden regulatorischen Komponenten des induzierbaren Systems, rtTA und tetO, auf separaten MLV-basierten retroviralen Vektoren bereitgestellt werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit zweier unabhängig voneinander stattfindender Integrationsereignisse innerhalb einer Zelle. Theoretisch können aus der gleichzeitigen Transduktion mit beiden Vektoren vier verschiedene Zellpopulation hervorgehen: Zellen, die tatsächlich mit beiden Vektoren transduziert wurden, aber auch Zellen, die nur mit einem der beiden Vektoren transduziert wurden und untransduzierte Zellen.

Eine Alternative stellen singuläre Vektorsysteme dar, die sowohl den Transaktivator als auch die tetO-Sequenz auf einem einzigen Vektor vereinen. Man unterscheidet hier unabhängige (*self-contained*) und autoregulierte (*autoregulated*) Vektorsysteme. In Ersteren werden beide regulatorischen Komponenten von unabhängigen Promotoren exprimiert [Hwang *et al.*, 1997; Paulus *et al.*, 1996]. In den autoregulierten Vektorsystemen wird die Expression des Transaktivators über eine positive Rückkopplung kontrolliert [Unsinger *et al.*, 2001].

### **3.3 Lentivirale Vektoren**

Mit Hilfe der bereits beschriebenen gammaretroviralen Vektoren lässt sich eine effiziente und stabile Genexpression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erreichen. Ein Nachteil dieses Systems liegt jedoch u.a. darin, dass die Integration des viralen Provirus nur in das Genom teilungsaktiver Zellen erfolgen kann [Miller *et al.*, 1990]. Dies hat zur Folge, dass teilungsinaktive Zellen, wie z.B. Hepatozyten, Neuronen oder hämatopoetische Stammzellen, der gammaretroviralen Gentherapie nicht oder nur schlecht zugänglich sind. Um diesen limitierenden Faktor zu umgehen, wurden die ebenfalls zur Familie der Retroviren gehörenden lentiviralen Vektoren entwickelt, welche auch ruhende Zellen infizieren können [Lewis and Emerman, 1994]. Durch die Trennung von cis- und trans-

wirkenden viralen Elementen wurde auch hier ein größtmögliches Maß an Sicherheit für die gentherapeutische Anwendung dieser Vektoren erreicht. Die Spezifität der Genexpression beruht auf der Wahl eines entsprechenden internen Promotors.

### **3.3.1 Struktur und Replikationszyklus der Lentiviren am Beispiel von HIV-1**

Die in dieser Arbeit generierten lentiviralen Vektoren basieren auf dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV-1), das innerhalb der Familie der Retroviren zum Genus der Lentiviren gehört. Struktur und Replikationszyklus eines Lentivirus sollen im Folgenden am Beispiel des HI-Virus beschrieben werden.

Lentiviren sind den bereits beschriebenen Gammaretroviren in Struktur und Lebenszyklus sehr ähnlich, jedoch ist ihre genetische Organisation komplexer. Das HI-Virus verfügt neben den üblichen drei retroviralen Genprodukten Gag, Pol und Env, über sechs weitere: die regulatorischen Proteine Tat und Rev, sowie die vier akzessorischen Faktoren Vif, Vpr, Vpu und Nef [Frankel and Young, 1998]. Die akzessorischen Faktoren sind *in vitro* nicht essentiell für die Virusreplikation in HIV-Zielzellen. *In vivo* jedoch spielen sie eine wichtige Rolle bei der Infektion und Pathogenese von HIV-induzierten Erkrankungen [Malim and Emerman, 2008]. Das HI-Virus infiziert in erster Linie Zellen, die den CD4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, wie z.B. T-Helferzellen, Makrophagen und Gliazellen [Dalgleish et al., 1984; Maddon et al., 1986]. Chemokinrezeptoren wie CCR5 und CXCR4 fungieren als zellspezifische Korezeptoren für die Infektion von z.B. Makrophagen (CCR5) und T-Zellen (CXCR4).

Die Infektion und Replikation des HI-Virus verläuft im Prinzip nach dem bereits für Gammaretroviren beschriebenen Schema. Ein wichtiger Unterschied besteht in der Fähigkeit, sowohl teilungsaktive als auch ruhende Zellen zu infizieren. Dies erfolgt jedoch nicht bei allen Zelltypen in allen Stadien des Zellzyklus mit vergleichbarer Effizienz. Die Infektion ruhender T-Zellen ist beispielsweise sehr ineffizient. Nach der reversen Transkription des einzelsträngigen RNA-Genoms im Zytoplasma der Wirtszelle wird das entstandene doppelsträngige DNA-Molekül als Präintegrationskomplex aktiv in den Zellkern transportiert. Die Translokation erfolgt durch Interaktionen viraler Proteine wie Vpr, Matrix, Reverse Transkriptase und Integrase mit dem nukleären Importkomplex der

Wirtszelle [Heinzinger *et al.*, 1994; Trono, 1995]. Obwohl jede HIV-1 infizierte Zelle mehrere Kopien des viralen Genoms enthält, kommt es in der Regel nur zur Integration von ein bis zwei Kopien der HIV-1 DNA in das Genom der Wirtszelle [Butler *et al.*, 2001]. Bevorzugt werden hierfür transkriptionell aktive Gene. Die Integration von HIV-1 scheint somit einer stringenteren Kontrolle zu unterliegen als dies z.B. bei Gammaretroviren wie MLV der Fall ist.

### 3.3.2 Gentransfer durch lentivirale Vektoren

Auch bei lentiviralen Vektoren wurden alle trans-wirkenden genetischen Elemente entfernt, um replikationsdefiziente Viren zu generieren, die nur noch über einen 5'LTR und 3'LTR, die Leitsequenz  $\psi$ , sowie einen kurzen Abschnitt von *gag* verfügen und darüber hinaus ein oder mehrere Transgene im Kontext einer internen Transkriptionseinheit kodieren.

Die Produktion der lentiviralen Vektoren erfolgt durch transiente Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*, 293T) mit drei Plasmiden [DuBridge *et al.*, 1987]. Davon ist eines der eigentliche Transfervektor, ein weiteres fungiert als Verpackungsplasmid von dem aus die trans-wirkenden viralen Proteine exprimiert werden, und das dritte kodiert das Hüllprotein. Da HIV-1 Env-Proteine am effizientesten an die Oberfläche von CD4-positiven Zellen binden können, wird Env routinemäßig durch das Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitis Virus (*vesicular stomatitis virus glycoprotein G*, VSV-G) ersetzt, wodurch eine Infektion vieler verschiedener Zelltypen möglich wird. Lange wurde angenommen, dass VSV-G an Phosphatidylserin bindet, einer Komponente der Lipiddoppelschicht der meisten eukaryontischen Zellmembranen [Schlegel *et al.*, 1983; Schlegel and Wade, 1983]. Neuere Arbeiten kommen jedoch zu dem Ergebnis, dass VSV-G an einen noch unbekanntem zellulären Rezeptor bindet und möglicherweise erst nach der Aufnahme des Viruspartikels über rezeptorvermittelte Endozytose in Endosomen mit Phosphatidylserin interagiert [Coil and Miller, 2004].

Abhängig von der genetischen Organisation der für die Produktion verwendeten Plasmide werden lentivirale Vektorsysteme der ersten, zweiten und dritten Generation unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vektorsystem der dritten Generation verwendet, das die Generierung sogenannter lentiviraler SIN-Vektoren ermöglicht. Hier wurde, ähnlich

wie bei den bereits beschriebenen gammaretroviralen SIN-Vektoren, ein Teil der U3-Region des 3'LTR des Transfervektors deletiert, um dadurch einen inaktiven 5'LTR im integrierten Provirus zu erhalten. Dies wiederum macht die Expression eines Transgens vollständig von einem internen Promotor abhängig. Um während der transienten Transfektion der 293T-Zellen eine Wiederherstellung der deletierten U3-Region des Transfervektors durch homologe Rekombination mit dem noch intakten 5'LTR zu vermeiden, wurde die U3-Region des 5'LTR zusätzlich durch einen CMV-Promotor ersetzt [Dull *et al.*, 1998]. Das Verpackungsplasmid wurde ebenfalls attenuiert und kodiert nur noch die viralen Proteine Gag, Pol, Rev und Tat. Es konnte gezeigt werden, dass keiner der vier akzessorischen Faktoren essentiell ist für die Replikation von HIV-1 in immortalisierten Zelllinien [Miller and Sarver, 1997] oder die Produktion von lentiviralen Vektoren [Zufferey *et al.*, 1997]. Mit Hilfe dieser Modifikationen kann das Risiko der Bildung replikationskompetenter viraler Vektoren minimiert werden.

Lentivirale Vektoren wurden bereits erfolgreich für die Transduktion verschiedenster differenzierter Zelltypen und Gewebe eingesetzt, wie z.B. Neuronen, Hepatozyten, Muskelzellen und in der Retina [Kafri *et al.*, 1997; Miyoshi *et al.*, 1997; Naldini *et al.*, 1996], ebenso wie für die Transduktion noch undifferenzierter Stammzellen und Embryonen [Pawliuk *et al.*, 2001; Pfeifer *et al.*, 2002].

#### **3.4 Zielsetzung der Arbeit**

Genfunktionen werden *in vivo* klassischerweise anhand transgener Mäuse studiert, in welchen das zu untersuchende Gen überexprimiert, mutiert oder vollständig entfernt wurde. Ein alternativer Ansatz zur zeitintensiven Generierung transgener Mäuse ist der Gentransfer mit Hilfe viraler Vektoren. Vor allem für die Manipulation von Zellen des Immunsystems hat die Verwendung transduzierter Stammzellen gegenüber den klassischen transgenen Mausstämmen zwei wesentliche Vorteile. Erstens nimmt die Transduktion von HSPC und die anschließende Rekonstitution des hämatopoetischen Systems einer Knochenmarkschimäre nur sechs bis acht Wochen in Anspruch und zweitens ist diese Methode durch die Möglichkeit des Transfers therapeutischer Gene in hämatopoetische Stammzellen auch klinisch relevant.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein System zur konstitutiven B-zellspezifischen Transgenexpression *in vivo* etabliert werden. Hierfür wurden entsprechende lentivirale Vektoren entwickelt, um zunächst die Expression des Reportergens GFP in B-Zellen zu erreichen. Lentivirale Vektoren besitzen verschiedene Vorteile gegenüber anderen Vektoren aus der Familie der Retroviren, denn sie können beispielsweise teilungsinaktive Zellen transduzieren und verfügen über größere Kapazitäten für den Gentransfer.

Um die B-Zellspezifität der GFP-Expression zu überprüfen, wurden detaillierte Analysen in Knochenmarkschimären durchgeführt. Darüber hinaus wurden die lentiviralen Vektoren auch für intravenöse Immunisierungen eingesetzt, und es wurde zunächst überprüft, ob die Spezifität und Stärke der Expression des Reportergens auch mit dieser Applikationsroute erhalten bleibt. Anschließend wurde in funktionellen Studien untersucht, ob die B-zellspezifische Expression des Modellantigens OVA zur Stimulation eines TCR-transgenen T-Zellrepertoires (OT-1) sowie des endogenen CD8<sup>+</sup>T-Zellrepertoires führt. Desweiteren wurde die Bildung einer spezifischen Antikörperantwort gegen virale Hüllproteine bzw. gegen OVA nach systemischer Anwendung der viralen Vektoren überprüft.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

Die Materialien wurden alphabetisch geordnet.

#### 4.1.1 Antikörper

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper für Durchflußzytometrie und ELISA

Spezifität (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD4	PE	H129.9	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
	PerCP		
CD8	PE	53-6.7	BD Pharmingen
	PerCP		Caltag (San Francisco, CA, USA)
	APC	CT-CD8a	
CD11b	Biotin	M1/70	BD Pharmingen
CD11c	APC	HL3	BD Pharmingen
CD19	PE	1D3	BD Pharmingen
	APC		
CD21 / CD35	PE	7G6	BD Pharmingen
CD23	BIO	B3B4	BD Pharmingen
CD44	PE	IM7.8.1	Caltag
	APC	IM7	BD Pharmingen
CD45.1	Biotin	A20	BD Pharmingen
B220	FITC	RA3-6B2	BD Pharmingen
	PE		
	PerCP		
	APC		
CD62L	FITC	Mel14	BD Pharmingen
	APC		
I-A <sup>b</sup>	FITC	AF6-1201	BD Pharmingen
	PE		
IgD	PE	F(ab') <sub>2</sub>	BD Pharmingen
IgG	HRP	polyklonal	Serotec
IgM	APC	F(ab') <sub>2</sub>	Jackson Immuno-Research Inc., West Grove, PA, USA
V $\alpha$ 2 TCR	FITC	B20.1	BD Pharmingen
	PE		
	Biotin		
V $\beta$ 5.1/5.2 TCR	FITC	MR9-4	BD Pharmingen
	PE		
	Biotin		

APC-, PE- oder SA-konjugiertes Streptavidin wurde von der Firma Caltag (San Francisco, CA, USA) bezogen. Das Tetramer H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL sowie das zugehörige PE- bzw. APC-Konjugat wurde von der Firma ProImmune (Deutschland) bezogen.

#### 4.1.2 Chemikalien

Alle Lösungen und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (St. Louis, MO, USA) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist in der entsprechenden Methodenbeschreibung angegeben.

#### 4.1.3 Geräte

Brutschrank (Hera cell, von Heraeus), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Durchflusszytometer (FACSCalibur und FACSAria von Becton Dickinson), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), Lightcycler (Roche Diagnostics, Mannheim), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen), PCR-Maschine (Biometra), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Spannungsquelle (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Sterilbank (Heraeus), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg), Ultrazentrifuge (L8-70M, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA), UV-Lampe (UVC 30, Kendro, Langenselbold), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Zellzählgerät (Coulter Counter Z2, Beckman Coulter, Krefeld), Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen). Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

#### 4.1.4 Lösungen und Medien

ACK-Puffer

8,02 g Ammoniumchlorid  
 1 g Kaliumhydrogencarbonat  
 37,2 mg EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat  
 H<sub>2</sub>O ad 1 l  
 pH 7,2 – 7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch  
 0,2 µm Filter sterilfiltrieren

#### 4 MATERIAL UND METHODEN

---

Auftragspuffer BSU	21 g Harnstoff 25 g Saccharose 0,1 M EDTA 1 Spatelspitze Bromphenolblau H <sub>2</sub> O ad 50 ml
CFSE-Puffer	Dulbecco's PBS (Gibco) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 0,1 % FBS (v/v)
<u>ELISA-Puffer</u>	
10× Waschpuffer	1010 g Natriumchlorid 10 g Kaliumchlorid 10 g Kaliumdihydrogenphosphat 57,5 g Dinatriumhydrogenphosphat H <sub>2</sub> O ad 5 l
1× Waschpuffer	1 l 10×Waschpuffer 5 ml Tween 20 H <sub>2</sub> O ad 10 l
Blockierungslösung	0,05 % Natriumazid (w/v) 0,5 % Milchpulver (w/v, Applichem) PBS
Antikörperlösung	0,05 % Tween20 (v/v) 0,5 % Milchpulver (w/v)
Kaliumzitrattpuffer	42 g Zitronensäure-Monohydrat 950 ml H <sub>2</sub> O pH 3,95 mit KOH einstellen 275 µl 30 %-ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O ad 1 l  bei 4°C im Dunkeln lagern
FACS-Puffer	0,01 % Natriumazid (v/v) 2 % FBS (v/v) PBS
5-Fluorouracil	20 mg/ml in Dulbecco's PBS (Gibco) pH mit NaOH auf 10 – 11 einstellen vortexen bis vollständig gelöst pH mit HCl auf 7,5 einstellen sterilfiltrieren, bei -20°C lagern

---

MACS-Puffer	Dulbecco's PBS (Gibco) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 0,5 % FBS (v/v) 2mM EDTA
PBS	150 mM Natriumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen
RFI	15 % Glycerin (v/v) 100 mM Kaliumchlorid 50 mM Mangan-Chlorid-Tetrahydrat 30 mM Kaliumacetat 10 mM Calciumchlorid pH 5,8 mit 0,2 mM Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
RFII	15 % Glycerin 10 mM MOPS 10 mM Kaliumchlorid 75 mM Calciumchlorid pH 6,8 mit 1 N NaOH einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
50× TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml 100 % Essigsäure (Eisessig) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
<u>Transfektions-Lösungen</u> 2×HBS	50 mM HEPES 280 mM Natriumchlorid 1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat mit NaOH auf pH 7,05 einstellen sterilfiltrieren und bei -20°C lagern (≤ 6 Monate)
$\text{CaCl}_2$	2,5 M Calciumchlorid sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

### Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien und -lösungen stammten, sofern nicht anders vermerkt, von der Firma Gibco (bezogen über Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

#### HSPC-Medium

Stemline II Hematopoetic Stem Cell Expansion Medium (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
50 ng/ml hIL-6  
10 ng/ml mIL-3  
50 ng/ml mSCF

#### Phoenix-Medium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit GlutamaxI  
10 % FBS (inaktiviert, v/v)  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

#### Transfektionsmedium für Phoenix-Zellen

DMEM GlutamaxI  
10 % FBS (inaktiviert, v/v)  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
2,5 mM Chloroquine (Sigma)

#### 293FT-Medium

DMEM GlutamaxI  
10 % FBS (inaktiviert, v/v)  
10 mM Hepes  
10 mM Non-Essential Amino Acids (MEM)  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
500 µg/ml Geneticin

Transfektionsmedium  
für 293FT-Zellen

DMEM GlutamaxI  
10 % FBS (inaktiviert, v/v)  
10 mM Hepes  
10 mM Non-Essential Amino Acids (MEM)  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

NIH3T3-Medium

RPMI-1640  
10 % FBS (inaktiviert, v/v)  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Einfriermedium

90 % FBS (inaktiviert, v/v)  
10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

#### 4.1.5 Mausstämme

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des Instituts für Immunologie in München gezüchtet und gehalten.

##### C57BL/6 und B6SJL

Der MHC-Haplotyp dieser Mausstämme ist H-2<sup>b</sup>. C57BL/6-Mäuse exprimieren das Ly5.2-Allel für CD45. Der kongene B6SJL-Mausstamm ist bis auf das Ly5.1-Allel genetisch identisch zu C57BL/6.

##### OT-1

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Peptid OVA<sub>257-264</sub> im Kontext von MHC-I (H-2K<sup>b</sup>) erkennt [Hogquist *et al.*, 1995]. Der TCR kann spezifisch mit monoklonalen Antikörpern gegen Vα2 und Vβ 5.1/5.2 nachgewiesen werden. Dieser Mausstamm wurde sowohl auf dem C57BL/6- bzw. B6SJL-Hintergrund gezüchtet, d.h. die OT-1 T-Zellen exprimieren das Ly5.2- bzw. das Ly5.1-Allel.

### 4.1.6 Peptide, Proteine und Oligonukleotide

Hühner-Ovalbumin (*albumin, chicken egg, Grade V*) wurde von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Das Peptid OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) wurde von der Firma NeoMPS (Straßburg, Frankreich) synthetisiert.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) hergestellt.

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

### 4.1.7 Vektoren

#### 4.1.7.1 Herpes Simplex Vektoren

Der rekombinante und replikationsdefiziente HSV-1 Vektor HSV-OVA wurde im Labor von P. Marconi (Universität Ferrara, Italien) hergestellt [Lauterbach *et al.*, 2004]. Das Konstrukt basiert auf dem Vektor T0ZGFP, in welchem die essentiellen *immediate early*-Gene ICP4, ICP27 und das Gen ICP22 deletiert wurden. Die Expressionskassette hCMV- $\beta$ -Globin-OVA wurde in den UL41-Lokus inseriert.

#### 4.1.7.2 Lentivirale Vektoren

Die hier verwendeten lentiviralen Vektoren basieren auf dem Vektor FugW [Lois *et al.*, 2002].

Der Vektor pSIN-UbiC-eGFP entspricht dem Originalvektor FugW, wird jedoch in dieser Arbeit als pSIN-UbiC-eGFP bezeichnet, um eine einheitliche Nomenklatur der Vektoren zu schaffen.

Um die Vektoren pSIN-1kb-CD19-GFP bzw. pSIN-0,2kb-CD19-GFP zu generieren, wurde das 999 bp-Fragment (-1018 bp bis -19 bp) bzw. das 222 bp-Fragment (-241 bp bis -19 bp) des humanen CD19-Promotors jeweils als *Not I/Age I*-Fragment aus dem bereits vorhandenen Vektor pSIN-CD19-OVA-WPRE (hergestellt von Melanie Werner) isoliert und als *Klenow/Age I*-Fragmente in FugW kloniert. Der im Originalkonstrukt FugW vorhandene humane Ubiquitin C-Promotor wurde zuvor als *Pac I/Age I*-Fragment entfernt. Für die Vektoren CD19-OVA und Ubi-OVA wurde das Transgen eGFP aus den Vektoren pSIN-1kb-CD19-GFP bzw. pSIN-UbiC-eGFP gegen das membranständige Hühneralbumin TfrOVA getauscht. EGFP wurde als *Age I/Eco R I*-Fragment entfernt und TfrOVA aus dem bereits vorhandenen Vektor CMV- $\beta$ g-TfrOVA (hergestellt von Henning

Lauterbach) als *Eco R I/Xba I*-Fragment isoliert, in das Plasmid pBluescript-II-KS<sup>+</sup> (Stratagene, Amsterdam, Die Niederlande) subkloniert und schließlich als *Age I/Eco R I*-Fragment in pSIN-1kb-CD19-GFP bzw. pSIN-UbiC-eGFP eingefügt.

#### 4.1.7.3 Gammaretrovirale Vektoren

Die Originalkonstrukte für das Tet-induzierbare Vektorsystem, SK-s-rtTA-2 und S2s-c(LM2CG), wurden freundlicherweise von Rainer Löw (Eufets GmbH, Idar-Oberstein) zur Verfügung gestellt. Um den Vektor pSIN-CD19-rtTA-WPRE zu generieren, wurde das 999 bp-Fragment (-1018 bp bis -19 bp) des humanen CD19-Promotors als *Not I/Age I*-Fragment aus dem bereits vorhandenen Vektor pSIN-CD19-OVA-WPRE (hergestellt von Melanie Werner) isoliert und in SK-s-rtTA-2 blunt kloniert. Der Vektor pSIN-eGFP-tet-OVA entstand durch einen Austausch des ursprünglich vorhandenen Transgens Luziferase gegen das membranständige Hühnerei-Albumin TfrOVA. Dazu wurde TfrOVA aus dem bereits vorhandenen Vektor CMV- $\beta$ g-TfrOVA (hergestellt von Henning Lauterbach) als *Eco R I/Xba I*-Fragment isoliert, subkloniert und schließlich als *Sal I/Bam H I*-Fragment in S2s-c(LM2CG) kloniert.

#### 4.1.8 Verbrauchsmaterialien

Centricon Filter	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Einmal-Spritzenfilter (0,2 + 0,45 $\mu$ m)	Nalgene Nunc Int., Rochester, NJ, USA
Flaschenfilter	Nalgene Nunc Int., Rochester, NJ, USA
Einmal-Injektionskanülen 26 G $\times$ 1/2"	Terumo Medical Corporation, Tokyo, Japan
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen 5 ml	Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA

Sonstige Zellkulturmaterialien und -plastikwaren wurden von den Firmen Falcon, Becton Dickinson (Franklin Labs. NJ, USA), Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen) erworben.

### **4.2 Methoden**

Die Methoden wurden alphabetisch geordnet.

#### **4.2.1 Molekularbiologische Methoden**

##### **4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten. Abhängig von der erwarteten Größe der Fragmente wurden Gele verwendet, die zwischen 0,7 % und 2 % Agarose [w/v] in 1× TAE-Puffer enthielten. Als Größenstandard dienten 200 bp und 1kb DNA-Leitern (New England Biolabs, Frankfurt/Main). Um die DNA-Banden später im UV-Licht (312 nm, Intas, Göttingen) sichtbar machen zu können, wurden der flüssigen Agaroselösung 5 µl pro 150 ml Gelvolumen einer 0,1 %igen [w/v] Ethidiumbromidlösung zugegeben. Vor dem Laden des Gels wurden die Proben mit 10 % (v/v) BSU-Auftragspuffer vermischt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit 1× TAE-Laufpuffer in einer Elektrophoresekammer (Werkstatt, Institut für Immunologie, München) bei einer konstanten Spannung von 80 V. Anschließend wurden die Gele an einem Geldokumentationsgerät fotografiert (Intas, Göttingen) und ausgewertet.

##### **4.2.1.2 Bakterienkultur**

Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium (Roth, Karlsruhe) mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet, da alle hier verwendeten Plasmide und Vektoren ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker enthielten. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C in einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz). Für die Anzucht auf Agar-Platten wurde dem LB-Medium Agar (7,5 g Agar/500 ml LB-Medium) sowie 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Platten wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die dauerhafte Lagerung von Bakterien wurden Glycerin-Stocklösungen hergestellt. Dazu wurde 1 ml Bakterienkultur mit 1 ml reinem Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren.

##### **4.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (UV-Spektrophotometer Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) in Plastikkuvetten (Brand, Wertheim) bei einer Wellenlänge von 260

nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD<sub>260</sub>-Einheit 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml. Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. DNA-Lösungen mit einem geringen Proteinanteil haben einen Quotienten von 1,8 – 2,0. Sehr geringe DNA-Mengen [ng/ml] wurden vorzugsweise mit dem Qubit Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bestimmt. Dieses sehr sensitive System basiert auf Farbstoffen, die spezifisch an DNA binden können und daraufhin ein starkes Fluoreszenzsignal abgeben. Dieses wird mit Hilfe des Qubit Fluorometers detektiert und anhand einer Standardkurve quantifiziert.

#### **4.2.1.4 Herstellung chemokompetenter Bakterien**

Eine Über-Nacht-Kultur einer Einzelkolonie von *E. coli* Stbl3™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde 1/100 in 100 ml LB-Medium mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> verdünnt, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,6 bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde bei 3000 g und 4°C für 25 min zentrifugiert, in 40 ml eisgekühltem RFI-Medium resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 4 ml RFII-Medium resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und in Aliquots zu 100 µl aufgeteilt. Die Aliquots wurden bei –80°C aufbewahrt. Der Stamm *E. coli* Stbl3™ wurde speziell für die Transformation viraler Vektoren entwickelt, die direkte Wiederholungssequenzen enthalten. Unerwünschte homologe Rekombinationen innerhalb der LTRs können so vermieden werden.

#### **4.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach der Gelelektrophorese wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht ausgeschnitten und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Isolierung der DNA aus den Agarosestücken erfolgte mit Hilfe des MN Nucleospin Extract Kits (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 30 – 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **4.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA**

Kleine DNA-Mengen (bis 20 µg) wurden nach Anleitung des QIAprep® Spin Miniprep Kits (Qiagen GmbH, Hilden) isoliert.

Zur Aufreinigung größerer DNA-Mengen wurde das QIAfilter<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit verwendet. Um endotoxinfreie DNA für die Transfektion von 293 FT-Zellen zu erhalten, wurde für die Isolierung das Qiagen EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit eingesetzt. Die DNA wurde in TE Puffer eluiert und bei -20°C gelagert.

### 4.2.1.7 Isolierung von RNA

Gesamt RNA wurde aus  $1 \times 10^6$  Zellen gemäß den Angaben des Quiaquick RNeasy Kits isoliert. Die Lyse der Zellen erfolgte in den QuiaShredder-Säulen von Qiagen. Die gewonnene RNA wurde entweder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert, oder sofort in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription).

Vor der reversen Transkription wurde ein DNase-Verdau mit DNase der Firma Promega laut Herstelleranweisung durchgeführt. Dies soll mögliche Kontaminationen durch genomische DNA entfernen. 1 – 2 µg der Gesamt-RNA wurden mit Random-Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das SuperScript<sup>™</sup> First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen) verwendet. Als Kontrolle wurde immer auch eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase durchgeführt.

### 4.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und vor der Ligation über eine Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Etwa 100 ng Vektor sowie die zwei- bis fünffache Menge des zu inserierenden DNA-Fragments wurden mit 400 U T4-Ligase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden chemokompetente *E.coli* Bakterien mit 10 µl des Ligationsansatzes transformiert.

### 4.2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), dient der *in vitro* Amplifikation eines DNA-Segments, das zwischen zwei bekannten Sequenzen liegt. Als Primer werden zwei Oligonukleotide verwendet, die spezifisch an die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche der zu amplifizierenden Sequenz binden. Die DNA-Stränge werden

zunächst durch Hitze denaturiert, dann auf eine Temperatur abgekühlt, die erstens den Primern erlaubt, an ihre Zielsequenzen zu hybridisieren und zweitens der DNA-Polymerase ermöglicht, den komplementären Strang zu synthetisieren. Die Reaktion findet unter einem hohen molaren Überschuß an Oligonukleotid-Primern und den vier dNTP statt. Alle Schritte werden mehrmals wiederholt, was zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA führt, da die Produkte einer Amplifikationsrunde wieder für die nächste zur Verfügung stehen.

PCR Reaktionsbedingungen:

0,2 µl Primer A (100 pmol/µl)

0,2 µl Primer B (100 pmol/µl)

12,5 µl ReddyMix PCR Mastermix\*

2,0 µl DNA

H<sub>2</sub>O ad 25 µl

\* Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte in einem T3 Thermocycler, z.B. mit Hilfe des folgenden Standardprogrammes:

Schritt 1: 95°C	5 min	
Schritt 2: 95°C	30 sec	
Schritt 3: 55°C	45 sec	
Schritt 4: 72°C	30 sec	zurück zu Schritt 2 (29× wiederholen)
Schritt 5: 72°C	10 min	
Schritt 6: 4°C	Kühlung	

#### **4.2.1.10 Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung des viralen Titers**

Genomische DNA wurde mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert und in 200 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Die quantitative PCR [Higuchi *et al.*, 1992] wurde mit dem LightCycler System (Roche Diagnostics, Penzberg) durchgeführt. Dazu wurde ein 65 bp-Fragment aus dem 5'LTR-Bereich des lentiviralen Vektors mit den Oligonukleotiden LTR-vorwärts 5'-

TGAAAGCGAAAGGGAAACCA-3' und LTR-revers 5'-CCGTGCGCGCTTCAG-3' vervielfältigt. Zur internen Standardisierung wurde ein Fragment des *brain-derived neurotrophic factor (Bdnf)* Gens in einem separaten Reaktionsansatz amplifiziert. *Bdnf* liegt als Einzelkopie-Gen vor [Hofer et al., 1990], so dass über das Verhältnis der Kopienanzahl von Vektor zu *Bdnf* normalisiert werden kann. Mit den Oligonukleotiden bdnf-vorwärts 5'-ACGACATCACTGGCTGACAC-3' und bdnf-revers 5'-CATAGACATGTTTGCGGCATC-3' wurde ein 206 bp-Fragment von *Bdnf* amplifiziert. Jeweils 5 µl DNA wurde in Gegenwart von 8 µM Oligonukleotid-Paar (für 5'LTR oder *Bdnf*), 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 1×LC-FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I gemessen. Jede Probe wurde in Duplikaten angesetzt. Die PCR-Konditionen waren wie folgt: ein anfänglicher Denaturierungsschritt von 95°C für 10 Minuten, dann für die nächsten 40 Zyklen bei 95°C für 10 Sekunden. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 60°C für 5 Sekunden und die Verlängerungsreaktion bei 72°C für 10 Sekunden.

Für jede der beiden Reaktionen (5'LTR oder *Bdnf*) wurde der PCR-Zyklus, der das erste Signal oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes generierte, als der Kreuzpunkt (*crossing point*, CP) bestimmt. Der Prozentsatz vektortragender Zellen wurde auf Basis der Differenz zwischen dem CP (Delta CP) der 5'LTR-PCR und der *Bdnf*-PCR mit Hilfe einer Standardkurve berechnet. Zur Erstellung der Standardkurve wurde Plasmid-DNA des lentiviralen Vektors FugW, sowie eines *Bdnf*-kodierenden Bluescriptvektors verwendet. Von dieser DNA wurden 10-fach Verdünnungen angefertigt und für die quantitative PCR eingesetzt.

### 4.2.1.11 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Um DNA-Fragmente für Klonierungen zu erhalten oder nach einer Ligation positive Klone zu identifizieren, wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen gemäß den Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) geschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und im Falle einer nachfolgenden Ligation mit dem MN Nucleospin Extract Kit aufgereinigt.

### 4.2.1.12 Transformation chemokompetenter Bakterien

Für jede Transformation wurde ein Aliquot (100 µl) chemokompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz oder 0,5 – 1 µg Plasmid-DNA vermischt und 10 min

auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C im Wasserbad und eine anschließende zwei minütige Inkubation auf Eis. Um die Expression des Resistenzgenes zu ermöglichen, wurde dem Transformationsansatz 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Die transformierten Bakterien wurden auf LB Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden**

### **4.2.2.1 Adoptiver Zelltransfer**

Diese Methode ermöglicht es, das Verhalten antigen-spezifischer T-Zellen *in vivo* zu studieren. In nicht-immunisierten Tieren ist die Frequenz antigen-spezifischer T-Zellen zu gering um mit Hilfe von Antikörpern gemessen zu werden. Auch nach Immunisierung gibt es nur eine geringe Anzahl spezifischer endogener T-Zellen, die mit Hilfe von MHC:Peptid-Pentameren detektiert werden können [Obar *et al.*, 2008]. Eine Lösung dieses Problems ist der Transfer TCR-transgener T-Zellen in syngene Empfängertiere. Hier entsteht eine Population antigen-spezifischer T-Zellen, die groß genug ist, um mit Antikörpern detektiert zu werden, die direkt gegen den TCR gerichtet sind. Andererseits ist diese Population auch klein genug um eine antigen-spezifische Immunantwort, z.B. nach Immunisierung, zu ermöglichen. Für den adoptiven Zelltransfer wurden Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten von OT-1 TCR-transgenen Mäuse hergestellt. Nach der Erythrozytenlyse wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse der prozentuale Anteil TCR-transgener CD8<sup>+</sup>T-Zellen ermittelt. Um Zellaggregate zu entfernen, wurde die Zellsuspension vor der Injektion durch ein feinporiges Nylonnetz (Reichert Chemie Technik, Porengröße 51 µm) filtriert. Der Zelltransfer erfolgte in syngene gleichgeschlechtliche Mäuse.

### **4.2.2.2 CFSE-Färbung**

Mit Hilfe des Carboxyfluorescein-Succinimidyl Esters (CFSE) lässt sich die Proliferation einer Zellpopulation verfolgen. CFSE dringt passiv in die Zellen ein und bindet dort an Amingruppen zellulärer Proteine. Bei der Hydrolyse der Estergruppe durch intrazelluläre Esterasen entsteht im Zytoplasma ein stabiler Fluoreszenzfarbstoff, der bei jeder Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben wird, wodurch diese nur noch die

Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenzintensität besitzen. Daher kann jede nachfolgende Generation einer proliferierenden Zellpopulation anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität identifiziert werden.

Die zu färbenden Zellen wurden mit 12  $\mu\text{M}$  CFSE in CFSE-Puffer (PBS mit 0,1 % FCS) für 10 min bei 37°C im Inkubator gefärbt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Volumen reinem FCS gestoppt. Das im CFSE-Puffer enthaltene FCS gewährleistet, dass die Färbung nicht zu intensiv wird und dadurch nicht mit anderen Fluorochromen in der FACS-Analyse interferiert.

### 4.2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ist eine wichtige immunologische Methode, die es ermöglicht, einzelne Zellen anhand ihrer relativen Größe, Granularität und Expression von Oberflächenantigenen zu unterscheiden. In einem FACS Gerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl zu einem Laser geleitet, wobei das Licht beim Auftreffen auf die Zelle gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) gibt Auskunft über die Granularität. Mit Hilfe dieser beiden Parameter lassen sich sowohl tote Zellen aufgrund ihrer geringeren Größe, als auch Granulozyten sowie Makrophagen wegen ihrer höheren Granularität von der Lymphozytenpopulation abgrenzen. Die an der Zelloberfläche gebundenen und fluorochrommarkierten Antikörper absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektronische Signale umgewandelt und gibt somit Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen kann die gewünschte Zellpopulation durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur ein Parameter dargestellt wird, oder das Punktwolkendiagramm (*Dot plot*), bei dem zwei Parameter, z.B. zwei Fluoreszenzen, gegeneinander dargestellt werden.

Die FACS-Analysen wurden mit einem FACSCalibur<sup>TM</sup> Durchflusszytometer mit zwei Lasern (488 und 633 nm) und mit einem FACSCantoII<sup>TM</sup> Durchflusszytometer (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) mit 3 Lasern (488, 633 und 405 nm) durchgeführt. Die Datenaufnahme erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 bzw. BD

FACSDiva Software, Version 2.2 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) und die Datenanalyse mit FlowJo -Software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

*a) Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern*

In einem 5 ml FACS-Röhrchen wurden 50 – 100 µl einer Einzelzellsuspension mit dem gleichen Volumen einer doppelt konzentrierten Antikörperlösung in PBS gut vermischt und 20 min im Kühlschrank inkubiert. Die optimalen Antikörpermengen waren zuvor in Titrationen ermittelt worden. Danach wurden ungebundene Antikörper durch einmaliges Waschen mit 4 ml PBS entfernt. Sofern der primäre Antikörper biotinyliert war, wurde dieser in einer zweiten Färbung mit fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin markiert. Nach dem letzten Waschschrift verblieben 100 – 200 µl Zellsuspension im Röhrchen, das bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis gelagert wurde.

*b) Tetramerfärbung*

Endogene T-Zellpopulationen, die während einer Immunantwort aktiviert werden und expandieren, können mit Hilfe ihres natürlichen Liganden, dem Peptid:MHC-Komplex, nachgewiesen werden. In ihrer monomeren Form haben die Peptid:MHC-Komplexe eine hohe Dissoziationsrate vom TCR, deshalb werden sie multimerisiert, um mehrere TCR pro Zelle binden zu können, was die Avidität der Bindung erhöht [Altman *et al.*, 1996]. Durch die zusätzliche Kopplung an Fluorochrome sind die sogenannten Tetramere gut geeignet für die durchflusszytometrische Analyse endogener antigen-spezifischer T-Zellen.

Für die Tetramerfärbung wurden 3 µl biotinyliertes Tetramer pro Probe eingesetzt und bei 4°C für 20 min inkubiert. Danach wurde ein Mal mit FACS-Puffer gewaschen und im zweiten Schritt 8 µl des fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 20 min im Dunklen bei 4°C und anschließend wieder ein Waschschrift mit FACS-Puffer. Bis zur Analyse wurden die Proben im Kühlschrank gelagert.

#### **4.2.2.4 Entnahme von Blut und Organen der Maus**

*a) Isolation von Lymphozyten und Serumgewinnung aus peripherem Blut*

Zunächst wurde die Maus unter einer Infrarotlampe erwärmt. Dies führt zur Erweiterung der Blutgefäße und erleichtert die Blutentnahme. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wurden 3 – 5 Tropfen (100 – 150 µl) Blut entnommen und in einem

Eppendorfgesäß sofort mit Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml, Ratiopharm, Ulm) vermischt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Anschließend wurden 50 – 100 µl Blut in ein FACS-Röhrchen überführt und direkt mit den gewünschten Antikörpern oder Tetrameren gefärbt. Es folgte eine 15minütige Erythrozytenlyse mit 2 ml BD Pharm Lyse™ Puffer (BD Pharmingen) im Dunkeln bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben einmal mit FACS-Puffer gewaschen und bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Gewinnung von Serum wurde das Blut nicht mit Heparin vermischt, sondern 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 3000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### ***b) Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension***

Zur Organentnahme wurde die Maus durch cervikale Dislokation getötet, auf einem Sezierbrett fixiert und äußerlich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Lymphknoten, die Milz und der Thymus wurden mit Hilfe feiner Pinzetten präpariert. Lunge und Leber wurden vor der Entnahme mit einer PBS-Heparin Lösung (15 ml PBS + 225 µl Heparin-Natrium) gespült, um möglichst viele Erythrozyten aus dem Gewebe zu entfernen. Um dies zu erleichtern, wurde vor der Spülung die Vena cava im Bereich des Abdomens durchtrennt und das austretende Blut mit Zellstoffupfern aufgenommen. Knochenmark wurde aus den Ober- und Unterschenkeln beider Hinterbeine gewonnen. Alle Organe wurden nach Entnahme bis zur weiteren Verwendung in RPMI 1640 Medium auf Eis gelagert.

Zur Isolierung von Knochenmark wurden zunächst die Ober- und Unterschenkel voneinander getrennt und die Knochen an beiden Seiten mit einer Schere geöffnet. Dann wurde das rote Knochenmark mit einer Spritze (20 ml, Braun) und PBS in ein 50 ml-Röhrchen gespült.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milz, Thymus und Lymphknoten wurden diese in einer Petrischale (Ø 5 cm) zwischen zwei quadratischen Gazestückchen (Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Porengröße 100 µm) mit dem Stempel einer 1 ml-Spritze (Omnifix, Braun) zerrieben. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in der gewünschten Menge Medium oder FACS-Puffer zur weiteren Analyse resuspendiert.

Für einen vollständigen Aufschluss des Leber- und Lungengewebes sowie für die bessere Analyse von dendritischen Zellen aus der Milz wurden diese Organe vor dem Zerreiben zusätzlich mit DNase I (0,2 mg/ml, Boehringer Mannheim) und Liberase CI (0,4 mg/ml, Boehringer Mannheim) in RPMI 1640 Medium verdaut. 2 ml der Lösung wurden mit einer 5 ml-Spritze (BD Discardit™II) an verschiedenen Stellen in das jeweilige Organ injiziert und dann 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Organ in einem Cell Strainer (BD Falcon™, Porengröße 100 µm) zerrieben und die Zellsuspension einmal mit PBS + 5 mM EDTA (Sigma) gewaschen und dann bei 300 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert.

Die aus Knochenmark, Milz, Leber und Lunge gewonnenen Zellsuspensionen wurden anschließend einer Erythrozytenlyse unterzogen.

### ***c) Erythrozytenlyse***

Zur Entfernung der Erythrozyten wurden die Zellpellets in 4 ml ACK-Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde den Proben 10 ml FACS-Puffer zugefügt und bei 300 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

### ***d) Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität***

Alle primären Zellen wurden mit Hilfe des Coulter Counters Z2 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) gezählt. Das Zählprinzip beruht auf der Detektion und Messung einer Widerstandsänderung, die eine Zelle auslöst, wenn sie in einer elektrisch-leitfähigen Flüssigkeit suspendiert wird und durch eine Kapillaröffnung tritt. Aus dem Durchtritt jeder einzelnen Zelle resultiert ein elektrischer Impuls, der für die Zählung und Größenbestimmung geeignet ist. Während die Anzahl der Impulse die Zahl der Zellen angibt, hängt die Amplitude des elektrischen Impulses von der Größe der Zelle ab. Diese Methode erlaubt über elektronische Auswahl der ausgelösten Impulse die selektive Zählung von Zellen in sehr engen Größenverteilungen. Durch Zugabe von Zap-O-Globin (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) können lebende von toten Zellen und Erythrozyten unterschieden werden.

Für einen Reaktionsansatz wurden 10 ml Isoton<sup>®</sup> II Lösung (Beckman Coulter) mit 10 µl Zellsuspension und 2 Tropfen Zap-O-Globin in einer Messküvette gemischt und im Coulter Counter Z2 analysiert.

### 4.2.2.5 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)

Mit Hilfe einer enzymvermittelten Reaktion können mit einem ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) Antikörper gemessen werden, die gegen ein bestimmtes Antigen gebildet wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA-Tests zur Detektion von Serumantikörpern gegen OVA (Hühnerei-Albumin) oder VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G*) durchgeführt. Für den OVA-ELISA wurden 96-Lochplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) mit OVA (150 µg/ml) beschichtet. Es wurden jeweils 50 µl pro Loch der Antigen/PBSN-Lösung in die Platten pipettiert, die anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Vor Gebrauch wurden die Platten fünfmal mit PBS gewaschen und dann mit 50 µl/Loch Blockierungspuffer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe der zu testenden Seren (50 µl/Loch), die entsprechend in Blockierungspuffer verdünnt waren. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut fünfmal gewaschen. Der primäre Antikörper, der gegen Immunglobuline der Maus gerichtet ist, wurde in Antikörperlösung verdünnt, mit 50 µl/Loch eingesetzt und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten wieder fünf Waschschrritte und anschließend die Zugabe von 100 µl Substratlösung pro Loch. Die Färbereaktion wurde je nach Geschwindigkeit des Farbumschlags nach fünf bis 10 Minuten durch Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Loch gestoppt. Die Färbung der einzelnen Ansätze wurde mit Hilfe eines ELISA-Lesegeräts (Vmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) als Funktion der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm und 690 nm gemessen. Die Waschschrritte erfolgten mit einem automatischen Waschgerät (96 PW, SLT Labinstruments, Gröding, Österreich).

Die Bestimmung von Serumantikörpern gegen VSV-G mittels ELISA wurde am ENS Lyon im Institut für Humanvirologie (*Laboratoire de Virologie Humain*), Lyon, Frankreich, durchgeführt.

### 4.2.2.6 Generierung von Knochenmarkschimären

Um Knochenmarkschimären zu generieren wurden 10 bis 15 Wochen alte Mäuse an den Tagen -2 und 0 vor Transplantation mit jeweils 550 rad einer Cäsium-137-Quelle (Model G.C. 40; Type B (4); Atomic Energy of Canada Limited, Kanata, Ontario, Kanada)

bestrahlt. Vier Stunden nach der letzten Bestrahlung wurden  $1 - 4 \times 10^6$  transduzierte HSPC pro Maus i.v. injiziert. Um eine mögliche bakterielle Infektion der Tiere während der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zu verhindern, wurde dem Trinkwasser in den ersten drei Wochen nach Transplantation das Antibiotikum Neomycin (1,17 g/l Trinkwasser) zugegeben.

#### **4.2.2.7 Generierung von lentiviralen Vektorüberständen**

Am Vorabend der Transfektion wurden 293 FT-Zellen mit einer Dichte von  $5 - 6 \times 10^6$  pro 100 mm Zellkulturschale in 293 FT-Medium ohne Geneticin ausplattiert. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen etwa zu 80 % konfluent sein. Am nächsten Morgen wurde der Transfektionsmix in einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß hergestellt, pro Ansatz bestehend aus 15 µg psPax2, 10 µg VSV-G, 20 µg lentiviralem Vektor und 100 µl CaCl<sub>2</sub>. Das Volumen wurde mit sterilem Millipore-Wasser auf 1ml eingestellt, danach 1 ml 2×HBS zugefügt und sofort 8 sec auf dem Vortex gründlich gemischt. Anschließend wurde die Transfektionslösung ohne vorherigen Mediumwechsel vorsichtig zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Nach 4 – 5 Stunden Inkubation bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen einmal mit warmem (RT) PBS gewaschen und frisches DMEM Medium ohne Geneticin zugefügt. Zur Generierung der lentiviralen Vektorüberstände wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Die Ernte der Überstände erfolgte 24 und 48 Stunden später. Dazu wurde der Überstand mit einer 20 ml-Spritze aus der Zellkulturschale abgesaugt und über einen Minisart<sup>®</sup> Spritzenfilter (Sartorius, Porengröße 0,45 µm) in ein neues Gefäß überführt, wodurch Zelldebris entfernt wurde. Bis zur letzten Ernte wurden die Vektorüberstände bei 4°C im Kühlschrank gelagert, dann vereinigt und mittels Ultrazentrifugation oder Centricon-Filtration konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.2.2.8 Generierung von gammaretroviralen Vektorüberständen**

Phoenix-eco Zellen wurden mit Hilfe von Calcium-Phosphat transfiziert. Dazu wurden  $7,5 \times 10^6$  Zellen am Vorabend auf einer 100mm Zellkulturschale ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch 8 ml warmes (RT) Transfektionsmedium ersetzt. 60 µl (1µg/µl) Vektor-Plasmid wurden mit 615 µl sterilem Millipore-Wasser und 75 µl CaCl<sub>2</sub> in

einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß gemischt. Zuletzt wurden 750 µl 2×HBS zugegeben und sofort für 8 Sekunden gevortext. Anschließend wurde die Transfektionslösung vorsichtig auf die zu transfizierenden Zellen gegeben und im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach 5 – 6 Stunden wurden die Zellen einmal mit 5 ml warmem (RT) PBS gewaschen und das Transfektionsmedium wurde durch 10 ml Phoenix-Medium ersetzt. 24, 36 und 48 Stunden nach der Transfektion wurde erneut das Medium durch 6 ml Phoenix-Medium ersetzt und die Zellen zur Generierung von Vektorüberständen bei 32°C inkubiert. Auch hier wurde der Überstand mit einer 20 ml-Spritze abgenommen und mit Hilfe eines Spritzenfilters abgelöste Zellen entfernt. Die Vektorüberstände wurden nach jeder Ernte ohne vorherige Konzentration entweder sofort zur Transduktion eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 4.2.2.9 Immunisierungen

#### a) *Immunisierung mit Lentiviren*

Die zur Immunisierung verwendeten Viren wurden kurz im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und dann auf Eis gelagert. Mit serumfreiem Episerf Medium (Gibco) wurden die Virus-Konzentrate auf  $5 \times 10^6$  bzw.  $5 \times 10^7$  virale Partikel pro ml verdünnt, gut gemischt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Pro Maus wurden  $1 \times 10^6$  oder  $1 \times 10^7$  Partikel intravenös injiziert.

#### b) *Immunisierung mit rekombinanten Herpes Simplex Viren Typ 1 (rHSV-1)*

Die zur Immunisierung verwendeten Viren wurden auf Eis aufgetaut und mit PBS auf  $2 \times 10^7$  infektiöse Einheiten pro ml verdünnt. Anschließend wurde die Suspension gut gemischt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Pro Maus wurden zwischen  $2 \times 10^3$  und  $4 \times 10^6$  pfu intravenös injiziert.

### 4.2.2.10 *In – Vivo – Zytotoxizitätstest*

Der *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest ist ein sehr sensitiver Assay um die Effektorfunktionen zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen zu untersuchen. Dabei werden peptidbeladene und CFSE-markierte Milzzellen (CFSE<sup>hoch</sup>) selektiv von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen eliminiert. Als interne Referenz dient eine Population unbeladener Milzzellen, die mit einer geringeren Menge CFSE markiert wurde (CFSE<sup>niedrig</sup>), um sie von der peptidbeladenen Fraktion

durchflusszytometrisch unterscheiden zu können. Aus dem Verhältnis der beiden Populationen zueinander lässt sich die spezifische Lyse berechnen.

Aus Milzen und Lymphknoten wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium mit 10 % Serum aufgenommen, in zwei gleich große Populationen aufgeteilt und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank mit (OVA<sub>257-264</sub> ; 2 µg/ml) oder ohne Peptid inkubiert. Danach wurden beide Populationen mit PBS gewaschen und jeweils in 2 ml CFSE-Puffer aufgenommen. Die Färbung erfolgte wie unter 4.2.2.2 beschrieben, wobei die peptidbeladenen Zellen mit einer hohen Konzentration CFSE (2,5 µM) gefärbt wurden und die unbeladenen Zellen mit einer niedrigen CFSE Konzentration (0,5 µM).

Nach der Färbung wurden beide Populationen im Verhältnis 1:1 gemischt und pro Maus 1 – 2×10<sup>7</sup> Zellen injiziert. Nach 3 – 6 Std wurde die Milz entnommen und das Verhältnis von CFSE<sup>niedrig</sup> Zellen zu CFSE<sup>hoch</sup> Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

Prozentsatz der spezifischen Lyse (PSL):

$$\text{PSL} = [1 - (\text{r von nicht immunisierter Maus} / \text{r von immunisierter Maus}) \times 100];$$

Verhältnis beider Populationen zueinander:

$$r = (\text{Prozentsatz CFSE}^{\text{niedrig}} / \text{Prozentsatz CFSE}^{\text{hoch}})$$

#### **4.2.2.11 Konzentration lentiviraler Vektorüberstände durch Ultrafiltration**

Die Ultrafiltration bietet die Möglichkeit, lentivirale Vektorüberstände sehr effektiv zu konzentrieren. Hierbei werden die Überstände während einer Zentrifugation über eine anisotrope Zellulose-Membran gefiltert. Lösungsmittel und niedermolekulare Substanzen bis zu einer bestimmten Größe können die Membran dabei ungehindert passieren und werden als Durchfluss gesammelt. Höhermolekulare Substanzen, wie z.B. Viruspartikel, werden im Probenreservoir der Membran zurückgehalten und können über einen weiteren Zentrifugationsschritt eluiert werden. Das Volumen der Probe kann so deutlich verringert werden.

Es wurden Centricon<sup>®</sup> Plus-70 Filter (Millipore) mit einer Ausschlussgrösse von 100kDa verwendet. Vor Gebrauch wurde der Filter erst mit 10 ml 70 % (v/v) Ethanol und dann mit 40 ml sterilem Millipore-Wasser gespült. Anschließend wurde der Filter mit maximal 60 ml Vektorüberstand befüllt und bei 3500 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde samt Sammelbehälter verworfen und im nächsten Schritt das Konzentrat eluiert. Dazu wurde die Filtereinheit umgedreht auf den Eluatbehälter gesetzt und bei 1000 g für 2 min bei 4°C zentrifugiert. Die so gewonnene konzentrierte Viruslösung wurde sofort aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **4.2.2.12 Konzentration lentiviraler Vektorüberstände durch Ultrazentrifugation**

Eine weitere Methode, lentivirale Vektorüberstände zu konzentrieren, ist die präparative Ultrazentrifugation. Hierbei werden gelöste Makromoleküle gemäss ihrer Bewegungsgeschwindigkeit unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte sedimentiert.

Der Rotor bewegt sich dabei in einem künstlichen Vakuum, so dass keine Luftreibung auftritt.

Für die Zentrifugation wurden Beckman Ultra-Clear<sup>™</sup> Tubes (25×89 mm, Beckman Instruments, Palo Alto, CA) randvoll mit Vektorüberständen befüllt, in die Schwenkbecher des SW 28 Ausschwingrotors überführt und mit Hilfe einer Waage tariert. Anschließend wurden die Becher mit Schraubdeckeln verschlossen und in den Rotor eingehängt. Um die Becher möglichst dicht verschliessen zu können, wurden ihre Gewinde und Dichtungsringe zuvor gefettet. Der Rotor wurde anschließend vorsichtig in der Zentrifuge platziert und die Proben bei 26 000 g für zwei Std bei 4°C zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden nun aus den Schwenkbechern entnommen und der Überstand durch Dekantieren entfernt. Um restliche Flüssigkeit zu entfernen, wurden die Röhrchen noch für zwei min umgedreht auf ein Papiertuch gestellt. Das glasig erscheinende virale Pellet am Boden der Röhrchen wurde in 150 µl Episerf über Nacht im Kühlschrank gelöst. Am nächsten Tag wurden alle gelösten Pellets aus den maximal sechs Röhrchen einer Zentrifugation vereinigt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Um Kreuzkontaminationen der verschiedenen viralen Konstrukte zu vermeiden, wurde nur ein Konstrukt pro Lauf zentrifugiert und die Schwenkbecher und Deckel nach jeder

Benutzung mit Fermacidal-Lösung (IC Products, Minusio, Schweiz) desinfiziert und anschliessend 20 min mit einer UV-Lampe bestrahlt.

#### **4.2.2.13 Kultivierung von Zelllinien**

##### ***a) Kultivierung von NIH3T3- und Phoenix-eco Zellen***

Die beiden adhärent wachsenden Zelllinien wurden in ihren jeweiligen Medien bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Jeden zweiten Tag wurden die NIH3T3-Zellen im Verhältnis 1 : 10 in neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Konfluenz nie mehr als 80 % betrug.

Die Phoenix-eco Zellen wurden ebenfalls jeden zweiten Tag im Verhältnis 1 : 5 auf neue 100 mm Zellkulturplatten verteilt. Alle sechs Monate wurden diese Zellen einer zweiwöchigen Reselektion mit 1 µg/ml Diphtherie-Toxin (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA) und 500 µg/ml Hygromycin B (CNbiosciences LTD., Beeston, UK) unterzogen.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. 10 µl der Zellsuspension wurde mit 90 µl Trypanblau (Gibco) gemischt. Die Lebendzellzahl wurde durch Auszählen der Zellverdünnung in der Neubauerzählkammer bestimmt. Blau gefärbte Zellen wurden dabei als tot identifiziert und bei der Zählung nicht berücksichtigt.

Eingefroren wurden die Zellen in 1 ml FCS mit 10 % DMSO und maximal sechs Monate bei -180°C gelagert.

##### ***b) Kultivierung von 293FT-Zellen***

293 FT-Zellen wurden in 293 FT-Medium mit Geneticin bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Jeden zweiten Tag wurden sie im Verhältnis 1 : 5 in neue 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Am Vorabend der Transfektion wurden die Zellen in 293FT-Medium ohne Geneticin überführt und in einer Dichte von 5 – 6×10<sup>6</sup> pro 100 mm Zellkulturschale ausplattiert.

Hinsichtlich Konfluenz, Bestimmung der Lebendzellzahl und Einfrieren wurde auch mit den 293 FT-Zellen verfahren wie unter 4.2.2.13 a) beschrieben.

### 4.2.2.14 Kultivierung von HSPC

Zur Gewinnung von HSPC wurden fünf Tage vor Isolierung des Knochenmarks 150 mg/kg Körpergewicht 5-Fluoro-Uracil (5-FU, Amersham, Little Chalfont, UK) i.v. injiziert. 5-FU ist ein Pyrimidin-Analog und inhibiert die Thymidilat-Synthase. Daher wirkt es zellzyklusspezifisch (S-Phase) und führt zu Anreicherung der sich langsam oder nicht teilenden Stammzellpopulation. Die aus dem Knochenmark beider Ober- und Unterschenkel präparierten Zellen wurden in HSPC-Medium ( $1 \times 10^7$  Zellen/10 ml) resuspendiert und in einer 100 mm Zellkulturschale bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für drei Tage inkubiert. Dem HSPC-Medium wurde ausserdem rekombinantes Interleukin-6 (hIL-6, 200 U/ml), murines Interleukin-3 (mIL-3, 10 ng/ml) und muriner Stammzellfaktor (mSCF, 50 ng/ml) zugefügt. Dieser Wachstumsfaktorcocktail verhindert die weitere Differenzierung der Stamm- und Vorläuferzellen und regt sie zur Proliferation an. Die Stammlösung von hIL-6 sollte nicht älter als sechs Monate sein. Die rekombinanten Wachstumsfaktoren stammten von Strathmann Biotech, Hannover.

### 4.2.2.15 Magnetische Zellseparation (MACS)

Um Zellen durch magnetische Zellseparation (*magnetic cell seperation*, MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) zu isolieren, werden diese mit Antikörpern markiert, die wiederum an paramagnetische Partikel gebunden sind. In einer Säule, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet, werden die markierten Zellen zurückgehalten, während alle anderen Zellen die Säule ungehindert passieren können. Daraus resultieren zwei Möglichkeiten der Separation: bei der positiven Isolierung wird die gewünschte Zellpopulation magnetisch markiert, zunächst in der Säule zurückgehalten und später ausserhalb des magnetischen Feldes eluiert. Für die negative Isolierung werden alle unerwünschten Zellen markiert und zurückgehalten, so dass sich nur die gewünschte Population im Durchfluss befindet. In dieser Arbeit wurden beide Strategien angewendet.

B-Zellen wurden mit CD19-Microbeads und Dendritische Zellen mit CD11c-Microbeads positiv isoliert. OT-1 T-Zellen wurden mit dem CD8<sup>+</sup>T-Zellisolutionskit negativ aufgereinigt. Es wurden nur frische Puffer verwendet, die nicht älter als zwei Wochen waren. Aus Milz und Lymphknoten gewonnene Einzelzellsuspensionen wurden einer Erythrozytenlyse unterzogen und dann mit den vom Hersteller angegebenen Mengen an Antikörper-Cocktail, Microbeads und MACS-Puffer für die empfohlene Zeit bei 4 – 8°C

inkubiert. Die Zellen wurden mit dem 20-fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen. Um Zellaggregate zu entfernen wurden die Zellen über einen MACS Pre-Separation Filter (Miltenyi Biotech) filtriert, bevor sie auf die (gemäß den Angaben des Herstellers equilibrierte) Säule gegeben wurden. Maximal  $2 \times 10^8$  Zellen pro 500  $\mu$ l wurden auf die Säule pipettiert, welche in einem Magneten befestigt war. Für die positive Selektion von bis zu  $1 \times 10^7$  bzw.  $1 \times 10^8$  Zellen wurde eine MS<sup>+</sup>- bzw. LS<sup>+</sup>-Säule verwendet. Die Zellen wurden mit  $3 \times 500$   $\mu$ l bzw.  $3 \times 3$  ml MACS-Puffer für MS<sup>+</sup>- bzw. LS<sup>+</sup>-Säulen gewaschen. Die passierenden Zellen wurden als negative Fraktion gesammelt. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die auf der Säule zurückgehaltenen Zellen als positive Fraktion mit  $2 \times 500$   $\mu$ l bzw.  $2 \times 3$  ml MACS-Puffer eluiert.

#### **4.2.2.16 Statistik**

Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte wurden mit dem Programm Prism (Version 4.0b, 2004) berechnet.

#### **4.2.2.17 Transduktion von HSPC**

Drei Tage nach Isolierung des Knochenmarks wurden die kultivierten HSPC geerntet, gezählt und mit aufgetauten Vektorüberständen sowie 4  $\mu$ g/ml Polybrene gemischt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$ /ml in 6-Lochplatten ausgelegt und durch Spin-Infektion transduziert. Dazu wurden die Platten mit Parafilm umwickelt und für 2 Std bei 32°C und 300 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten für weitere 4 Std bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Vektorüberstände mit dem darin enthaltenen Polybrene durch HSPC-Medium ersetzt und die Zellen bei 37°C weiterkultiviert. Alternativ wurde die Transduktion ein- oder zweimal wiederholt, wobei zwischen den einzelnen Transduktionen mindestens 24 Std lagen. Am Tag nach der letzten Transduktion wurden die Zellen durch kräftiges Abspülen mit PBS geerntet.

#### **4.2.2.18 Transduktion von Zelllinien**

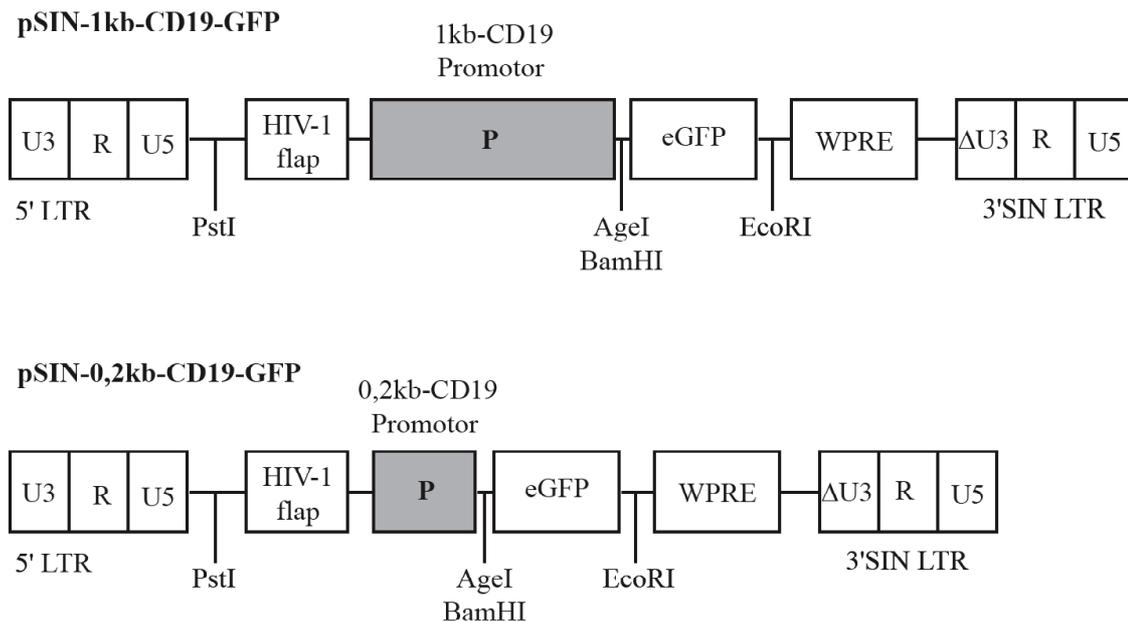
Bei der Transduktion von Zelllinien wurde ähnlich verfahren wie unter 4.2.2.17 für HSPC beschrieben. Die Zelllinien waren vor der Transduktion mindestens eine Woche in Kultur. Die zu transduzierenden Zellen wurden geerntet, gezählt und in aufgetauten Vektorüberständen mit 4  $\mu$ g/ml Protaminsulfat aufgenommen. Es folgte eine zweistündige

Spin-Infektion in 6-Lochplatten bei 32°C und 300 g. Anschließend wurden die Platten für weitere zwei Std bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Transduktionsüberstände gegen die jeweiligen Zellmedien ersetzt und die Zellen bei 37°C weiterkultiviert. Auch hier wurden die Zellen bei Bedarf einer zweiten Transduktion unterzogen, die 24 Std nach der ersten durchgeführt wurde. Drei bzw. vier Tage nach der letzten Transduktion wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

## 5 ERGEBNISSE

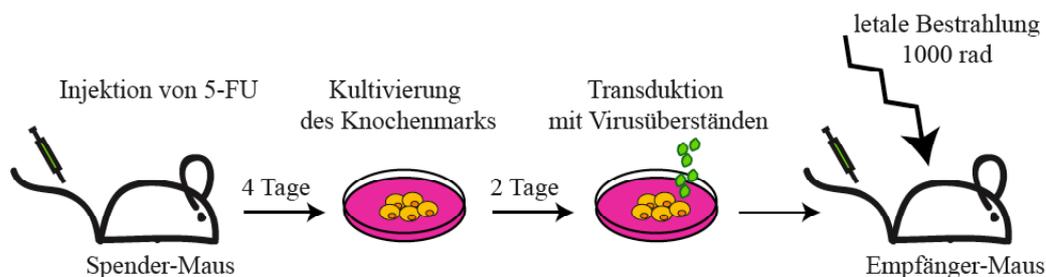
### 5.1 Entwicklung B-zellspezifischer lentiviraler Vektoren

Zunächst sollten lentivirale Vektoren entwickelt werden, deren B-Zellspezifität durch ein 1kb-Fragment des humanen CD19-Promotors vermittelt wird. Die Spezifität dieses Promotors im Rahmen eines gammaretroviralen konstitutiven Expressionssystems wurde bereits gezeigt [Werner *et al.*, 2004]. In lentiviralen Vektoren stehen bis zu 8kb für regulatorische Sequenzen und Transgene zur Verfügung, der Titer nimmt jedoch halblogarithmisch zur Vektorgröße ab [Kumar *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund wurde zusätzlich auch ein kürzeres Promotorfragment getestet. Es handelt sich hierbei um eine Sequenz von 222 bp (-241 bis -19; 0,2kb-Promotor). Diese sowie die oben erwähnte lange Sequenz von 999 bp (-1018 bis -19 bp; 1kb-Promotor), wurden bereits als B-zellspezifisch beschrieben (Abb. 5.1) [Kumar *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2004].



**Abb. 5.1: Schematische Darstellung der lentiviralen SIN-Vektoren zur Generierung von Knochenmarkschimären.** Gezeigt sind SIN-Vektoren, in welchen die Transgenexpression (eGFP) unter der Kontrolle eines 1kb- bzw. 0,2kb-Fragments des humanen CD19-Promotors steht. CMV, Cytomegalovirus; LTR, lange terminale Wiederholungssequenz (*long terminal repeat*); P, Promotor; SIN, selbst-inaktivierend; eGFP, verbessertes grünfluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein*); ΔU3; Deletion in der U3 Region (untranslatierte Region); WPRE, posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers (*woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element*); HIV-1 flap, DNA Überhang, der am aktiven nukleären Import des HIV Genoms beteiligt ist; PstI, AgeI, BamHI, EcoRI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme, die für die Klonierung der Vektoren verwendet wurden.

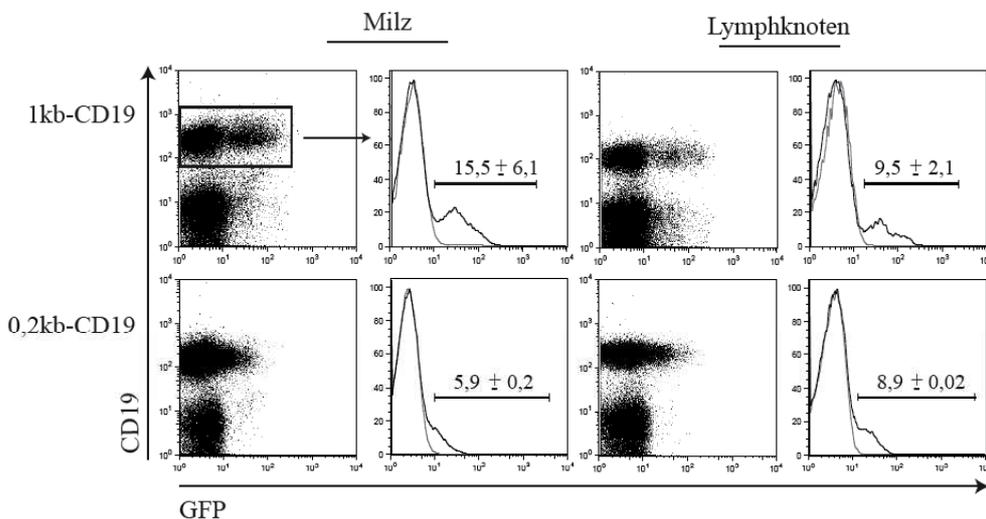
Ziel war es, eine möglichst kurze, aber dennoch B-zellspezifische Sequenz mit ausreichend starker Promotoraktivität zu identifizieren. Für das CD19-Gen sind mehrere Transkriptionsstartpunkte bekannt, die 5' vom Startcodon in einer Region von 100 bp liegen [Kozmik *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1994]. Der Promotor besitzt keine TATA-Box, enthält aber Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie das B-zellspezifische Aktivator Protein (*B cell-specific activator protein*, BSAP) und den frühen B-Zellfaktor (*early B-cell factor*, EBF). Von diesen Transkriptionsfaktoren wird angenommen, dass sie die B-zellspezifische Expression von CD19 regulieren [Nutt *et al.*, 1999; Kozmik *et al.*, 1992]. Als Transgen wurde zunächst das verbesserte grün-fluoreszierende Protein eGFP gewählt (*enhanced green fluorescent protein*; im Folgenden als „GFP“ bezeichnet), welches gut in der Durchflusszytometrie detektiert werden kann.



**Abb. 5.2: Generierung von Knochenmarkschimären.** Die Abbildung zeigt schematisch den Versuchsablauf. Knochenmark von Spendertieren wurde vier Tage nach intravenöser Gabe des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil (5-FU) entnommen und zwei Tage *ex vivo* kultiviert. Danach erfolgte die Transduktion mit retroviralen Vektorüberständen und die Rekonstitution letal bestrahlter Empfängermäuse.

Um das Expressionsverhalten der beiden Vektoren zu untersuchen, wurden HSPC mit lentiviralen Vektorüberständen transduziert und Knochenmarkschimären generiert (Abb. 5.2). Als Knochenmarksdonoren dienten C57BL/6-Mäuse, welchen vier Tage zuvor das Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU) injiziert worden war. Dieses ist toxisch für teilungsaktive Zellen und erhöht den Anteil hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (*hematopoietic stem and progenitor cells*, HSPC) im Knochenmark. Es wird angenommen, dass HSPC durch eine erhöhte Aktivität des Enzyms Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) weitgehend vor der toxischen Wirkung von 5-FU geschützt sind. DPD katalysiert den Abbau von 5-FU in das nicht-toxische Stoffwechselprodukt 5-Fluoro- $\beta$ -Alanin [Takebe *et al.*, 2001; Mattison *et al.*, 2002]. Nach der Isolation wurde das Knochenmark *ex vivo* mit

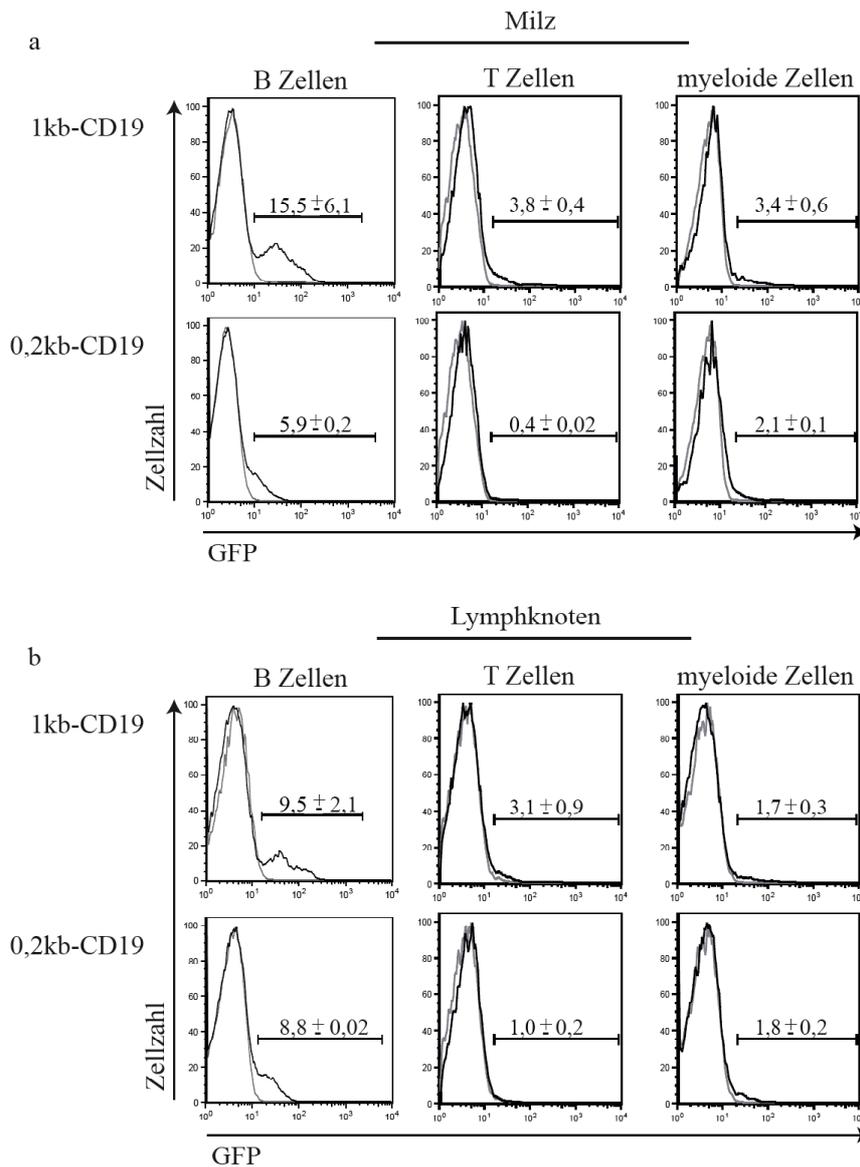
den in Abb. 5.1 dargestellten viralen Vektoren transduziert und anschließend in letal bestrahlte Empfängermause transplantiert. Acht Wochen nach Transplantation wurde die GFP-Expression in B-Zellen aus Milz und Lymphknoten der Chimären durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 5.3). Dabei war in der Milz der Prozentsatz GFP-exprimierender B-Zellen mit dem 1kb-CD19-Vektor mehr als doppelt so hoch verglichen zu dem 0,2kb-CD19-Vektor (Abb. 5.3., 1kb-CD19:  $15,5 \pm 6,1$  vs. 0,2kb-CD19:  $5,9 \pm 0,2$ ). Im Lymphknoten dagegen war die GFP-Expression der B-Zellen in beiden Gruppen vergleichbar (1kb-CD19:  $9,5 \pm 2,1$  vs. 0,2kb-CD19:  $8,9 \pm 0,02$ ). Hier kam es jedoch mit dem 1kb-CD19-Vektor auch in Nicht-B-Zellen (CD19<sup>-</sup>) zu GFP-Expression, wohingegen sich die GFP-Expression mit dem 0,2kb-CD19-Vektor auf B-Zellen beschränkte.



**Abb. 5.3: Bestimmung der Frequenz GFP-positiver B-Zellen in Milz und Lymphknoten von Knochenmarkschimären.** HSPC wurden mit 1kb-CD19 bzw. 0,2kb-CD19 transduziert und in syngene letal bestrahlte Rezipienten transplantiert (n = 3 Mäuse/Gruppe). Acht Wochen nach Transplantation wurde die Frequenz GFP-exprimierender B-Zellen (= CD19<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>-Zellpopulation) in Milz und Lymphknoten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente, welche mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden. In den Histogrammen sind jeweils Durchschnittswerte ( $\pm$  SD) der Prozentsätze GFP-positiver B-Zellen dargestellt.

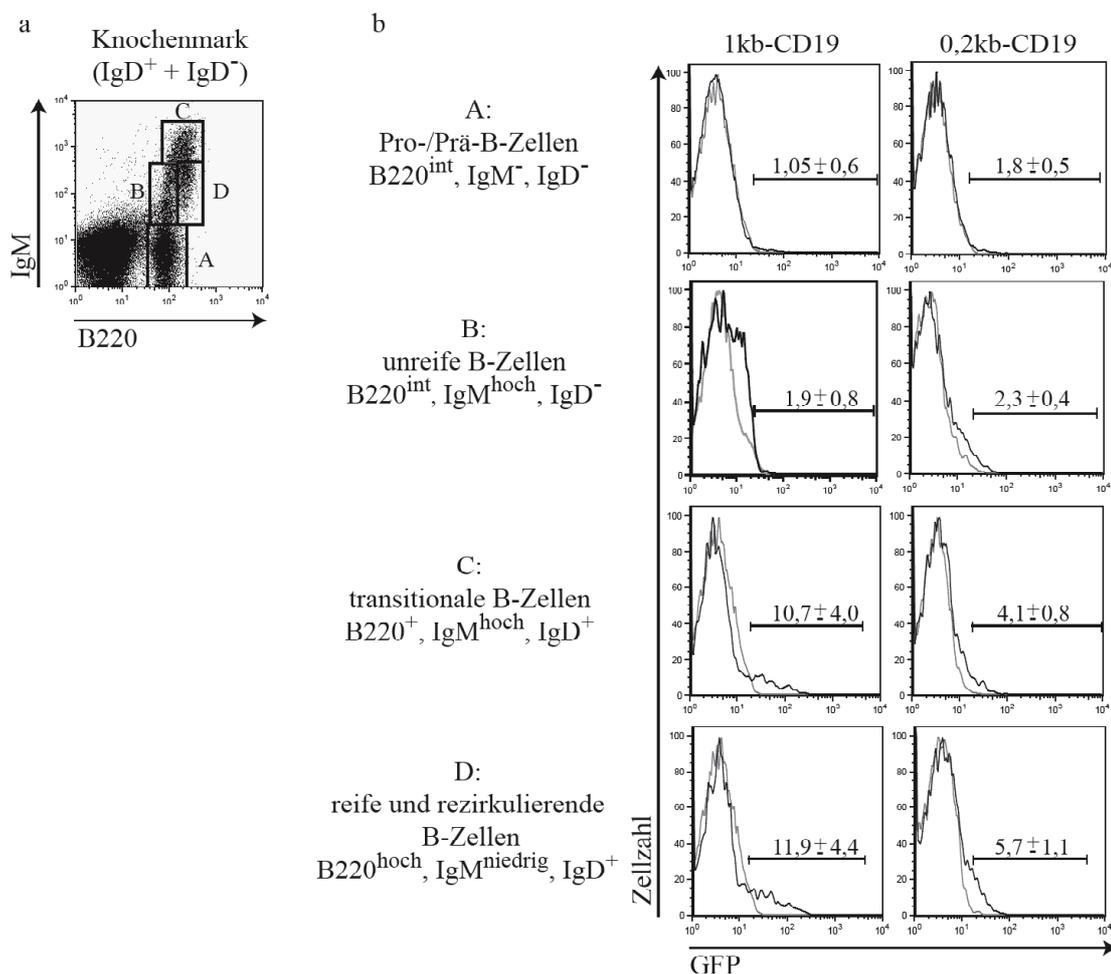
In CD19-negativen Zellen, wie T-Zellen und Zellen der myeloiden Linie, wie z.B. Monozyten, Makrophagen oder Granulozyten, lag nach Transduktion mit dem 1kb-CD19 Vektor die GFP-Expression in Milz und Lymphknoten generell höher im Vergleich zum 0,2kb-CD19 Vektor. In T-Zellen der Milz war diese sogar bis zu zehnfach erhöht (Abb. 5.4a, 1kb-CD19:  $3,8 \pm 0,4$  vs. 0,2kb-CD19:  $0,4 \pm 0,02$ ). Einzig die myeloiden Zellen der

Lymphknoten zeigten vergleichbare Prozentsätze GFP-positiver Zellen, unabhängig vom verwendeten Vektor (Abb. 5.4b, 1kb-CD19:  $1,7 \pm 0,3$  vs. 0,2kb-CD19:  $1,8 \pm 0,2$ ). Die spezifische Transgenexpression in B-Zellen war jedoch mit beiden Vektoren signifikant höher als in allen anderen untersuchten Zelltypen.



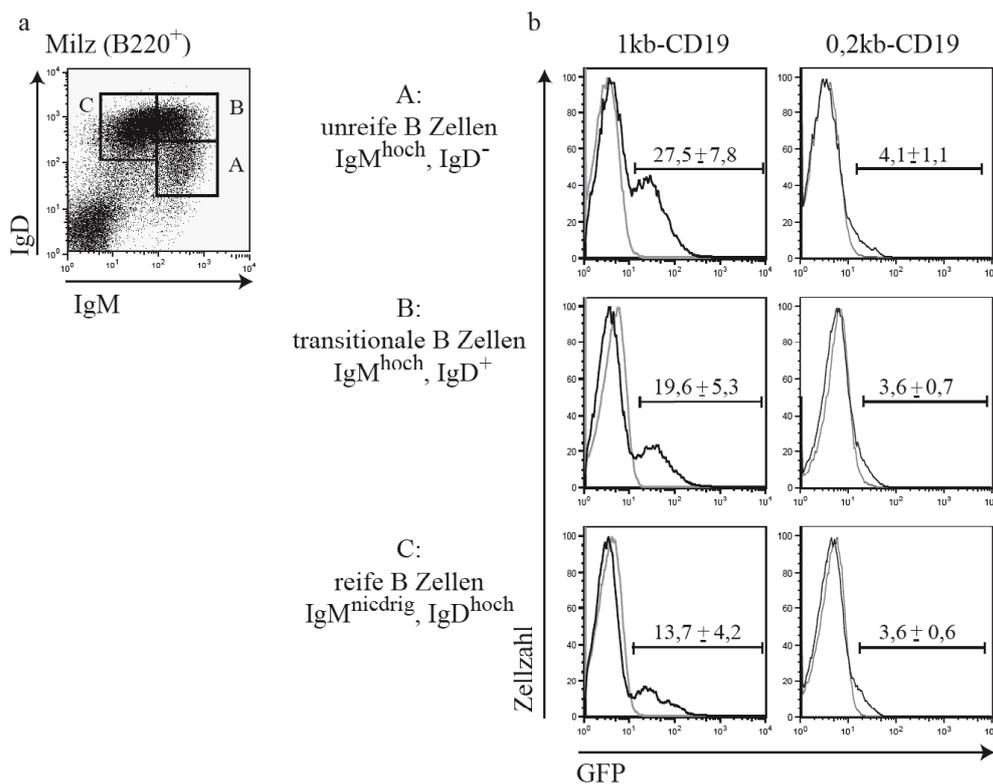
**Abb. 5.4: Vergleich spezifischer und unspezifischer GFP-Expression in Milz und Lymphknoten von Knochenmarkschimären.** Es wurde die Frequenz GFP-positiver B-Zellen ( $CD19^+$ ) sowie T-Zellen ( $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$ ) und myeloider Zellen ( $CD11b^+$ ) in Milz (a) und Knochenmark (b) der Chimären aus Abb 5.3 durchflusszytometrisch bestimmt. Graue Linie: mit virusfreiem Medium transduzierte Kontrollchimäre.

Desweiteren wurden in den Chimären die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Zellen aus Knochenmark und Milz mittels Durchflusszytometrie auf die Frequenz transgenexprimierender B-Zellen untersucht (Abb. 5.5 und Abb. 5.6). Im Knochenmark wurde mit beiden Vektoren in den frühen Stadien der B-Zellentwicklung eine vergleichbare GFP-Expression erreicht (Abb. 5.5b, Histogramme A und B). In den transitionalen sowie reifen und rezirkulierenden B-Zellen dagegen konnte mit dem 1kb-CD19-Vektor eine doppelt so hohe Transgenexpression erreicht werden (Abb. 5.5b, Histogramme C und D).



**Abb. 5.5: GFP-Expressionsprofil von 1kb-CD19-GFP bzw. 0,2kb-CD19-GFP während der B-Zellentwicklung im Knochenmark.** Die in Abb. 5.4 gezeigten Knochenmarkschimären (n = 3 Mäuse/Gruppe) wurden acht Wochen nach Transplantation der transduzierten HSPC analysiert. **a:** Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Zellen wurden, wie in den repräsentativen Punktwolkendiagrammen gezeigt, anhand ihrer differentiellen Expression von B220, IgM und IgD identifiziert. Die IgD-Färbung im Knochenmark ist nicht gezeigt. **b:** Die Histogramme sind für die linksseitig beschriebenen B-Zellsubpopulationen dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus zwei Experimenten mit unabhängigen Knochenmarkschimären. Graue Linie: mit virusfreiem Medium transduzierte Kontrollchimäre.

Noch deutlicher zeigt sich dieser Unterschied in der Milz (Abb. 5.6). Hier lag die Expression von GFP mit dem Vektor 0,2kb-CD19-GFP in allen B-Zellstadien bei durchschnittlich 4 %, wohingegen der 1kb-CD19-GFP Vektor eine deutlich höhere Expression erreichte. Am höchsten war diese in unreifen B-Zellen mit  $27,5 \pm 7,8$  % GFP positiven Zellen (Abb. 5.6b, Histogramme A) und betrug in den reifen B-Zellen noch  $13,7 \pm 4,2$  % (Abb. 5.6b, Histogramme C). Anders als im Knochenmark kam es in der Milz im Laufe der B-Zellreifung zu einer schrittweisen Abnahme des Prozentsatzes GFP-positiver Zellen. Dieser Effekt war nach Transduktion mit 1kb-CD19-GFP stärker ausgeprägt als dies für 0,2kb-CD19-GFP der Fall war. Die in den Histogrammen (Abb. 5.3 – 5.6) angegebenen Werte spiegeln die Durchschnittswerte aus zwei Experimenten mit unabhängigen Knochenmarkschimären wieder.



**Abb. 5.6: GFP-Expressionsprofil von 1kb-CD19-GFP bzw. 0,2kb-CD19-GFP während der B-Zellentwicklung in der Milz.** Die in Abb. 5.4 gezeigten Knochenmarkschimären (je n = 3) wurden acht Wochen nach Transplantation der transduzierten HSPC analysiert. **a:** Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) wurden, wie in den repräsentativen Punktwolkendiagrammen gezeigt, anhand ihrer differentiellen Expression von IgM und IgD identifiziert. Die CD19-Färbung in der Milz ist nicht gezeigt. **b:** Die Histogramme sind für die linksseitig beschriebenen B-Zellsubpopulationen dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus zwei Experimenten mit unabhängigen Knochenmarkschimären. Graue Linie: mit virusfreiem Medium transduzierte Kontrollchimäre.

Die zum Teil große Varianz der Transgenexpression innerhalb der experimentellen Gruppen geht vermutlich auf die unterschiedliche Beteiligung transduzierter und untransduzierter HSPC bei der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zurück.

Anhand der hier beschriebenen FACS-Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung eines 999-bp-großen Fragments des humanen CD19-Promotors eine B-zellspezifische Transgenexpression im Kontext eines lentiviralen Vektors *in vivo* erreicht werden kann. Das kürzere 0,2kb-CD19 Promotorfragment wurde in der Literatur zwar als B-zellspezifisch beschrieben [Moreau *et al.*, 2004], erwies sich in den hier vorgestellten Experimenten aber als ungeeignet, da mit diesem Promotor zwar eine weitgehend spezifische, aber nur schwache Transgenexpression erreicht werden konnte. Für die angestrebte systemische Anwendung der lentiviralen Vektoren ist jedoch eine starke Transgenexpression von Vorteil. Somit muss ein reduzierter Titer des größeren 1kb-CD19 Konstruktes akzeptiert werden, um eine spezifische und möglichst starke Transgenexpression *in vivo* erreichen zu können. Aus diesen Gründen wurde für alle weiteren Experimente der 1kb-CD19-Promotor verwendet.

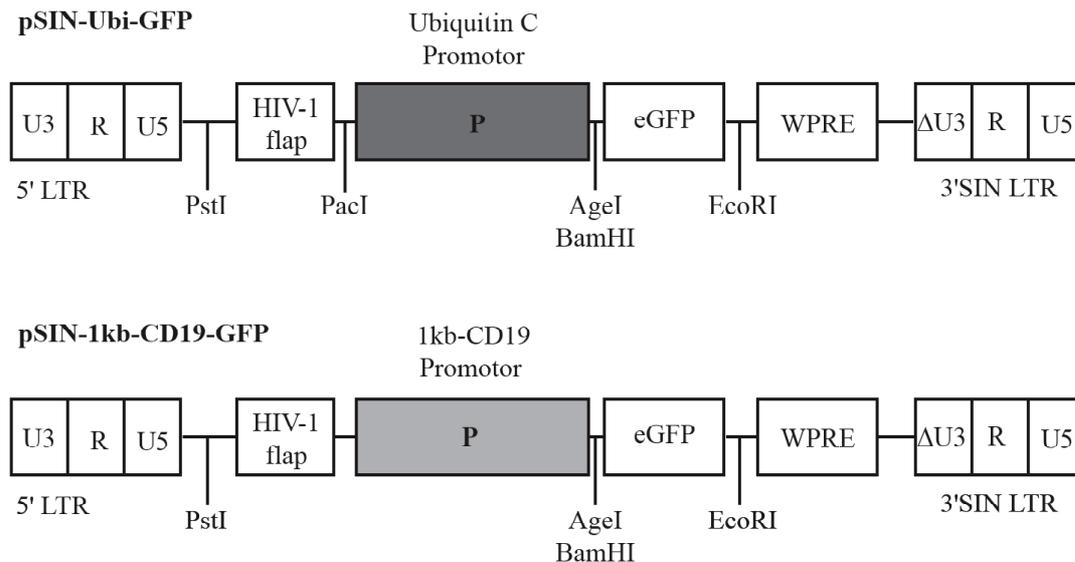
## **5.2 Systemische Anwendung lentiviraler Vektoren**

Die Anwendung lentiviraler Vektoren als Vakzine hat verschiedene Vorteile gegenüber anderen viralen Systemen, denn sie sind beispielsweise in der Lage, APCs in Leber und Milz, darunter auch B-Zellen, nach systemischer Gabe effizient zu transduzieren [VandenDriessche *et al.*, 2002] ohne diese jedoch konstitutiv zu aktivieren oder zu inhibieren, wie das bei Adenovirus- bzw. Herpes Simplex Virus-basierten Systemen der Fall ist [Miller *et al.*, 2002; Salio *et al.*, 1999]. Darüber hinaus ist das Risiko einer bereits vor Immunisierung bestehenden Immunität gegen Lentiviren gering [Esslinger *et al.*, 2003; Follenzi *et al.*, 2007].

### **5.2.1 Expressionsanalyse des Reportergens GFP nach systemischer Anwendung**

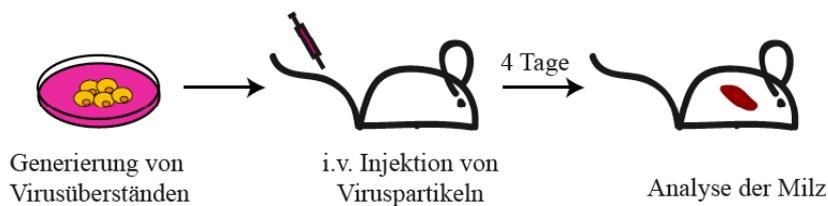
Zunächst wurde mit Hilfe des unter 5.1 beschriebenen 1kb-CD19-GFP Vektors überprüft, inwieweit nach systemischer Gabe eine B-zellspezifische Transgenexpression nachgewiesen werden kann. Als positive Kontrolle diente ein Vektor, in dem die

Expression von GFP unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin C-Promotors steht (Abb. 5.7). Dieser ist in nahezu allen humanen sowie murinen Geweben aktiv, so z.B. auch in Zellen hämatopoetischen Ursprungs, wie B-Zellen und DCs. Mit Hilfe dieses Promotors kann eine starke und dauerhafte Transgenexpression in zahlreichen Gewebe- und Zelltypen erreicht werden [Schorpp *et al.*, 1996].



**Abb. 5.7: Schematische Darstellung der lentiviralen SIN-Vektoren für Immunisierungen.** Gezeigt sind SIN-Vektoren, in welchen die Transgenexpression (GFP) unter der Kontrolle des humanen CD19-Promotors bzw. des humanen Ubiquitin C-Promotors (Ubi) steht. Erklärung der Abkürzungen: siehe Abb. 5.1.

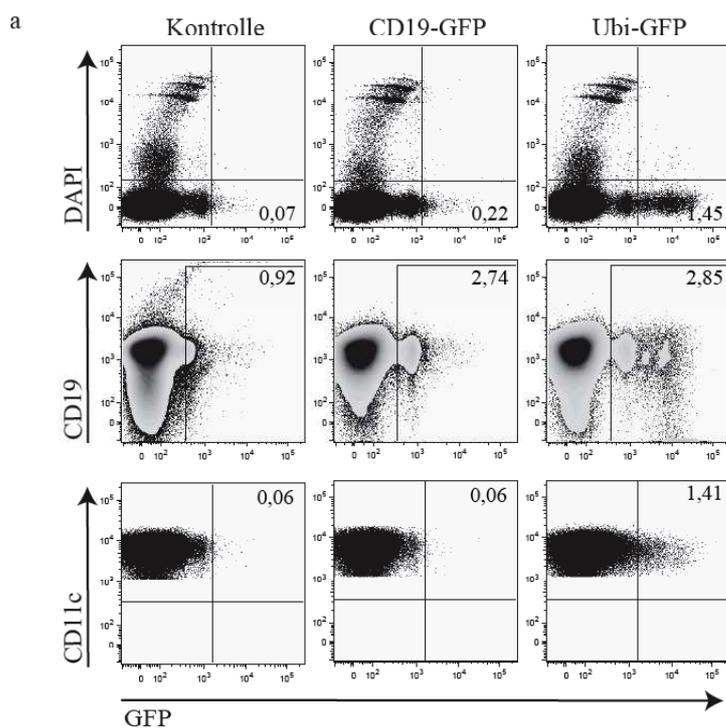
Eine systemische virale Infektion ruft im Organismus eine starke antivirale Immunantwort hervor, wobei ein Großteil der viralen Partikel neutralisiert wird, bevor es zu einer Infektion von Wirtszellen kommen kann [Pan *et al.*, 2002]. Um die Expression von GFP nach der Immunisierung mit Lentiviren durchflusszytometrisch bestimmen zu können, muss daher mit einer grossen Menge von Viruspartikeln immunisiert werden. Daher wurden die lentiviralen Überstände nach ihrer Generierung zusätzlich durch Ultrazentrifugation konzentriert und dann bis zu  $10^8$  Partikel pro Maus i.v. injiziert. Die durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression in der Milz erfolgte am Tag vier nach der Immunisierung (Schema Abb. 5.8).



**Abb. 5.8: Schematische Übersicht des experimentellen Ablaufs.** Zunächst wurden lentivirale Virusüberstände generiert und durch Ultrazentrifugation konzentriert. Anschließend wurden C57BL/6-Mäuse mit den viralen Partikeln i.v. immunisiert. Vier Tage später wurde die Expression von GFP in der Milz durchflusszytometrisch analysiert.

Wie erwartet war im Vergleich zu den Ergebnissen in Knochenmarkschimären die Gesamtfrequenz GFP-exprimierender Milzzellen nach Immunisierung mit dem 1kb-CD19-GFP Vektor stark vermindert und auch deutlich geringer als mit dem ubiquitär exprimierten Ubi-GFP Vektor (Abb. 5.9a, b). Innerhalb der B-Zellpopulation konnte mit  $1,98 \pm 0,76$  % GFP-positiven Zellen nur noch 10 % der unter 5.1 beschriebenen Expression in Chimären erreicht werden. Die Spezifität des Vektors blieb dagegen nach systemischer Gabe der lentiviralen Vektoren unverändert. In dendritischen Zellen ( $CD11c^+$ ) und myeloiden Zellen ( $CD11b^+$ ) war die GFP-Expression marginal ( $0,11 \pm 0,04$  % bzw.  $0,03 \pm 0,02$  %; Abb. 5.9b). Mit dem Ubiquitin C-Promotor konnten aufgrund seines breiten Expressionsspektrums insgesamt mehr GFP-positive Zellen nachgewiesen werden. Sowohl in B-Zellen ( $1,98 \pm 0,87$  %) als auch in dendritischen Zellen ( $1,38 \pm 0,03$  %) gab es eine deutliche Transgenexpression. Bei den B-Zellen war die Frequenz GFP-positiver Zellen vergleichbar zu den Ergebnissen mit CD19-GFP (Ubi-GFP:  $1,98 \pm 0,87$  % vs. CD19-GFP:  $1,98 \pm 0,76$  %). Die myeloiden Zellen zeigten dagegen keine GFP-Expression ( $0,05 \pm 0,03$  %).

In der Ubi-GFP Gruppe konnte in allen analysierten transgenexprimierenden Zelltypen eine höhere Intensität der GFP-Expression beobachtet werden, was die Folge einer höheren Aktivität dieses Promotors sein kann.



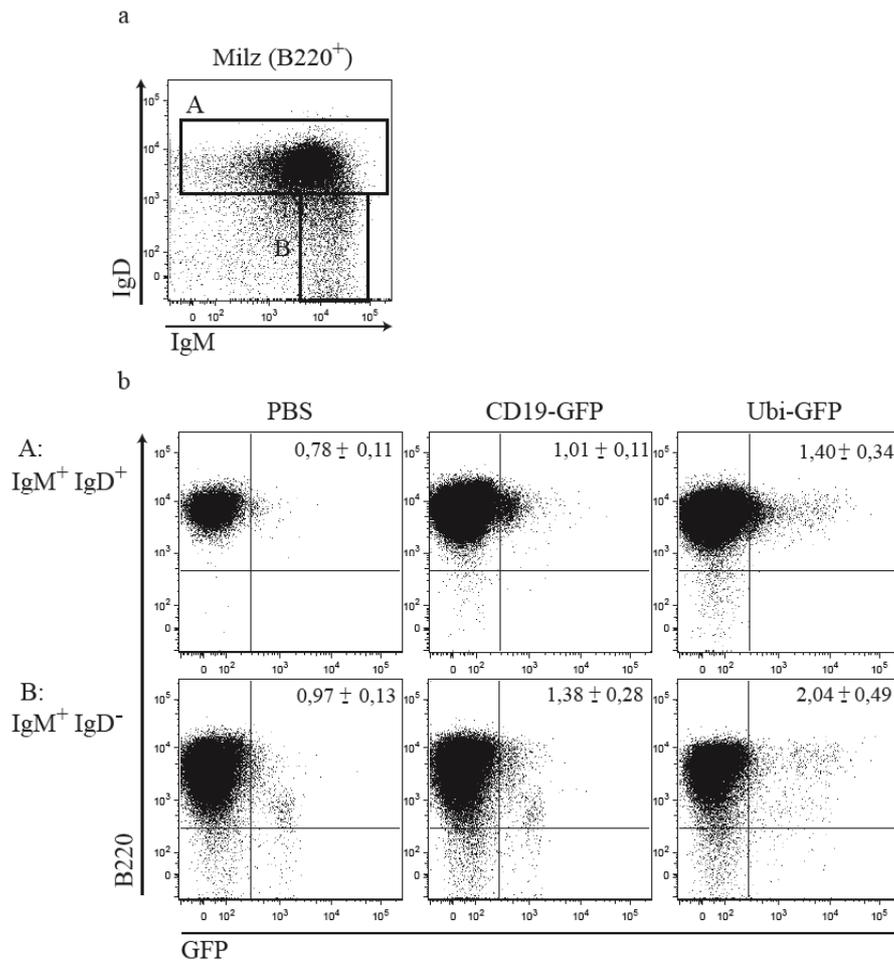
b

% GFP <sup>+</sup> Zellen	Kontrolle	CD19-GFP	Ubi-GFP
CD19	0,49 ± 0,42	1,98 ± 0,76	1,98 ± 0,87
CD11c	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,04	1,38 ± 0,03
CD11b	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,03

**Abb. 5.9: Durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression in der Milz nach systemischer (i.v.) Administration von Lentiviren.** C57BL/6-Mäuse wurden mit  $10^8$  Partikeln der lentiviralen Konstrukte CD19-GFP bzw. Ubi-GFP i.v. immunisiert. Nach vier Tagen wurde die GFP-Expression in der Milz untersucht. **a:** Analyse der GFP-Expression in der Gesamtzellpopulation (DAPI), in B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) und dendritischen Zellen (CD11c<sup>+</sup>) nach Immunisierung mit CD19-GFP bzw. Ubi-GFP. **b:** Vergleich der Frequenz GFP-exprimierender B-Zellen, dendritischer Zellen und myeloider Zellen (CD11b<sup>+</sup>) der Milz nach Immunisierung mit CD19-GFP bzw. Ubi-GFP. Es sind jeweils Durchschnittswerte ( $\pm$  SD) der Prozentsätze GFP-positiver Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt (n = 2 Mäuse/Gruppe).

Um Aufschluss darüber zu erhalten, welche B-Zellsubpopulationen der Milz nach lentiviraler Immunisierung GFP exprimieren, wurden weitere durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Wie in Abb. 5.10 dargestellt, wurden Milzzellen mit Antikörpern gegen IgM und IgD angefärbt. Diese Färbung erlaubt die Unterscheidung zweier Subpopulationen der B-Zellen in der Milz: IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup> (unreife B-Zellen) und IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> (reife und transitionale B-Zellen) (Abb. 5.10a). Den Punktwolkendiagrammen ist zu entnehmen, dass sowohl unreife (IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>), als auch reife bzw. transitionale (IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>)

B-Zellen nach Immunisierung mit CD19-GFP bzw. Ubi-GFP das Transgen exprimierten, wobei der Prozentsatz GFP-positiver Zellen in der Population unreifer B-Zellen etwas höher lag als bei den reifen B-Zellen. Dieser Unterschied war jedoch für beide Vektoren nicht signifikant (Abb. 5.10b).

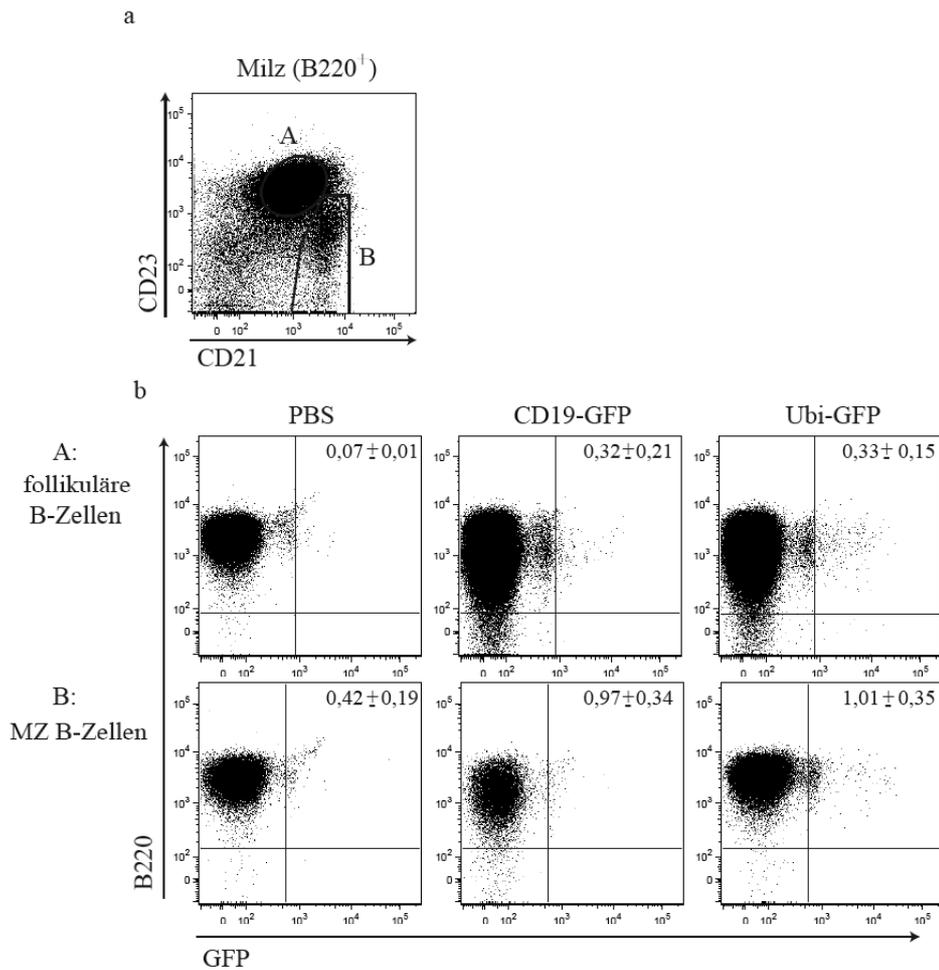


**Abb. 5.10: Expression von GFP in B-Zellen der Milz.** **a:** Das Punktwolkendiagramm oben zeigt die Vorauswahl der analysierten B-Zellen (B220<sup>+</sup>): IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> (A) und IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup> (B). **b:** Die Diagramme unten zeigen die GFP-Expression innerhalb der linksseitig beschriebenen B-Zell-Populationen nach Immunisierung mit CD19-GFP bzw. Ubi-GFP im Vergleich zur virusfreien PBS-Kontrolle. Die Zahlenwerte innerhalb der Punktwolkendiagramme sind Durchschnittswerte ( $\pm$  SD) der Prozentsätze GFP-positiver Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten ( $n = 2$  Mäuse/Gruppe).

In einer weiteren FACS-Analyse sollte untersucht werden, ob auch folliculäre B-Zellen sowie B-Zellen der Marginalzone der Milz GFP exprimieren (Abb. 5.11).

Eine Antikörperfärbung mit CD21 und CD23 erlaubt eine Unterscheidung dieser beiden B-Zellpopulationen (Abb. 5.11a). CD21 ist auch als Komplementrezeptor 2 bekannt und auf

B-Zellen der Marginalzone der Milz besonders hoch exprimiert [Timens *et al.*, 1989]. Zusammen mit CD19 bildet er einen Rezeptorkomplex, der eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung systemischer bakterieller Infektionen spielt [Levy *et al.*, 1998]. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten der Milz gehören die B-Zellen der Marginalzone zu den ersten APCs, die nach systemischen Infektionen mit Antigen in Kontakt kommen, das über den Blutstrom in die Milz gelangt. Nach Immunisierung mit CD19-GFP exprimierten diese dreimal häufiger GFP als die folliculären B-Zellen ( $0,97 \pm 0,34$  vs.  $0,32 \pm 0,21$ ). Dies war ebenso für den Vektor Ubi-GFP der Fall ( $1,01 \pm 0,35$  vs.  $0,33 \pm 0,15$ ; Abb. 5.11b). Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, denn es ist anzunehmen, dass nach systemischer Gabe der lentiviralen Partikel diese mit dem Blutstrom zunächst zur Milz gelangen und dort vor allem die B-Zellen der Marginalzone infizieren können. Die Auswertung histologischer Schnitte der Milz war aufgrund der schwachen GFP-Expression unter Kontrolle des 1kb-CD19-Promotors nicht aussagekräftig (Daten nicht gezeigt).



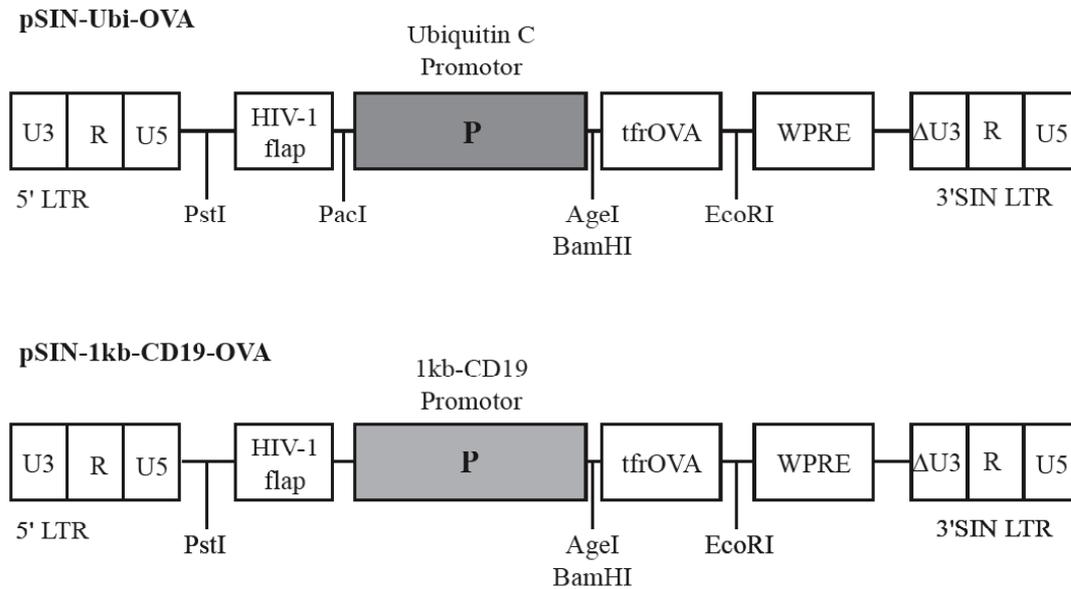
**Abb. 5.11: Expression von GFP in follikulären B-Zellen und B-Zellen der marginalen Zone der Milz. a:** Das Punktwolkendiagramm zeigt die Vorauswahl der analysierten B-Zellen (B220<sup>+</sup>): follikuläre B-Zellen (A; CD21<sup>-</sup>/CD23<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) und B-Zellen der marginalen Zone (B; CD21<sup>+</sup>/CD23<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup>). **b:** Die Diagramme zeigen die GFP-Expression innerhalb der linksseitig beschriebenen B-Zell-Populationen nach Immunisierung mit CD19-GFP bzw. Ubi-GFP. Die Zahlenwerte innerhalb der Punktwolkendiagramme sind Durchschnittswerte ( $\pm$  SD) der Prozentsätze GFP-positiver Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2 Mäuse/Gruppe).

Somit konnte gezeigt werden, dass auch nach systemischer Anwendung des CD19-GFP Vektors eine B-Zellspezifität gegeben ist. Die Expressionsstärke war jedoch im Vergleich zu den Ergebnissen in den Knochenmarkschimären stark reduziert.

### 5.3 B-zellspezifische Expression eines Modellantigens in vivo

Um den Einfluss der Antigenpräsentation durch B-Zellen auf eine antigenspezifische CD8<sup>+</sup>T-Zellantwort zu untersuchen, wurde das Reportergen GFP durch das Modellantigen Hühnerei-Albumin ersetzt (im Folgenden als „OVA“ bezeichnet), wodurch die Vektoren

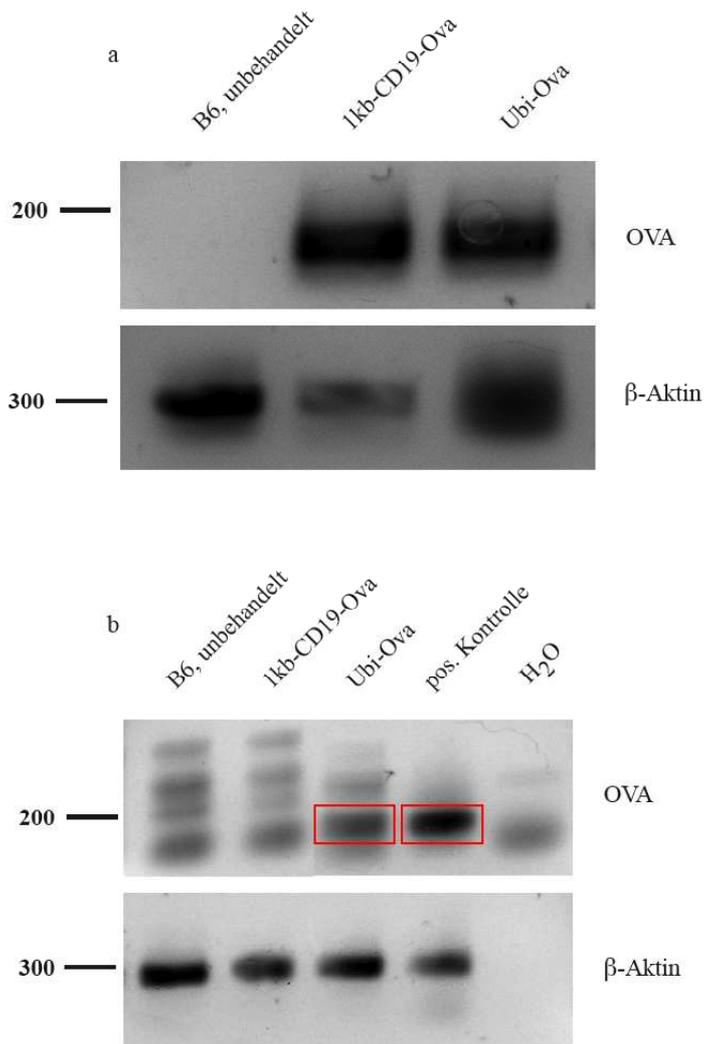
CD19-OVA und Ubi-OVA (Abb. 5.12) entstanden. OVA wurde hier in einer membranständigen Form (tfrOVA) [Diebold *et al.*, 2001] exprimiert, d.h. als Fusionsprotein aus der Transmembrandomäne des humanen Transferrinrezeptors und nativem OVA.



**Abb. 5.12: Schematische Darstellung der lentiviralen OVA-kodierenden SIN-Vektoren.** Gezeigt sind SIN-Vektoren, in welchen die Expression von membranständigem Hühner-Ovalbumin (OVA) unter der Kontrolle des humanen CD19-Promoters bzw. des humanen Ubiquitin C-Promoters steht.

Aufgrund seiner guten Charakterisierung wurde das Hühnerei-Albumin ausgewählt. Es stehen zudem geeignete Tiermodelle und Werkzeuge zur Analyse einer OVA-spezifischen und durch CD8<sup>+</sup>T-Zellen vermittelten Immunantwort zur Verfügung:

- 1) Es existieren die unter 5.3.1 beschriebenen T-Zellrezeptor transgenen OT-1 Mäuse.
- 2) Mit fluorochrommarkierten MHC-I:Peptid-Tetrameren können polyklonal T-Zellantworten untersucht werden [Altman *et al.*, 1996]. Beispielsweise binden H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-Tetramere [Busch *et al.*, 1998] an OVA-spezifische T-Zellen, deren TCR das Peptid SIINFEKL im Kontext von H-2K<sup>b</sup> erkennt.



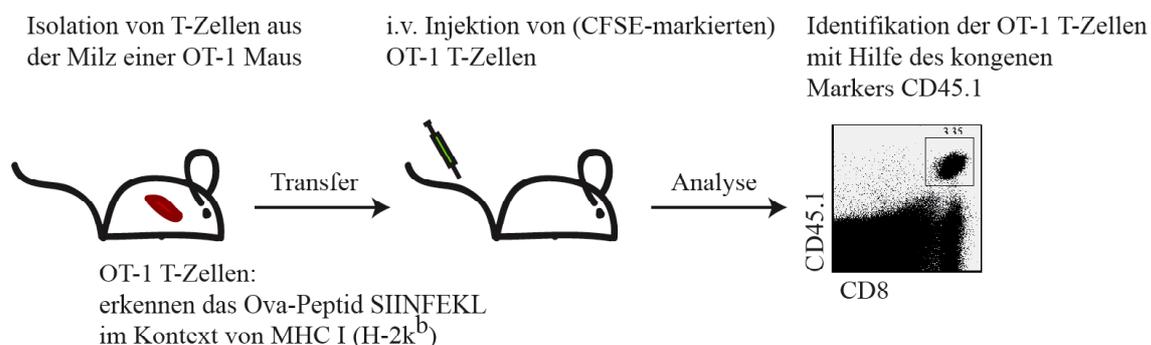
**Abb. 5.13: Expression von OVA in B-Zellen und Dendritischen Zellen (DC) nach lentiviraler Immunisierung.** Mäuse wurden mit  $10^8$  Partikeln der lentiviralen Vektoren 1kb-CD19-OVA bzw. Ubi-OVA immunisiert. 4 Tage später wurden B-Zellen und DCs als getrennte Populationen aus den Milzen der immunisierten Tiere isoliert. **a:** RT-PCR Analyse der B-Zellpopulationen. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern untersucht. Es ist die Untersuchung der OVA-Expression in B-Zellen nach Immunisierung mit den angegebenen lentiviralen Vektoren gezeigt. Aktin diente als Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen. OVA 170 bp, Aktin 302 bp. **b:** RT-PCR Analyse der DC-Populationen. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern untersucht. Es ist die Untersuchung der OVA-Expression in DC nach Immunisierung mit den angegebenen lentiviralen Vektoren gezeigt. Aktin diente als Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen. Als positive Kontrolle wurde cDNA aus EG7-OVA Zellen eingesetzt. Die Rahmen markieren jeweils die OVA-Bande. OVA 170 bp, Aktin 302 bp.

Um die Expression des OVA-Transgens zu überprüfen, wurden C57BL/6-Mäuse mit  $10^8$  Partikeln der lentiviralen Konstrukte 1kb-D19-OVA bzw. Ubi-OVA immunisiert. Nach 4 Tagen wurden aus den Milzen B-Zellen und DCs aufgereinigt und aus diesen Zellpopulationen mRNA isoliert. Die anschließend durchgeführte RT-PCR zeigte, dass OVA sowohl nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA, als auch Ubi-OVA in B-Zellen

exprimiert wird (Abb. 5.13a). In DCs dagegen konnte die Expression von OVA nur nach Immunisierung mit Ubi-OVA nachgewiesen werden, nicht jedoch nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA (Abb. 5.13b). Da nur geringe Mengen cDNA aus den DCs gewonnen werden konnten, wurde für die RT-PCR zusätzlich cDNA aus EG7-OVA Zellen als positive Kontrolle eingesetzt. Diese murine Zelllinie wurde stabil mit OVA transfiziert [Moore *et al.*, 1988]. Die Ergebnisse der RT-PCR bestätigten die Resultate der FACS-Analysen nach Immunisierungen mit den GFP-kodierenden lentiviralen Vektoren (Abb. 5.9).

### 5.3.1 Stimulation antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Um zu testen, ob eine Antigenexpression in B-Zellen zu einer OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup>T-Zellantwort führt, wurden OVA-spezifische OT-1 T-Zellen isoliert und in C57BL/6-Mäuse transferiert (Abb. 5.14). OT-1 Mäuse [Hogquist *et al.*, 1994] verfügen über CD8<sup>+</sup> T-Zellen, deren Mehrheit (80 – 95 %) einen klonotypischen Rezeptor trägt, der spezifisch ein oktamer Peptid (SIINFEKL, OVA<sub>257-264</sub>) aus Ovalbumin im Kontext von MHC-I (H-2K<sup>b</sup>) erkennt.



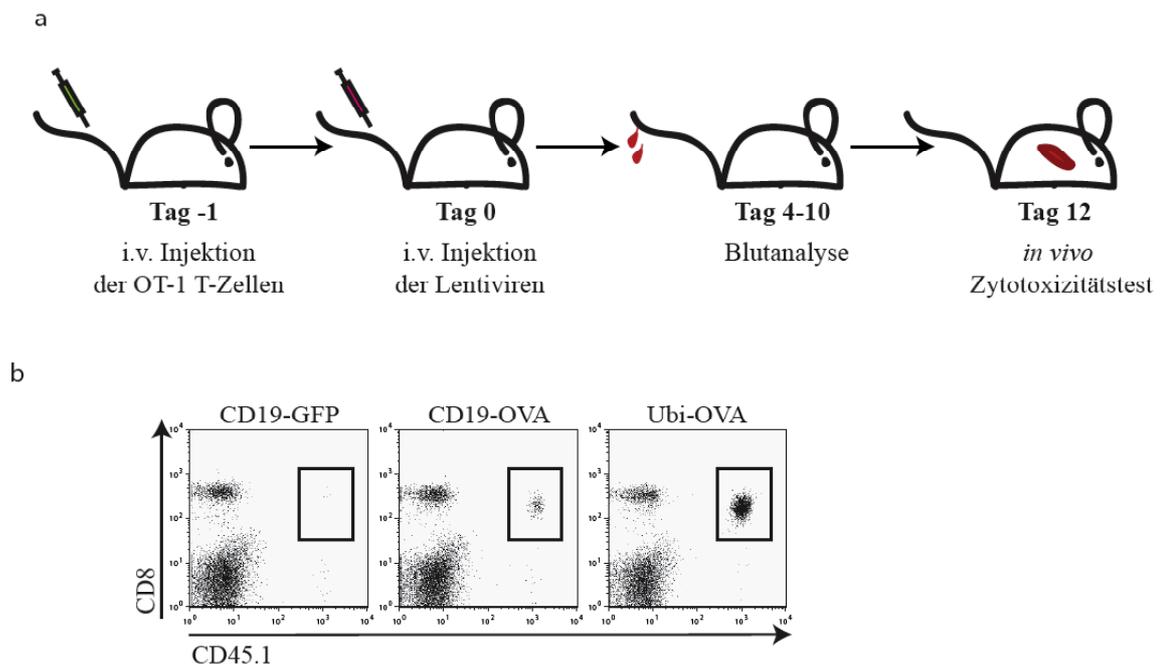
**Abb. 5.14: Adoptiver Transfer von OT-1 T-Zellen.** Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs. T-Zellen einer OT-1 Maus wurden isoliert, bei Bedarf mit CFSE markiert und in syngene Empfängermäuse transferiert. Die Identifikation der transferierten Zellen im Blut bzw. in der Milz der Empfänger erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe von Antikörpern gegen CD8 und den kongenen Marker CD45.1 oder anhand der CFSE-Färbung (nicht gezeigt).

Diese T-Zellen können in syngene Mäuse transferiert werden, wo sie nach Kontakt mit spezifischem Antigen proliferieren und mit Hilfe von Antikörpern gegen CD8 und den

kongenem Marker CD45.1 oder anhand einer vorher durchgeführten CFSE-Färbung identifiziert werden können.

Einen Tag nach dem Transfer der OT-1 T-Zellen erfolgte die Immunisierung mit  $10^6$  oder  $10^7$  lentiviralen Partikeln von 1kb-CD19-OVA bzw. Ubi-OVA, sowie  $10^7$  Partikeln CD19-GFP als negative Kontrolle (Abb. 5.15a). Die Immunisierung mit ansteigenden lentiviralen Dosen sollte gewährleisten, dass eine ausreichende Antigenpräsentation auf B-Zellen erreicht wird.

In den darauf folgenden 10 Tagen wurde die Frequenz der OT-1 T-Zellen im peripheren Blut mit Antikörpern gegen CD8 und den kongenem Marker CD45.1 durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 5.15b). Am Tag 12 wurde ausserdem ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dieser sensitive Test basiert auf der selektiven *In-Vivo*-Eliminierung von peptidbeladenen und CFSE-markierten Milzzellen.



**Abb. 5.15: Immunisierung mit Lentiviren nach OT-1 Transfer.** **a:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. OT-1 T-Zellen wurden isoliert und am Tag -1 in C57BL/6-Mäuse transferiert. Einen Tag später erfolgte die lentivirale Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA, Ubi-OVA oder CD19-GFP (Kontrollvektor;  $n = 3$  Mäuse/Gruppe). Am Tag 4 bis 10 wurde die Frequenz der OT-1 T-Zellen im peripheren Blut mit Hilfe von Antikörpern gegen CD8 und den kongenem Marker CD45.1 durchflusszytometrisch bestimmt. Desweiteren wurde am Tag 12 ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. **b:** Die Punktwolkendiagramme zeigen exemplarisch die Frequenz der OT-1 T-Zellen im peripheren Blut am Tag 4 nach Immunisierung.

Nach Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit 1kb-CD19-OVA kam es zu einer dosisabhängigen Expansion der OT-1 T-Zellen im peripheren Blut. Eine niedrige Dosis ( $10^6$  Partikel) 1kb-CD19-OVA führte zu einer schwachen Expansion, wobei der prozentuale Anteil der OT-1 T-Zellen an der Gesamtpopulation der  $CD8^+$  T-Zellen im Blut unter 10 % lag. Nach Immunisierung mit einer hohen Dosis ( $10^7$  Partikel) des viralen Vektors hingegen lag der Anteil der OT-1 T-Zellen mit 70 % deutlich höher (Abb. 5.16a, b). Der Höhepunkt der Expansion wurde in beiden Fällen am Tag 4 nach Immunisierung erreicht. An den folgenden Tagen ging die Zahl der OT-1 T-Zellen im Blut kontinuierlich zurück.

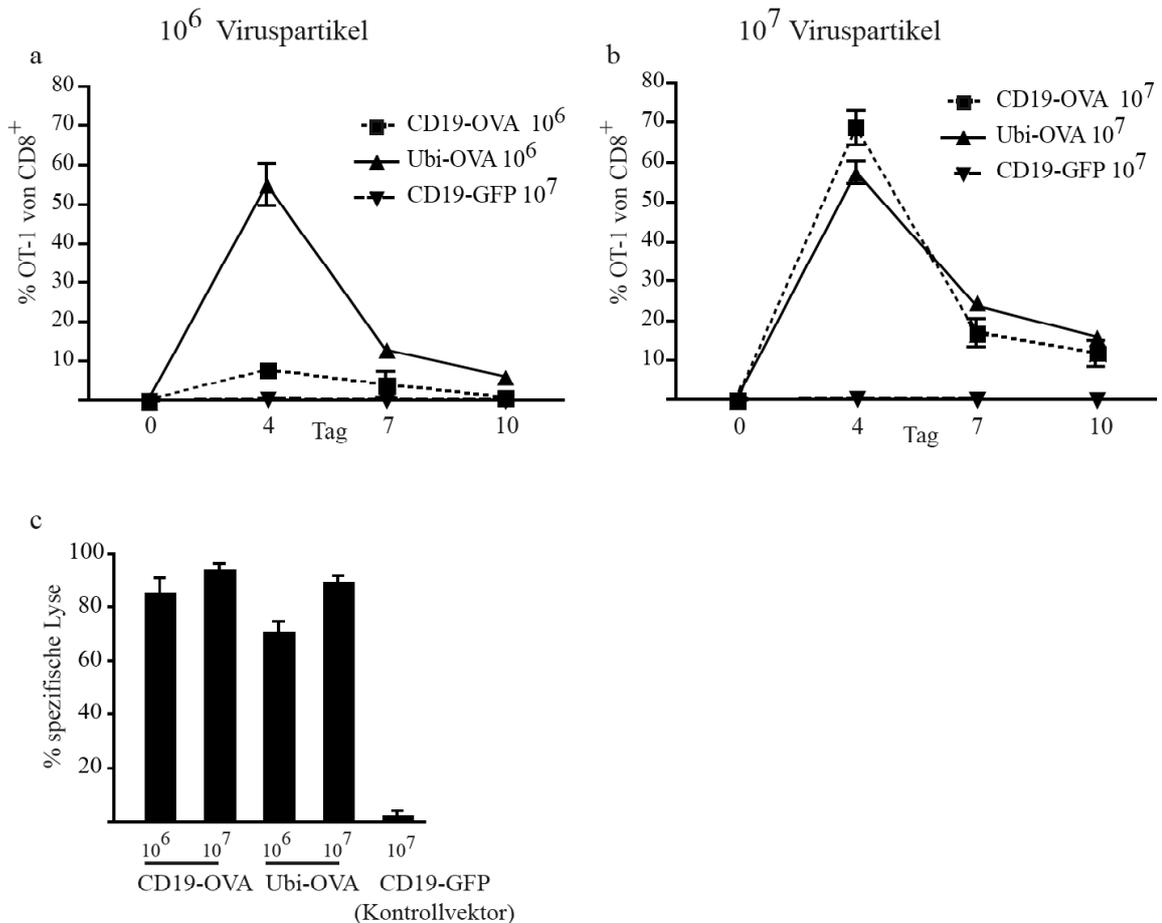
Mit dem Vektor Ubi-OVA konnte eine starke und im untersuchten Bereich dosisunabhängige Expansion beobachtet werden (Abb. 5.16a, b). Der prozentuale Anteil von OT-1 T-Zellen an der Gesamtpopulation der  $CD8^+$  T-Zellen im Blut lag am Tag 4 nach Immunisierung mit beiden Virusmengen bei knapp 60 %. Auch hier markierte dieser Tag zugleich den Höhepunkt der Expansion.

Anhand eines *In-Vivo*-Zytotoxizitätstests wurde am Tag 12 nach Immunisierung zudem überprüft, ob die transferierten OT-1 T-Zellen in der Lage sind, SIINFEKL-beladene Zielzellen zu eliminieren. Zu diesem Zwecke wurden den Tieren jeweils  $2 \times 10^7$  syngene C57BL/6 Milzzellen i.v. injiziert, die zuvor wie (im Material- und Methodenteil) unter Punkt 4.2.2.10 beschrieben, mit OVA-Peptid beladen und mit CFSE gefärbt worden waren. Bereits 4 Stunden nach Transfer konnte die zytotoxische Eliminierung der CFSE-markierten Zellen durchflusszytometrisch gezeigt werden (Abb. 5.16c).

Obwohl die Immunisierungen mit 1kb-CD19-Ova zu einer dosisabhängigen OT-1 Proliferation geführt hatten, gab es keine signifikanten Unterschiede bei der spezifischen Lyse der CFSE-markierten Zielzellen. Nach Immunisierung mit der niedrigen Dosis 1kb-CD19-Ova betrug die spezifische Lyse in den Rezipienten  $85,03 \pm 5,61$  % und war damit nur ca. 9 % geringer als in Rezipienten, die eine hohe Dosis 1kb-CD19-Ova erhalten hatten ( $93,55 \pm 2,23$  %).

Auch nach Immunisierung mit Ubi-OVA konnte eine spezifische Lyse der peptidbeladenen Zielzellen gezeigt werden. Diese lag nach Immunisierung mit der niedrigen Dosis Ubi-OVA bei  $70,55 \pm 4,03$  %. Mit der hohen Dosis konnten dagegen  $89,30 \pm 2,08$  % der Zielzellen eliminiert werden, was einer um 27 % effizienteren Lyse im Vergleich zur niedrigen Dosis entspricht.

Der Vergleich der beiden Vektoren zueinander machte darüber hinaus deutlich, dass mit 1kb-CD19-OVA im Vergleich zu Ubi-OVA eine höhere spezifische Lyse erreicht wurde. Bei der niedrigen Dosis war diese 21 % höher, bei der hohen Dosis betrug der Unterschied 5 %. Es erwies sich jedoch keiner der Unterschiede hinsichtlich der spezifischen Lyse als signifikant.



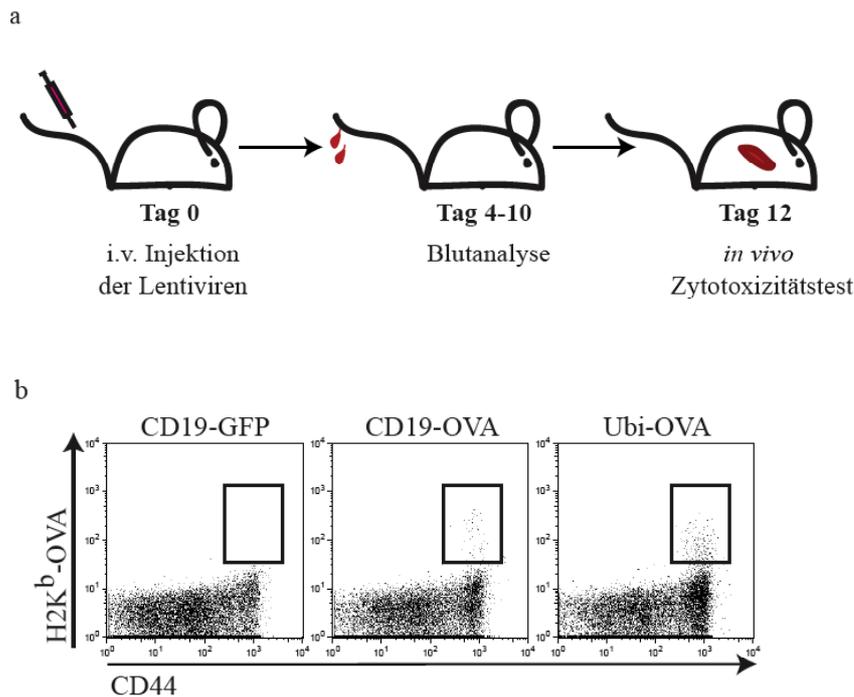
**Abb. 5.16: Kinetik der OT-1 Expansion in peripherem Blut und *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA bzw. Ubi-OVA.** Es wurden  $5 \times 10^5$  OT-1 T-Zellen/Maus adoptiv transferiert ( $n = 3$  Mäuse/Gruppe). **a:** Kinetik nach Immunisierung mit  $10^6$  viralen Partikeln. Kontrollvektor: CD19-GFP ( $10^7$  Partikel). **b:** Kinetik nach Immunisierung mit  $10^7$  viralen Partikeln. Kontrollvektor: CD19-GFP ( $10^7$  Partikel). **c:** Am Tag 12 wurde ein auf CFSE basierender *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt und die spezifische Lyse von SIINFEKL-beladenen, CFSE-markierten Zielzellen nach 4 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Experimente. Gezeigt sind Durchschnittswerte ( $\pm$  SD) des Prozentsatzes von OT-1 T-Zellen bzw. der spezifischen Lyse.

### 5.3.2 Stimulation des endogenen T-Zellrepertoires

Der adoptive Transfer monoklonaler OT-1 T-Zellen führt in den Empfängertieren zu einer künstlich hohen Frequenz naiver T-Zellen mit einheitlichem T-Zellrezeptor, der selektiv das OVA-Peptid SIINFEKL erkennt. Natürlicherweise ist die Frequenz endogener antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen sehr viel geringer und variiert von Individuum zu Individuum.

Nachdem die Immunisierung mit den viralen Vektoren 1kb-CD19-OVA bzw. Ubi-OVA zu einer Expansion und zytotoxischen Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen geführt hatte, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob auch ein endogenes T-Zellrepertoire mit diesen Vektoren stimuliert werden kann.

Der Versuchsaufbau (Abb. 5.17a) war dabei analog zu dem in Abb. 5.15a beschriebenen, jedoch erfolgte kein adoptiver T-Zelltransfer. Naive C57BL/6-Mäuse wurden mit 10<sup>6</sup> oder 10<sup>7</sup> lentiviralen Partikeln von CD19-OVA bzw. Ubi-OVA immunisiert. Eine experimentelle Gruppe erhielt 10<sup>7</sup> Partikel CD19-GFP als negative Kontrolle. In den darauf folgenden 10 Tagen wurde die Frequenz endogener OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen im peripheren Blut mit einem Antikörper gegen CD8 sowie fluorochrommarkierten MHC-I:Peptid-Tetrameren durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 5.17b). Am Tag 12 wurde ausserdem ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt.

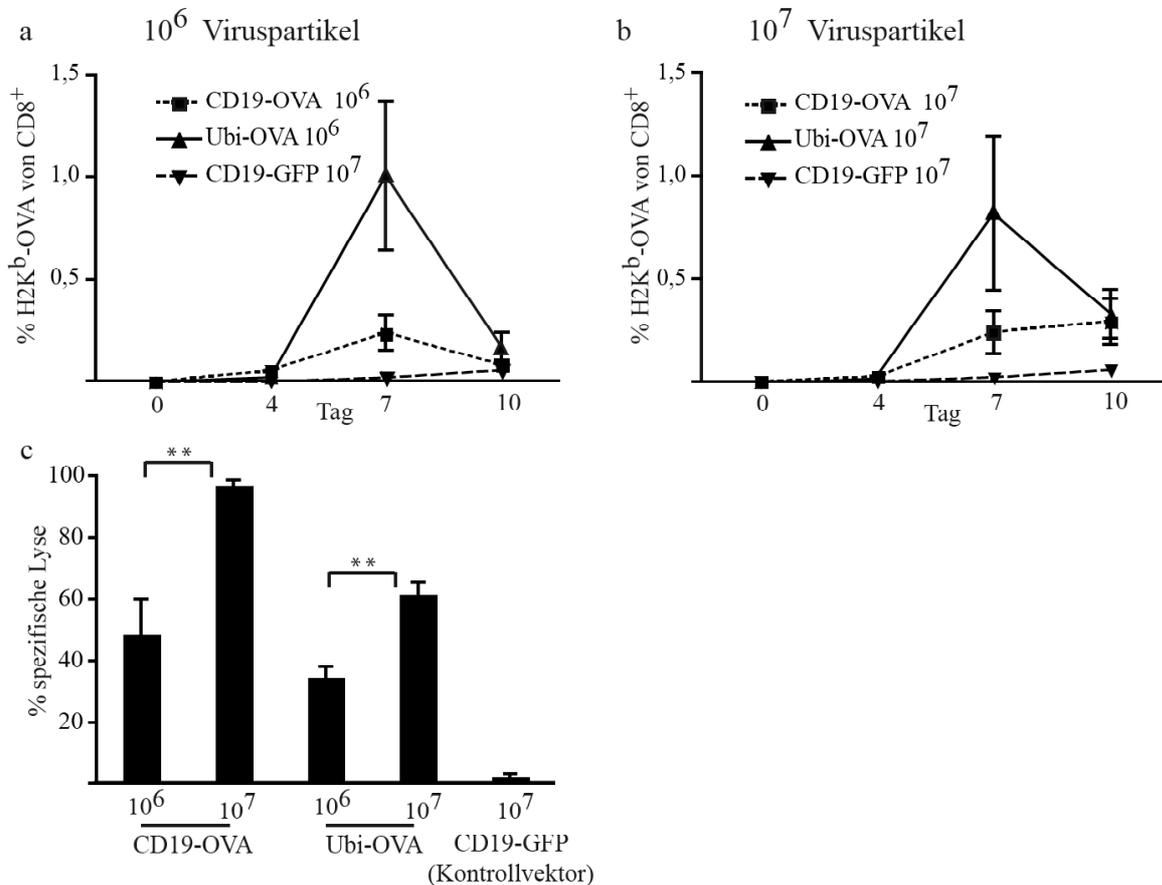


**Abb. 5.17: Antigen-spezifische Stimulation des endogenen CD8<sup>+</sup>T-Zellrepertoires nach Immunisierung mit Lentiviren.** **a:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. C57BL/6-Mäuse wurden am Tag 0 mit 1kb-CD19-OVA, Ubi-OVA oder CD19-GFP (Kontrollvektor; n = 3 Mäuse/Gruppe) immunisiert. In den folgenden 10 Tagen wurde die Frequenz endogener OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-Tetrameren und einem monoklonalen anti-CD8-Antikörper im peripheren Blut durchflusszytometrisch analysiert. Am Tag 12 nach Immunisierung wurde außerdem ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. **b:** Die Punktwolkendiagramme zeigen exemplarisch die Frequenz endogener OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen im peripheren Blut am Tag 7 nach Immunisierung.

Wie erwartet war die Frequenz endogener OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen im peripheren Blut insgesamt sehr gering und machte auch nach Immunisierung maximal etwa 1 % der CD8<sup>+</sup>-Gesamtpopulation im Blut aus (Abb. 5.18a, b). In diesem System gibt es eine große Varianz bzgl. der Frequenz tetramer-positiver CD8<sup>+</sup>T-Zellen, da die Mäuse, obwohl sie syngen sind, ein unterschiedliches T-Zellrepertoire besitzen.

Mit beiden Dosen Ubi-OVA konnten mehr Tetramer-positive Zellen detektiert werden als nach Immunisierung mit den entsprechenden Mengen 1kb-CD19-OVA. Beide Vektoren führten zu einer dosisunabhängigen Expansion, deren Höhepunkt am Tag 7 nach Immunisierung erreicht wurde, also 3 Tage später als in den vorangegangenen Experimenten mit OT-1 Transfer. Der prozentuale Anteil der OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen im Blut ging zwischen Tag 7 und 10 deutlich zurück, nur nach Immunisierung mit

$10^7$  Partikeln 1kb-CD19-OVA blieb der Prozentsatz endogener T-Zellen auch am Tag 10 unverändert.



**Abb. 5.18: Kinetik der Expansion eines polyklonalen CD8<sup>+</sup>T-Zellrepertoires in peripherem Blut und *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA bzw. Ubi-OVA. a:** Kinetik nach Immunisierung mit  $10^6$  viralen Partikeln. Kontrollvektor: CD19-GFP ( $10^7$  Partikel). **b:** Kinetik nach Immunisierung mit  $10^7$  viralen Partikeln. Kontrollvektor: CD19-GFP ( $10^7$  Partikel). **c:** Am Tag 12 wurde ein auf CFSE basierender *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt und die spezifische Lyse von SIINFEKL-beladenen, CFSE-markierten Zielzellen nach 6 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Experimente (n = 3 Mäuse/Gruppe). Gezeigt sind Durchschnittswerte ( $\pm$  SD) des Prozentsatzes endogener OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen bzw. der spezifischen Lyse.

Am Tag 12 nach Immunisierung wurde auch hier ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt um zu überprüfen, ob auch die endogenen OVA-spezifischen T-Zellen in der Lage sind, SIINFEKL-beladene Zielzellen zu eliminieren (Abb. 5.18c). Die durchflusszytometrische Analyse der Milz erfolgte 6 Stunden nach dem Transfer der CFSE-markierten Zielzellen.

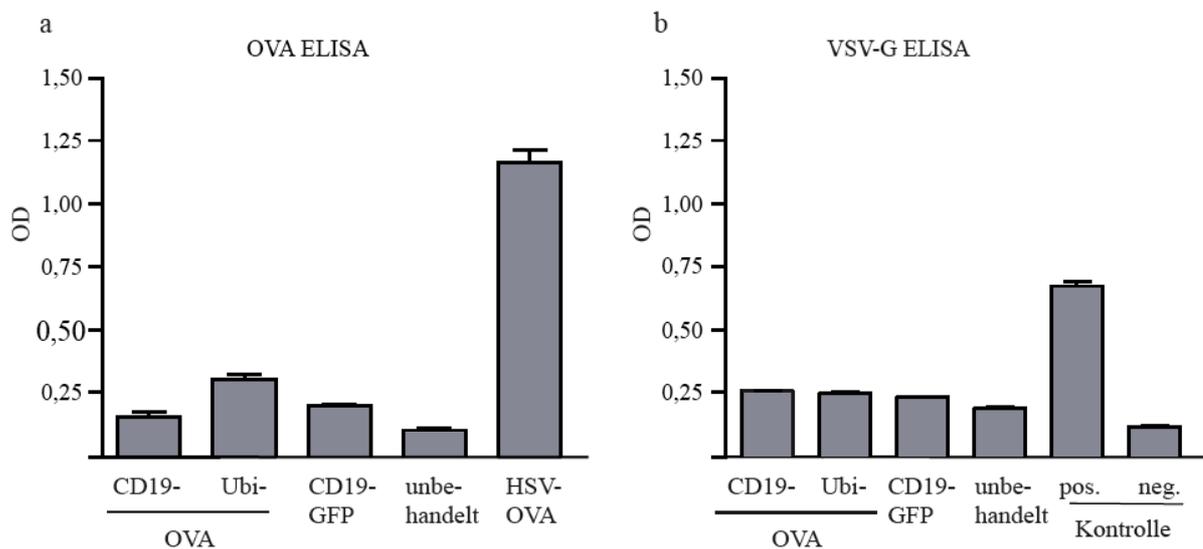
Aufgrund der geringen Frequenz endogener OVA-spezifischer T-Zellen wurden insgesamt weniger Zielzellen eliminiert als in den Experimenten mit OT-1 Transfer. Es zeigte sich für

beide verwendeten Vektoren mit der hohen viralen Dosis eine hochsignifikante Steigerung der spezifischen Lyse gegenüber Tieren, die mit der niedrigen Dosis immunisiert worden waren. Mit 1kb-CD19-OVA stieg die spezifische Lyse von  $48,72 \pm 11$  % (niedrige Dosis) auf  $96,54 \pm 1,88$  % (hohe Dosis)  $p = 0,0038$ , mit Ubi-OVA von  $34,32 \pm 3,46$  % (niedrige Dosis) auf  $61,25 \pm 3,94$  % (hohe Dosis)  $p = 0,0019$ . Die Expansion der OVA-spezifischen endogenen T-Zellen im Blut hatte sich dagegen für beide Vektoren dosisunabhängig dargestellt.

Die überraschend hohe spezifische Lyse nach Immunisierung mit  $10^7$  Partikeln 1kb-CD19-OVA kann ihre Ursache in der erhöhten Frequenz OVA-spezifischer endogener T-Zellen haben, die bereits in der Blutanalyse an Tag 10 nach Immunisierung beobachtet worden war.

### 5.3.3 Antikörper-Antwort nach lentiviraler Immunisierung

In weiteren Studien sollte überprüft werden, ob es nach systemischer Gabe der lentiviralen Vektoren zu einer Antikörperantwort kommt, die gegen das virale Hüllprotein VSV-G oder das Modellantigen OVA gerichtet ist.



**Abb. 5.19: Nachweis einer Antikörperantwort nach Immunisierung mit Lentiviren.** C57BL/6-Mäuse wurden mit folgenden OVA-kodierenden Lentiviren immunisiert: CD19-OVA, Ubi-OVA ( $10^6$  Partikel,  $n = 3$  Mäuse/Gruppe). Serum wurde an Tag 21 gewonnen. Der relative IgG-Antikörpertiter wurde mit ELISA bestimmt. **a:** OVA-spezifischer Gesamt-IgG Antikörperrnachweis (Serumverdünnung 1:50) Als Kontrollvektoren dienten CD19-GFP ( $10^6$  Partikel) und HSV-OVA ( $10^6$  Partikel). **b:** VSV-G-spezifischer Gesamt-IgG Antikörperrnachweis (Serumverdünnung 1:200) Positive Kontrolle: VSV-G spezifischer Antikörper (50ng/ml); negative Kontrolle: ohne Antikörper.

Dazu wurden C57BL/6-Mäuse mit  $10^6$  viralen Partikeln der Vektoren 1kb-CD19-OVA und Ubi-OVA i.v. immunisiert. Als Kontrolle diente der lentivirale Vektor 1kb-CD19-GFP, der eine VSV-G Hülle besitzt, aber kein OVA kodiert, sowie der replikationsdefiziente, rekombinante HSV-1-basierte Vektor HSV-OVA [Lauterbach *et al.*, 2004], welcher OVA kodiert aber keine VSV-G Hüllproteine besitzt.

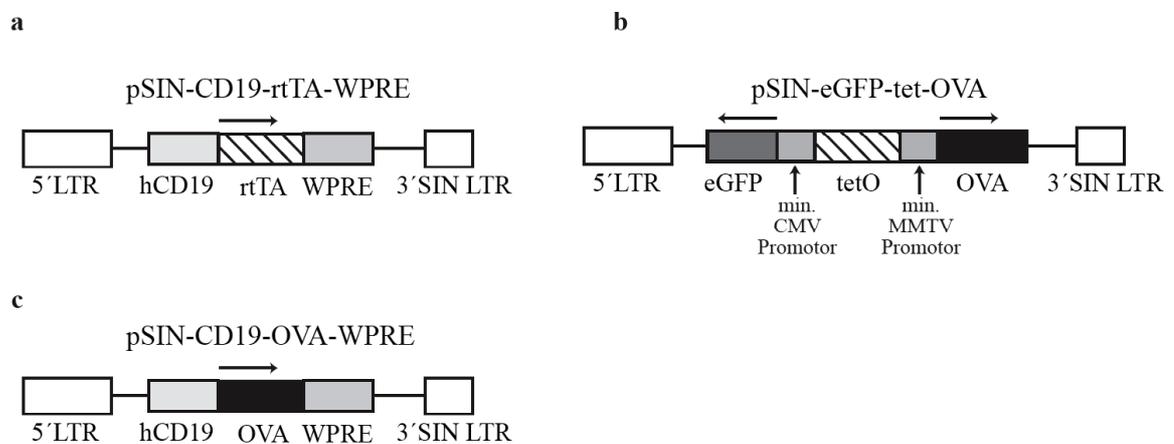
Vor der Immunisierung wiesen die Mäuse im ELISA keine OVA- oder VSV-G-spezifischen IgG-Antikörper auf (Daten nicht gezeigt). An Tag 21 nach Immunisierung wurde Serum gewonnen und OVA- bzw. VSV-G-spezifische Gesamt-IgG-Antikörper mittels ELISA bestimmt (Abb. 5.19a, b). Wie in Abb. 5.19a dargestellt, führte nur die Immunisierung mit HSV-OVA zur Bildung entsprechender IgG-Antikörper. Nach systemischer Gabe der lentiviralen Vektoren konnte keine IgG-Antikörperantwort gemessen werden, weder wenn OVA nur in B-Zellen exprimiert wurde (1kb-CD19-OVA), noch nach ubiquitärer Expression (Ubi-OVA).

Auch das Hüllprotein VSV-G löste nach Immunisierung mit keinem der untersuchten viralen Vektoren eine spezifische IgG-Antikörperantwort aus (Abb. 5.19b). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es nach der intravenösen Immunisierung nicht zu einer Eliminierung freier Viruspartikel oder OVA-exprimierender Zellen durch neutralisierende IgG-Antikörper kommt.

### **5.4 Entwicklung eines induzierbaren gammaretroviralen Vektorsystems**

Als funktionelle Weiterentwicklung des beschriebenen konstitutiven B-zellspezifischen Genexpressionssystems sollte nun ein induzierbares gammaretrovirales Expressionssystem etabliert werden, welches nur in B-Zellen aktiv ist. Dies sollte mit Hilfe eines MLV-basierten gammaretroviralen Vektorsystems erreicht werden, in welchem die Induktion der Genexpression unter der Kontrolle des sogenannten „Tet-on“ Systems steht. Dieses beruht auf dem Tetracyclin-Resistenzoperon von *E.coli* und erlaubt die Expression eines Transgens nur in Gegenwart des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin. Das „Tet-on“ System besteht aus zwei regulatorischen Komponenten: dem reversen Transaktivator rtTA und der tet-Operator Sequenz tetO. In Gegenwart von Doxycyclin kann rtTA an tetO binden, wodurch die Transkription des Transgens ermöglicht wird [Gossen and Bujard, 2002]

In der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden regulatorischen Elemente von zwei unabhängigen gammaretroviralen Vektoren exprimiert (Abb. 5.20a, b). Die B-Zellspezifität des Expressionssystems sollte durch das bereits unter 5.1 beschriebene 1kb-Fragment des humanen CD19-Promotors erreicht werden, unter dessen Kontrolle die Expression des reversen Transaktivators stand. Eine bidirektionale gleichzeitige Expression zweier Transgene wurde durch die Fusion der tet-Operator Sequenz *tetO* mit zwei minimalen viralen Promotoren erreicht [Baron *et al.*, 1995]. Als Transgene wurden GFP und OVA ausgewählt (Abb. 5.20b, c). Als positive Kontrolle für verschiedene Experimente bezüglich der OVA-Expression diente der gammaretrovirale Vektor pSIN-CD19-OVA-WPRE (Abb. 5.20c), in welchem die konstitutive Expression von OVA unter Kontrolle des humanen 1kb-CD19 Promotors stand [Werner *et al.*, 2004]. Das posttranskriptionell regulatorische Element des Hepatitis Virus des Waldmurmeltiers, WPRE, sollte auch hier, wie bereits häufig im Zusammenhang mit gammaretroviralen wie auch lentiviralen Vektoren beschrieben, die Expression der Transgene erhöhen [Moreau-Gaudry *et al.*, 2001; Ramezani *et al.*, 2000; Schambach *et al.*, 2000; Schwenter *et al.*, 2003; Zufferey *et al.*, 1999].



**Abb. 5.20: Schematische Darstellung der gammaretroviralen SIN-Vektoren zur Generierung von Knochenmarkschimären.** **a:** Gammaretroviraler Vektor, in welchem die Expression des reversen Transaktivators (rtTA) unter der Kontrolle eines 1kb-Fragments des humanen CD19-Promotors steht. **b:** Gammaretroviraler Vektor, der das Doxycyclin-responsive Element (*tetO*) enthält, sowie die beiden Transgene eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und OVA (Hühnerei-Albumin), deren bidirektionale Expression von einem minimalen CMV-Promotor (eGFP) bzw. einem minimalen MMTV-Promotor (OVA) ausgeht. **c:** Gammaretroviraler Vektor, in welchem die Expression des Transgens OVA unter Kontrolle eines 1kb-Fragments des humanen CD19-Promotors steht. CMV, Cytomegalovirus; MMTV, *mouse mammary tumor virus*; LTR, lange terminale Wiederholungssequenz (*long terminal repeat*); SIN, selbst-inaktivierend; eGFP, verbessertes grünfluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein*); WPRE, posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers (*woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element*); Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an.

### 5.4.1 Untersuchung von unspezifischer Hintergrundexpression und Induzierbarkeit der Genexpression

Um Aufschluss über die Induzierbarkeit der Genexpression sowie eine mögliche Hintergrundexpression der Transgene GFP und / oder OVA in Abwesenheit von Doxycyclin zu erhalten, wurden Knochenmarkschimären generiert (Schema Abb. 5.2). Nach der Isolation des Knochenmarks wurde dieses *ex vivo* gleichzeitig mit Virusüberständen der Vektoren pSIN-CD19-rtTA-WPRE **und** pSIN-eGFP-tet-OVA transduziert. Um später in den Chimären eine B-zellspezifische und induzierbare Transgenexpression zu erreichen, müssen sich diese beiden viralen Konstrukte in der gleichen Zellen befinden.

Anschließend wurde das transduzierte Knochenmark zur Rekonstitution des hämatopoetischen Systems von letal bestrahlten syngenem Empfängermäusen verwendet. Als Rekonstitutionskontrolle diente eine Gruppe, welcher HSPC injiziert wurden, die mit virusfreiem Medium transduziert worden waren (Daten nicht gezeigt).

Acht Wochen nach Transplantation des transduzierten Knochenmarks hatte sich in den Rezipienten das hämatopoetische System rekonstituiert und konnte hinsichtlich der Transgenexpression untersucht werden.

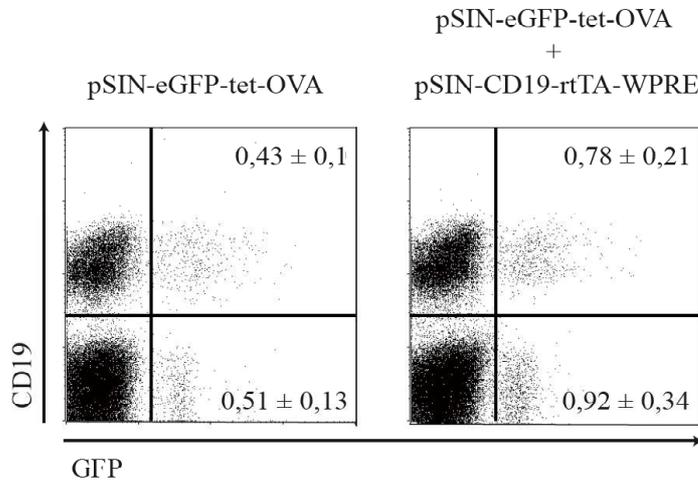
#### 5.4.1.1 Expression von GFP

Zunächst wurde die Hintergrundexpression von GFP, d.h. in Abwesenheit des Transaktivators bzw. in Abwesenheit von Doxycyclin, untersucht. Zu diesem Zwecke wurden Chimären generiert, deren Knochenmark entweder nur mit dem transgenkodierenden Vektor pSIN-eGFP-tet-OVA, oder aber mit beiden Vektoren des induzierbaren Systems (pSIN-CD19-rtTA-WPRE + pSIN-eGFP-tet-OVA) transduziert worden war.

Acht Wochen nach Transplantation wurde die GFP-Expression in B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) bzw. Nicht-B-Zellen (CD19<sup>-</sup>) in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt.

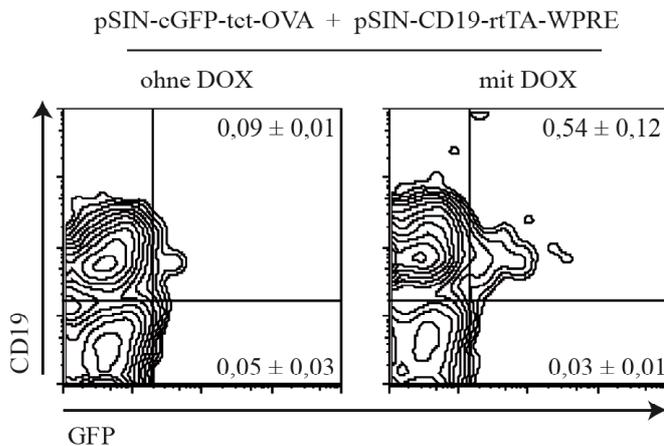
Bereits nach Transduktion mit dem transgenkodierenden Vektor allein konnte eine leichte Hintergrundexpression von GFP in CD19<sup>+</sup>B-Zellen sowie auch in der Fraktion CD19<sup>-</sup> negativer Zellen beobachtet werden. Nach Transduktion mit beiden retroviralen Vektoren des induzierbaren Systems, jedoch in Abwesenheit von Doxycyclin, nahm diese

unspezifische GFP-Expression sowohl in B-Zellen als auch in Nicht-B-Zellen weiter zu (Abb. 5.21). Diese Zunahme war jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,29$ ).



**Abb. 5.21: Hintergrundexpression von GFP in Knochenmarkschimären.** Knochenmark wurden mit dem Vektor GFP-tet-OVA allein, oder zusammen mit dem Vektor CD19-rtTA transduziert und in syngene letal bestrahlte Rezipienten transplantiert ( $n = 3$  Mäuse/Gruppe). Acht Wochen nach Transplantation wurde die Frequenz GFP-exprimierender B-Zellen ( $CD19^+$ ) bzw. Nicht-B-Zellen ( $CD19^-$ ) in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente, die mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

Das in Abb. 5.21 exemplarisch dargestellte Ergebnis der FACS-Analysen traf für die meisten untersuchten Chimären zu und führte zu der Annahme, dass der verwendete minimale CMV-Promotor noch genug intrinsische Aktivität besitzt, um die Transkription des GFP-Gens auch ohne die Bindung des Transaktivators *rtTA* an *tetO* unter dem Einfluss von Doxycyclin zu erlauben.



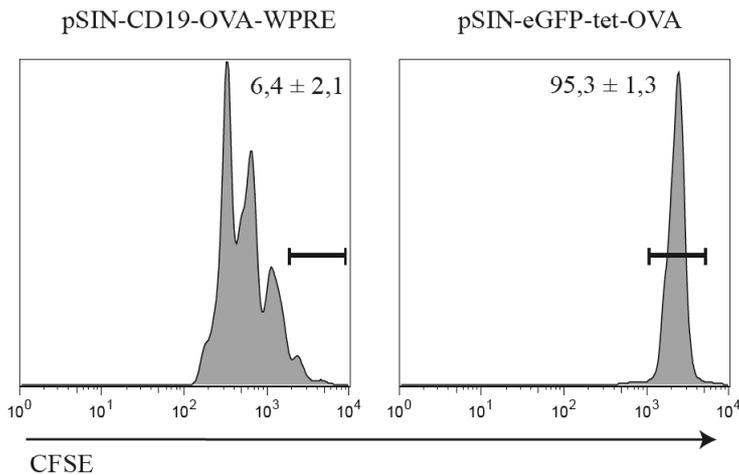
**Abb. 5.22: Induzierbarkeit der GFP-Expression in Knochenmarkschimären.** Zur selektiven Induktion der Genexpression in B-Zellen wurde 4 mg/ml Doxycyclin ins Trinkwasser der in Abb. 5.21 beschriebenen Knochenmarkschimären gegeben (n = 3 Mäuse/Gruppe). Zwei Tage später wurde die Expression von GFP in B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) bzw. Nicht-B-Zellen (CD19<sup>-</sup>) der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente, die mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

In einigen wenigen Fällen entsprachen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie eher den theoretischen Erwartungen, denn hier zeigte sich in der Milz von Chimären, die mit beiden Vektoren rekonstituiert worden waren, nur eine marginale GFP-Expression sowohl in B-Zellen, als auch in Nicht-B-Zellen vor Doxycyclin-Gabe (Abb. 5.22). Die Genexpression konnte zudem B-zellspezifisch durch die Aufnahme von Doxycyclin über das Trinkwasser induziert werden. Der Anteil GFP-exprimierender B-Zellen nach Induktion machte jedoch in allen untersuchten Chimären weniger als 1 % der gesamten B-Zellpopulation aus (Abb. 5.22 und Daten nicht gezeigt).

### 5.4.1.2 Expression von OVA

Neben GFP wurde auch die Expression von OVA in den Chimären untersucht. Da diese nicht wie im Falle von GFP auf direktem Wege durchflusszytometrisch analysiert werden kann, wurde hier das transgene OT-1 Mausmodell mit OVA-spezifischen T-Zellen zur Hilfe genommen.

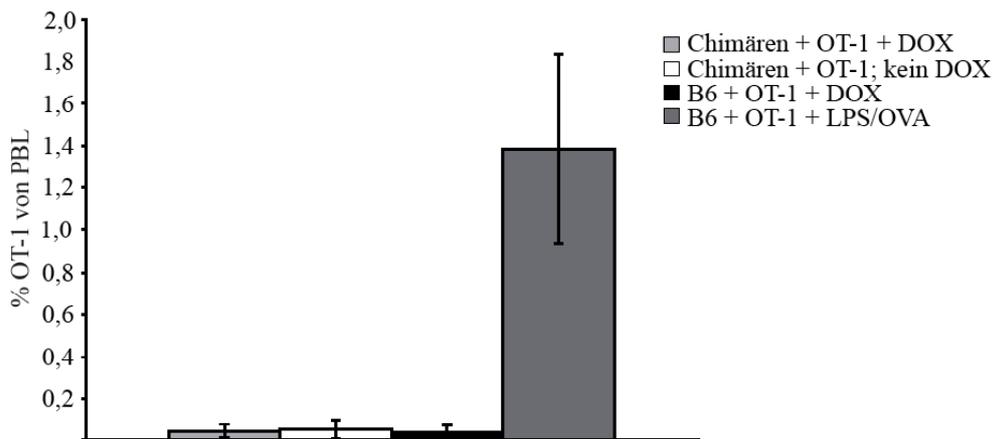
Um eine unspezifische Expression von OVA detektieren zu können, wurden OT-1 T-Zellen isoliert, mit CFSE markiert und in die induzierbaren Chimären transferiert, die mit den Vektoren pSIN-eGFP-tet-OVA und pSIN-CD19-rtTA-WPRE rekonstituiert worden waren. Als positive Kontrolle diente eine Gruppe Chimären, die OVA konstitutiv in B-Zellen exprimierten (Vektor: pSIN-CD19-OVA-WPRE).



**Abb. 5.23: Hintergrundexpression von OVA in Knochenmarkschimären.** HSPC wurden mit den Vektoren pSIN-eGFP-tet-OVA und pSIN-CD19-rtTA-WPRE, oder dem B-zellspezifischen OVA-kodierenden Kontrollvektor pSIN-CD19-OVA-WPRE transduziert und in syngene letal bestrahlte Rezipienten transplantiert (n = 3 Mäuse/Gruppe). Acht Wochen nach Transplantation wurden  $2 \times 10^6$  CFSE-markierte OT-1 T-Zellen pro Chimäre adoptiv transferiert. Drei Tage nach Transfer wurde die Teilung der OT-1 T-Zellen in der Milz anhand der CFSE-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente, die mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

Drei Tage nach dem adoptiven Transfer der OT-1 T-Zellen wurde ihre Proliferation in der Milz der Chimären durchflusszytometrisch analysiert. Wie in den Histogrammen in Abb. 5.23 dargestellt, kam es in den induzierbaren Chimären nicht zu einer Proliferation der OT-1 T-Zellen (rechtes Histogramm). In den pSIN-CD19-OVA-WPRE Kontrollchimären dagegen war eine Proliferation der OVA-spezifischen T-Zellen anhand der schrittweisen Abnahme der CFSE-Färbung zu erkennen (linkes Histogramm). Es kam somit, im Gegensatz zu den Ergebnissen für GFP, nicht zu einer nachweisbaren Expression von OVA unter der Kontrolle des minimalen MMTV-Promotors.

Als nächster Schritt sollte nun mit Doxycyclin die selektive Expression von OVA in B-Zellen induziert werden. Dazu erhielten die Chimären 4mg/ml Doxycyclin im Trinkwasser und in den folgenden sieben Tagen wurde die Kinetik der Induktion der Genexpression anhand des Prozentsatzes von OT-1 T-Zellen im Blut der Tiere durchflusszytometrisch bestimmt. Als negative Kontrolle dienten Chimären, die nicht mit Doxycyclin behandelt wurden, bzw. naive C57BL/6-Mäuse, die OT-1 T-Zellen und Doxycyclin erhielten. Die positive Kontrollgruppe bestand aus naiven C57BL/6-Mäusen, die nach dem Transfer der OT-1 T-Zellen mit LPS und OVA immunisiert wurden.



**Abb. 5.24: Induzierbarkeit der OVA-Expression in Knochenmarkschimären.** Zur Generierung der Knochenmarkschimären wurden HSPC mit den Vektoren pSIN-eGFP-tet-OVA und pSIN-CD19-rtTA-WPRE kotransduziert und in syngene letal bestrahlte Rezipienten transplantiert (n = 3 Mäuse/Gruppe). Acht Wochen nach Transplantation wurden  $2 \times 10^6$  OT-1 T-Zellen pro Chimäre adoptiv transferiert. Zur selektiven Induktion der Expression von OVA in B-Zellen wurde einen Tag nach OT-1 Transfer 4 mg/ml Doxycyclin ins Trinkwasser der Knochenmarkschimären gegeben. An den folgenden sieben Tagen wurde die Frequenz der OT-1 T-Zellen im Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist der prozentuale Anteil von OT-1 T-Zellen im Blut an Tag drei nach Induktion der Genexpression mit Doxycyclin, bzw. Immunisierung mit LPS/OVA in der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente (jeweils n = 3 Mäuse/Gruppe), die mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden. B6, C57BL/6-Maus; LPS, Lipopolysaccharid; PBL, periphere Blutlymphozyten.

In Abb. 5.24 ist exemplarisch der prozentuale Anteil von OT-1 T-Zellen im Blut an Tag drei nach Induktion der Genexpression mit Doxycyclin gezeigt. Nur in der positiven Kontrollgruppe ist eine Proliferation der OVA-spezifischen T-Zellen zu beobachten. In den Chimären verhielten sich die transferierten OT-1 T-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten wie in den beiden negativen Kontrollgruppen, d.h. es gab keinerlei Proliferation. Es muss also davon ausgegangen werden, dass entweder keine OVA-Expression induziert werden konnte oder die möglicherweise induzierte OVA-Expression für eine OT-1 Proliferation nicht ausreichend war.

Es lässt sich zusammenfassen, dass mit dem hier vorgestellten gammaretroviralen Vektorsystem keine induzierbare Genexpression in B-Zellen erreicht werden konnte. Daher musste von geplanten Untersuchungen zur funktionellen Rolle der Genexpression während verschiedener Stadien der B-Zellentwicklung im Rahmen der vorliegenden Arbeit abgesehen werden.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Entwicklung B-zellspezifischer lentiviraler Vektoren

Mit Hilfe eines HIV-1 basierten lentiviralen Vektorsystems sollte die konstitutive Expression eines Transgens in B-Zellen ermöglicht werden. Lentivirale Vektorsysteme haben verschiedene Vorteile gegenüber anderen viralen Expressionssystemen. So können sie beispielsweise neben teilungsaktiven auch ruhende Zellen transduzieren [Naldini *et al.*, 1996; Reiser *et al.*, 1996], was sie besonders auch für gentherapeutische Anwendungen interessant macht. Darüber hinaus wurde durch die Entwicklung lentiviraler SIN-Vektoren das Risiko einer ungewollten Aktivierung zellulärer Gene im Bereich des viralen Integrationsortes minimiert [Ryu *et al.*, 2008].

Eine Transgenexpression in verschiedenen Zelltypen hämatopoetischen Ursprungs mit Hilfe lentiviraler Vektoren wurde beispielsweise für DCs, Langerhans Zellen, Makrophagen und T-Zellen berichtet [Dresch *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2008; Marodon *et al.*, 2003]. Auch reife murine B-Zellen, sowie primäre B-Zellen, die aus humanen CD34<sup>+</sup>-positiven Vorläuferzellen differenziert wurden, konnten erfolgreich mit zellspezifischen Lentiviren transduziert werden [Rossi *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2004]. In der vorliegenden Arbeit sollte eine B-zellspezifische Genexpression *in vivo* durch das bereits beschriebene 1kb-Fragment des humanen CD19-Promotors [Werner *et al.*, 2004] vermittelt werden (Abb. 5.1). Zudem wurde auch ein kürzeres Promotorfragment generiert und getestet (0,2kb-CD19-Promotor; Abb. 5.1). Es handelte sich dabei um die ersten 222 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes des CD19-Gens. In lentiviralen Vektoren stehen zwar bis zu 8kb für regulatorische Sequenzen und Transgene zur Verfügung, der Titer nimmt jedoch halblogarithmisch zur Vektorgröße ab [Kumar *et al.*, 2001]. Um hohe virale Titer auch ohne nachträgliche Anreicherungsschritte erreichen zu können, erschien es deshalb als günstig, eine möglichst kleine, aber dennoch B-zellspezifische Regulationseinheit in den Vektor zu integrieren.

Zunächst wurden beide Promotoren (1kb-CD19- und 0,2kb-CD19-Fragment) in Knochenmarkschimären dahingehend untersucht, ob mit ihnen eine B-zellspezifische Genexpression im Kontext eines lentiviralen Systems möglich ist. Die Transduktion hämatopoetischer Stammzellen mit den beschriebenen Vektoren sollte zu einer kontinuierlichen Transgenexpression in den B-Zellen der Chimären führen, die bereits in

frühen Entwicklungsstadien im Knochenmark beginnt und bis hin zur reifen B-Zelle in der Milz erhalten bleibt. Um dieses Konzept zu überprüfen, wurde GFP als Reporter gen ausgewählt.

Die Analyse der GFP-Expression in den Chimären zeigte, dass in allen untersuchten Organen und Geweben mit dem 1kb-CD19-Promotor eine höhere Frequenz GFP-positiver B-Zellen detektiert werden konnten als mit dem 0,2kb-CD19-Promotor (Abb. 5.3 – 5.6). Dies traf vor allem auf reife B-Zellen in Milz und Lymphknoten (Abb. 5.3 und 5.4) sowie auf unreife und transitionale B-Zellen in der Milz zu (Abb. 5.6). Nur in frühen Entwicklungsstadien wie dem Pro-/Prä-B-Zellstadium im Knochenmark konnte mit dem 0,2kb-CD19-Promotor eine vergleichbare Frequenz GFP-exprimierender Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5.5).

Bei der Analyse der GFP-Expression während der B-Zellentwicklung konnte in allen untersuchten Entwicklungsstadien im Knochenmark mit beiden Promotoren eine kontinuierliche Zunahme der Transgenexpression im Verlauf der B-Zellreifung beobachtet werden (Abb. 5.5). Dies entspricht den Erkenntnissen zur Regulation des CD19-Gens, denn es wurde sowohl für murine als auch für humane B-Zellen eine Zunahme der CD19-Expression während der B-Zellentwicklung beschrieben [Sato *et al.*, 1997; Wolf *et al.*, 1991]. In der Milz blieb die GFP-Expression mit dem 0,2kb-CD19-Promotor in allen Entwicklungsstadien konstant und lag bei durchschnittlich 4 % aller B-Zellen. Mit dem 1kb-CD19-Promotor dagegen ging die GFP-Expression während der B-Zellreifung in der Milz um die Hälfte zurück (Abb. 5.6). Trotzdem exprimierten noch knapp 14 % der reifen B-Zellen GFP. Somit konnte in der Milz das in der Literatur beschriebene Expressionsmuster des CD19-Gens nicht rekapituliert werden.

Hinsichtlich der Spezifität der beiden Promotoren zeigte der 1kb-CD19-Promotor wider Erwarten mehr Aktivität in CD19-negativen Zellen als dies mit dem 0,2kb-CD19-Promotor der Fall war. In myeloiden Zellen und vor allem T-Zellen der Milz verursachte der 1kb-CD19-Promotor eine GFP-Hintergrundexpression im Bereich von 3 – 4 % der jeweiligen Zellpopulation. Auch für T-Zellen in Lymphknoten traf dies zu, wobei jedoch in diesem Organ die unspezifische GFP-Expression in myeloiden Zellen 50 % geringer war als in der Milz. Es kam vor allem in T-Zellen zu einer unspezifischen Transgenexpression, obwohl T-Zellen zu den wenigen Zelltypen gehören, die einer Transduktion durch Lentiviren nicht zugänglich sind, sofern sie gerade das G<sub>0</sub>-Stadium des Zellzyklus durchlaufen. Es befinden

sich jedoch nicht alle T-Zellen gleichzeitig in diesem Stadium. Zudem kann HIV-1 auch ruhende T-Zellen latent infizieren [Dardalhon *et al.*, 2001a; Dardalhon *et al.*, 2001b; Ducrey-Rundquist *et al.*, 2002]. Der 1kb-CD19-Promotor sollte auch durch seine größere regulatorische Sequenz eine entsprechend spezifischere Transgenexpression in B-Zellen vermitteln. Ein Fragment des humanen CD19-Promotors vergleichbarer Größe und Position wurde bereits im Kontext eines lentiviralen Transduktionssystems als B-zellspezifisch in humanen Zellen beschrieben, wohingegen ein kleineres, 230 bp umfassendes Fragment, welches deckungsgleich mit dem hier verwendeten 222 bp-Fragment liegt, eine schwache Promotoraktivität aufwies, die nicht allein auf B-Zellen beschränkt war [Moreau *et al.*, 2004]. Die Sequenz der Promotorregionen des humanen und murinen CD19-Gens sind nicht völlig identisch [Kozmik *et al.*, 1992], was ein Grund dafür sein kann, dass der humane CD19-Promotor in Mäusen anders reguliert wird, als dies im humanen System der Fall ist.

Die B-Zellspezifität und Stärke der Transgenexpression, die in Knochenmarkschimären mit dem 1kb-CD19-Promotor erreicht werden konnte, war dennoch dem 0,2kb-CD19-Promotor überlegen und wurde als ausreichend erachtet, um diesen Promotor für weitere funktionelle Experimente mit dem Modellantigen OVA zu verwenden.

## **6.2 Systemische Anwendung lentiviraler Vektoren**

Die Transduktion hämatopoetischer Stammzellen mit B-zellspezifischen viralen Vektoren führt zu einer kontinuierlichen Generierung antigenexprimierender und potentiell tolerogener B-Zellen [Werner-Klein *et al.*, 2007]. Eine systemische Anwendung viraler Vektoren dagegen löst in der Regel eine starke Immunantwort aus und führt zu einer transienten Genexpression in Zielzellen [Brown *et al.*, 2007]. Verschiedene Gruppen konnten bereits zeigen, dass durch die systemische Anwendung lentiviraler Vektoren (z.B. intravenös, subkutan) eine transgenspezifische Immunantwort ausgelöst werden kann [Esslinger *et al.*, 2003; Firat *et al.*, 2002; Palmowski *et al.*, 2004]. Aufgrund ihres positiven Sicherheitsprofils [Uchida *et al.*, 2009] sind HIV-1 basierte lentivirale Vektoren der neuesten Generation besonders gut für systemische gentherapeutische Anwendungen geeignet. In diesem Zusammenhang ist eine spezifische Genexpression in antigenpräsentierenden Zellen von Vorteil, um gezielte Immunreaktionen z.B. gegen

Tumorzellen auslösen zu können. Die systemische Anwendung eines B-zellspezifischen lentiviralen Vektors wurde bislang noch nicht berichtet.

Nachdem in Experimenten mit Knochenmarkschimären die B-Zellspezifität des im Rahmen dieser Arbeit generierten lentiviralen Vektors nachgewiesen werden konnte, sollte dieser nun für intravenöse Immunisierungen eingesetzt werden. Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse der GFP-Expression wurde gezeigt, dass das B-zellspezifische Expressionsprofil des Vektors auch im Rahmen dieser neuen Applikationsroute erhalten bleibt (Abb. 5.9). Als positive Kontrolle diente in diesem experimentellen Ansatz ein Vektor, in dem die Expression von GFP unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin C-Promotors steht (Abb. 5.7). Dieser erlaubt eine starke Transgenexpression in verschiedenen Zelltypen, darunter auch Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie B-Zellen und DCs [Schorpp *et al.*, 1996].

Die funktionelle Lokalisation GFP-exprimierender B-Zellen in der Milz wurde ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde deutlich, dass nach systemischer Anwendung der viralen Vektoren vor allem die B-Zellen in der Marginalzone der Milz das Transgen exprimieren (Abb. 5.11). Dies war unabhängig davon, ob mit 1kb-CD19-GFP oder Ubi-GFP immunisiert wurde. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten der Milz gehören die B-Zellen der Marginalzone der Milz zu den ersten APCs, die mit lentiviralen Vektoren in Kontakt kommen, wenn diese nach einer systemischen Immunisierung über den Blutstrom in die Milz gelangen [Zandvoort *and Timens*, 2002]. Anhand histologischer Schnitte der Milz könnten noch genauere Aussagen über die Lokalisation der transduzierten Zielzellen gemacht werden, doch aufgrund der schwachen GFP-Expression unter Kontrolle des 1kb-CD19-Promotors war ihre Auswertung trotz immunhistochemischer Verstärkung des GFP-Fluoreszenzsignals nicht aussagekräftig (Daten nicht gezeigt).

Die Frequenz GFP-positiver B-Zellen in der Milz war im Vergleich zu den Knochenmarkschimären stark vermindert. Eine geringe Frequenz transgenexprimierender Zellen nach systemischer Anwendung lentiviraler Vektoren wurde bereits verschiedentlich berichtet [Lopes *et al.*, 2008; Rowe *et al.*, 2006]. Die intravenöse Immunisierung mit lentiviralen Vektoren induziert vor allem in Leber und Milz eine vorübergehende, heftige Interferonproduktion durch das angeborene Immunsystem, was einerseits die Transduktionseffizienz vermindert und andererseits zu einer Eliminierung transduzierter Zellen führt [Brown *et al.*, 2007].

### 6.2.1 Stimulation eines transgenen bzw. polyklonalen CD8<sup>+</sup>T-Zellrepertoires

In funktionellen Experimenten sollte geklärt werden, ob nach systemischer Applikation die Expressionsstärke des Modellantigens OVA in B-Zellen ausreichend ist, um antigenspezifische CD8<sup>+</sup>T-Zellen zu stimulieren.

B-Zellen können Antigen präsentieren, das sie zuvor mit Hilfe ihres BCR internalisiert haben. Auf diese Weise können sie selbst geringste Mengen löslichen Antigens konzentrieren. Die Präsentation erfolgt dabei über MHC II, das von CD4<sup>+</sup>T-Zellen erkannt wird [Batista and Neuberger, 1998]. Um zu klären, ob B-Zellen nach einer systemischen Anwendung lentiviraler Vektoren in der Lage sind, auch antigenspezifische CD8<sup>+</sup>T-Zellen zu stimulieren, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, in welchem B-Zellen das Modellantigen OVA im Zytosol translatieren und somit auf MHC I präsentieren. Eine weitere Möglichkeit, exogenes Antigen auf MHC I zu präsentieren, ist die sogenannte Kreuzpräsentation [Bevan, 1976a; b], die hauptsächlich durch DCs vermittelt wird [Shen et al., 1997]. Eine vergleichbare Kreuzpräsentation von Antigen durch B-Zellen wurde bisher nur unter *in vitro*-Bedingungen nachgewiesen [Heit et al., 2004; Ke and Kapp, 1996].

In den zuvor durchgeführten Immunisierungen mit den GFP-kodierenden lentiviralen Vektoren konnte, im Gegensatz zu den Ergebnissen in Knochenmarkschimären, trotz des Einsatzes einer hohen viralen Dosis ( $10^8$  Partikel) nur eine geringe Frequenz GFP-exprimierender Zellen detektiert werden.

Im Rahmen der Immunisierung mit den OVA-kodierenden Vektoren sollte deshalb zunächst ein transgenes CD8<sup>+</sup>T-Zellrepertoire stimuliert werden. Die verwendeten OT-1 T-Zellen reagieren bereits auf geringe Mengen des OVA-Peptids SIINFEKL sehr sensitiv, was beispielsweise anhand ihrer Expansion im Blut durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Zudem wird durch den adoptiven Transfer dieser T-Zellen eine deutlich höhere Vorläuferfrequenz naiver antigenspezifischer T-Zellen erreicht, als dies natürlicherweise in einem Organismus der Fall ist.

Die Tiere wurden nach dem Transfer von OT-1 T-Zellen entweder mit  $10^6$  oder  $10^7$  viralen Partikeln der Konstrukte 1kb-CD19-OVA bzw. Ubi-OVA immunisiert (Abb. 5.16). Titrations im Vorfeld der lentiviralen Immunisierungen hatten ergeben, dass mindestens  $10^6$  Partikel 1kb-CD19-OVA erforderlich sind, um eine messbare OT-1 Expansion im Blut zu erreichen (Daten nicht gezeigt). Um sicherzustellen, dass eine ausreichende Anzahl von

Effektorzellen für den nachfolgenden Killerassay generiert wird, wurde zudem jeweils eine experimentelle Gruppe pro Konstrukt mit einer höheren Dosis ( $10^7$  Partikel) immunisiert. Zunächst wurden an verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung Blutproben analysiert und eine Kinetik der OT-1 Expansion im peripheren Blut erstellt. Der Höhepunkt der Expansion wurde mit beiden Konstrukten und Virusmengen am Tag 4 nach Immunisierung erreicht. Dies entsprach Erfahrungswerten, wie sie bereits häufiger nach viralen Immunisierungen im OT-1 System beobachtet werden konnten (C. Cheminay, A. Gruber; persönliche Kommunikation). Die Kinetik der OT-1 T-Zellexpansion war in den verschiedenen experimentellen Gruppen ebenfalls vergleichbar und entsprach dem klassischen Ablauf einer antiviralen T-Zellantwort: nach dem Höhepunkt der Expansionsphase nimmt die Zahl der T-Zellen im Blut stark und rasch ab. Es schließt sich die sogenannte Kontraktionsphase an, während der über 90 % der ursprünglich vorhandenen T-Zellen durch Apoptose beseitigt werden. Dies konnte auch in den durchgeführten Immunisierungsexperimenten beobachtet werden. Die überlebenden T-Zellen können zu langlebigen Gedächtniszellen ausdifferenzieren, deren Anzahl sich stabilisiert und über Jahre hinweg unverändert bleiben kann [*Bouso et al.*, 1999; *Homann et al.*, 2001].

Die Kinetik der OT-1 T-Zellexpansion im Blut nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA bzw. Ubi-OVA war identisch. Die Expansion der T-Zellen am Höhepunkt der Immunantwort (Tag 4 nach Immunisierung) war nach Immunisierung mit Ubi-OVA dosisunabhängig, was darauf schließen lässt, dass im Rahmen des sensitiven OT-1 Systems bereits bei einer Dosis von  $10^6$  viralen Partikeln Ubi-OVA das Maximum der im Blut messbaren T-Zellantwort erreicht wurde, welche sich auch mit einer zehnfach höheren viralen Dosis nicht weiter steigern liess. Dies wird vermutlich durch eine stärkere Promotoraktivität sowie das breitere Expressionsspektrum des Ubiquitin C-Promotors bedingt. Dieser ist auch in anderen APCs, wie z.B. DCs, aktiv, was dazu führt, dass auch diese Zellen OVA direkt präsentieren können [*Schorpp et al.*, 1996]. Das Ausmaß der OT-1 Expansion nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA war dagegen deutlich dosisabhängig. Während nach Immunisierung mit  $10^6$  Partikeln nur etwa 10 % aller  $CD8^+$ T-Zellen im Blut OT-1 T-Zellen waren, betrug der Prozentsatz nach Immunisierung mit  $10^7$  Partikeln knapp 70 % und war damit vergleichbar zur Expansion nach Immunisierung mit der gleichen Dosis Ubi-Ova. Möglicherweise gelangt nach Immunisierung mit der niedrigen viralen

Dosis nicht genug SIINFEKL-Peptid im Kontext von MHC I auf die Oberfläche der B-Zellen um OT-1 T-Zellen optimal aktivieren zu können.

Als Negativkontrolle wurde das lentivirale Konstrukt 1kb-CD19-GFP eingesetzt, da es zur Expression eines für OT-1 Zellen irrelevanten Antigens (GFP) in B-Zellen führt. Nach Immunisierung mit einer hohen Dosis ( $10^7$  Partikel) dieses Konstrukts gab es erwartungsgemäß zu keinem der analysierten Zeitpunkte eine Expansion von OT-1 T-Zellen im Blut.

Der am Tag 12 nach Immunisierung durchgeführte *In-Vivo*-Zytotoxizitätsassay führte bereits 4 Stunden nach Transfer der peptidbeladenen Zielzellen in allen untersuchten Gruppen, bis auf die negative Kontrollgruppe, zu einer vergleichbaren und hocheffizienten Lyse (Abb. 5.16c). Dieser Befund spiegelte das Ergebnis der Blutanalyse am Tag 10 nach Immunisierung wieder. Zu diesem Zeitpunkt war der prozentuale Anteil von OT-1 T-Zellen im peripheren Blut bereits stark zurückgegangen und es gab innerhalb der Gruppen, die mit  $10^6$  bzw.  $10^7$  viralen Partikeln immunisiert worden waren keine Unterschiede mehr bezüglich der Frequenz der Effektorzellen. Möglicherweise würde ein Zytotoxizitätsassay am Höhepunkt der OT-1 Expansion im Blut graduelle Unterschiede zwischen den zytotoxischen Effektorfunktionen der OT-1 T-Zellen der verschiedenen Gruppen deutlicher machen. Das Ergebnis des am Tag 12 nach Immunisierung durchgeführten Assays zeigt jedoch, dass bereits eine lentivirale Immunisierung mit  $10^6$  Partikeln 1kb-CD19-OVA, trotz mäßiger OT-1 Expansion im Blut verglichen zu den übrigen experimentellen Gruppen, für die Generierung einer effizienten zytotoxischen T-Zellantwort ausreichend war. Der für den Killerassay gewählte Zeitpunkt ist von besonderem Interesse, wenn man die lentivirale Immunisierung unter dem Aspekt einer potentiellen Vakzinierungsstrategie betrachtet. Es lassen sich hier die Effektorfunktionen von OT-1 T-Zellen untersuchen, die nach Abklingen der Primärantwort noch vorhanden sind und bereits als frühe Gedächtniszellen betrachtet werden können [Veiga-Fernandes *et al.*, 2000]. Um ein polyklonales OVA-spezifisches T-Zellrepertoire zu stimulieren wurde ebenfalls mit  $10^6$  bzw.  $10^7$  viralen Partikeln der Konstrukte 1kb-CD19-OVA bzw. Ubi-OVA immunisiert (Abb. 5.18). Aufgrund der deutlich geringeren Frequenz endogener OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen, wurde der Höhepunkt der T-Zellexpansion im Blut erwartungsgemäß später, d.h. erst am Tag 7 nach Immunisierung erreicht. Auch der prozentuale Anteil der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen im peripheren Blut lag mit maximal 1 % nach Immunisierung mit Ubi-OVA deutlich

unter den Werten, die im OT-1 System gemessen wurden. Ubi-OVA führte aber auch ohne OT-1 Transfer zu einer dosisunabhängigen Expansion OVA-spezifischer endogener T-Zellen. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse des *In-Vivo*-Zytotoxizitätsassays (Abb. 5.18c), der am Tag 12 nach Immunisierung durchgeführt wurde, wird deutlich, dass sich die spezifische Lyse der Zielzellen durch Immunisierung mit  $10^7$  viralen Partikeln signifikant gegenüber der niedrigeren Dosis steigern ließ. Es kam also mit beiden Dosen Ubi-OVA in den ersten 10 Tagen nach Immunisierung zu einer vergleichbaren Expansion der T-Zellen mit ähnlicher Kinetik, doch unterschieden sich die beiden Gruppen überraschenderweise in ihren Effektorfunktionen. Möglicherweise führte die Immunisierung mit der niedrigeren Dosis Ubi-OVA zu einer Antigenpräsentation, die zwar für die Generierung einer Primärantwort ausreichend war, nicht jedoch für die Ausbildung optimaler Effektorfunktionen. Hierbei kann sowohl die Verfügbarkeit des Antigens, als auch die Frequenz OVA-spezifischer  $CD8^+$ T-Zellen eine Rolle spielen. Es wurde bereits verschiedentlich beschrieben, dass das Ausmaß der T-Zellproliferation sowie die weitere Differenzierung zu Effektorzellen von der Antigenverfügbarkeit *in vivo* abhängig ist [Kaech and Ahmed, 2001; Kedl et al., 2000; Wherry et al., 1999]. Auch nach Immunisierung mit den beiden Dosen 1kb-CD19-OVA war ein signifikanter Unterschied im Prozentsatz der spezifischen Lyse zu beobachten. Anders als bei der beobachteten dosisabhängigkeit der Stimulation der OT-1 T-Zellen war mit diesem Vektor am Höhepunkt der Expansion endogener T-Zellen im Blut der Prozentsatz OVA-spezifischer  $CD8^+$ T-Zellen gleich, unabhängig von der zur Immunisierung verwendeten Dosis von 1kb-CD19-OVA. Am Tag 10 nach Immunisierung mit  $10^7$  Partikeln 1kb-CD19-OVA ging der Prozentsatz der OVA-spezifischen  $CD8^+$ T-Zellen überraschenderweise nicht, wie in den übrigen experimentellen Gruppen, zurück, sondern blieb auf dem Niveau des Wertes am Tag 7. Bei der Durchführung des Killerassays am Tag 12 nach Immunisierung wurde keine weitere Blutanalyse durchgeführt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die besonders effiziente Lyse der Zielzellen nach Immunisierung mit  $10^7$  Partikeln 1kb-CD19-OVA darauf beruht, dass zu diesem Zeitpunkt eine höhere Frequenz OVA-spezifischer  $CD8^+$ T-Effektorzellen vorlag, als dies in den anderen Gruppen der Fall war.

In Anbetracht der effektiven Aktivierung sowohl transgener als auch polyklonaler OVA-spezifischer  $CD8^+$ T-Zellen nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA stellt sich die Frage, ob B-Zellen in diesem System tatsächlich die einzige antigenpräsentierende Zellpopulation

darstellen. Mit Hilfe von RT-PCR Analysen konnte zwar eine B-zellspezifische Transgenexpression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 5.13), doch besteht die Möglichkeit, dass DCs das von B-Zellen exprimierte OVA-Protein aufnehmen und es dann auf MHC I kreuzpräsentieren. Dies hätte ebenfalls eine Aktivierung OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen zur Folge. Diese Hypothese lässt sich mit kreuzpräsentationsdefizienten Mäusen überprüfen. In CD11c-Rac1(N17) Mäusen ist die Rho GTPase Rac1 selektiv in DCs inhibiert, was dazu führt, dass ihre Fähigkeit zur Aufnahme apoptotischer Zellen stark eingeschränkt ist und auch keine Kreuzpräsentation stattfindet [Kerksiek *et al.*, 2005]. Experimente in CD11c-Rac1(N17) Mäusen machten deutlich, dass die Immunantwort nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA keinerlei Unterschiede zu den Ergebnissen in C57BL/6 Mäusen aufwies (Daten nicht gezeigt). Es konnte somit gezeigt werden, dass zumindest der in CD11c-Rac1(N17) Mäusen inhibierte Mechanismus der Kreuzpräsentation nicht für die Generierung einer zytotoxischen CD8<sup>+</sup>T-Zellantwort nach Immunisierung mit 1kb-CD19-OVA verantwortlich ist.

### 6.2.2 Antikörperantwort nach lentiviraler Immunisierung

Die Immunisierung mit OVA-exprimierenden lentiviralen Vektoren löste eine zytotoxische, OVA-spezifische CD8<sup>+</sup>T-Zellantwort aus. Es konnte deshalb angenommen werden, dass weder die Viruspartikel noch die transgenexprimierenden Zellen durch eine bereits im Vorfeld bestehende Immunität gegen Vektor oder Transgen eliminiert wurden. Es sollte untersucht werden, ob bereits eine singuläre lentivirale Immunisierung zur Generierung einer IgG-Antikörperantwort gegen das Modellantigen OVA oder das virale Hüllprotein VSV-G führt. In diesem Fall wären wiederholte Immunisierungen mit demselben Vektor problematisch.

In den durchgeführten ELISA-Assays konnte nach Immunisierung für keinen der angegebenen lentiviralen Vektoren eine IgG-Antwort gegen OVA oder VSV-G nachgewiesen werden (Abb 5.19). Der OVA-ELISA wurde mit Serum von Tag 21 nach Immunisierung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war der Höhepunkt der IgG-Antwort gegen HSV-OVA erreicht (positive Kontrolle). Eine Antikörperantwort gegen thymusabhängige Antigene wie OVA kann nur mit Hilfe von CD4<sup>+</sup>T-Zellen generiert werden [Parker, 1993]. Fehlende CD4<sup>+</sup>-Hilfe erschien in diesem Zusammenhang

unwahrscheinlich, da die Stimulation eines polyklonalen CD8<sup>+</sup>T-Zellrepertoires möglich war (Abb. 5.18). Funktionelle zytotoxische T-Zellantworten entstehen bei einer geringen Vorläuferfrequenz naiver CD8<sup>+</sup>-Tellen nur mit CD4<sup>+</sup>-Hilfe [Malek, 2002]. Diese war im Rahmen der durchgeführten Immunisierungen offenbar ausreichend für das Auslösen einer zellulären Immunantwort, nicht jedoch für die Generierung einer messbaren IgG-Antikörperantwort zum Zeitpunkt der Analyse.

Die 2-Signal Hypothese der B-Zellaktivierung besagt, dass B-Zellen nur aktiviert werden, wenn sie Antigen in Verbindung mit einem kostimulatorischen Signal erkennen [Bretscher and Cohn, 1970]. Die intravenöse Immunisierung mit lentiviralen Vektoren stellt einen starken inflammatorischen Stimulus dar, der jedoch zum Zeitpunkt der OVA-Präsentation bereits wieder abgeklungen ist. Möglicherweise ist also das Fehlen eines adäquaten kostimulatorischen Signals für das Ausbleiben der Antikörperantwort verantwortlich. Eine andere Möglichkeit wäre eine zu geringe Expression von OVA im Kontext von MHC II auf der Zelloberfläche.

Die Seren wurden auch auf das Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen das virale Hüllprotein VSV-G untersucht, welches in der Hülle aller in dieser Arbeit untersuchten Lentiviren vorhanden ist. Es konnten keine IgG-Antikörper nach lentiviraler Immunisierung nachgewiesen werden. Der ELISA wurde in Kooperation mit dem ENS Lyon im Institut für Humanvirologie (*Laboratoire de Virologie Humain*), Lyon, Frankreich, durchgeführt.

Auf eine *in vivo*-Positivkontrolle musste hier verzichtet werden, da kein geeignetes VSV-G Peptid für eine Immunisierung zur Verfügung stand.

VSV-G gehört aufgrund seiner organisierten, hochrepetitiven Struktur zur Gruppe der T-zellunabhängigen TI-Antigene (*T-cell independent*) [Bachmann *et al.*, 1993; Fehr *et al.*, 1996]. Diese können B-Zellen direkt und ohne Beteiligung anderer APCs oder zusätzlicher T-Zellhilfe aktivieren [Mond *et al.*, 1979]. Dies führt hauptsächlich zur Bildung neutralisierender IgM-Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Die Bildung anderer Ig-Isotypen sowie die Generierung von B-Gedächtniszellen ist jedoch als Antwort auf natürlich vorkommende TI-Antigene, wie bakterielle oder virale Proteinstrukturen, möglich, da diese auch T-Helferzellepitope enthalten [Snapper *et al.*, 1995]. In der vorliegenden Arbeit konnte keine IgG-Antikörperantwort gegen VSV-G nachgewiesen werden. Möglicherweise reichte auch hier die CD4<sup>+</sup>-Hilfe nicht für die

Generierung des IgG-Isotyps aus. Darüber hinaus führt die intravenöse Immunisierung mit lentiviralen Vektoren bereits nach wenigen Stunden zu einer vorübergehenden massiven Typ I Interferonantwort, die zu einer raschen Eliminierung freier Viruspartikel und infizierter Zellen führt [Brown *et al.*, 2007; Pichlmair *et al.*, 2007]. VSV-G ist also unter Umständen nicht lange genug präsent, um eine entsprechende IgG-Antikörperantwort auszulösen. Für die durchgeführten Immunisierungen wurden  $10^6$  virale Partikel pro Maus eingesetzt, da diese Menge ausreichend war, um eine effiziente zytotoxische T-Zellantwort auszulösen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass keine messbare IgG-Antwort gegen das virale Hüllprotein VSV-G und das Modellantigen OVA nachgewiesen werden konnte. Dies schließt jedoch nicht aus, dass dennoch eine Gedächtnisantwort ausgelöst wurde, die wiederholte lentivirale Immunisierungen erschweren würde. Dieser Aspekt lag nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit, ist jedoch ein weiterer wichtiger Punkt zukünftiger Untersuchungen.

### **6.3 Entwicklung eines induzierbaren retroviralen Vektorsystems**

Eine regulierbare Genexpression in B-Zellen ist bislang nur sehr bedingt möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb als Weiterentwicklung der beschriebenen konstitutiven B-zellspezifischen Genexpression ein induzierbares gammaretrovirales Expressionssystem etabliert werden, welches nur in B-Zellen aktiv ist.

Von den bekannten regulierbaren Genexpressionssystemen ist das sogenannte Tet-regulierte System am weitesten verbreitet und sehr gut untersucht. Es stehen hier zwei funktionelle Varianten zur Auswahl: das Tet-off und das Tet-on System. Ersteres reprimiert die Genexpression in Gegenwart von Doxycyclin und findet vor allem bei der dauerhaften Unterdrückung von Genfunktionen Anwendung [Gossen *and Bujard*, 1992]. Das Tet-on System dagegen erlaubt die Expression eines Transgens nur in Gegenwart von Doxycyclin [Gossen *et al.*, 1995]. Die gute Zellgängigkeit und geringe Serum-Halbwertszeit dieses Tetracyclin-Derivats erlaubt eine flexible Regulation der Genexpression [Agwuh *and MacGowan*, 2006].

Eine Tet-regulierbare Genexpression in B-Zellen wurde bislang nur in zwei Veröffentlichungen beschrieben (Stand: September 2009). Es handelt sich dabei jeweils um

transgene Mausstämme, in denen mit Hilfe des Tet-off Systems unter Einfluss von Doxycyclin entweder eine Überexpression des Protoonkogens *MYC* in B-Zellen [Refaeli et al., 2005] oder die Expression der leichten Kette des B-Zellrezeptors [Gerald et al., 2007] unterdrückt wird. Die beschriebenen Systeme sind zwar in B-Zellen aktiv, jedoch nicht auf diese Zellpopulation beschränkt, da die Expression des Transaktivators unter der Kontrolle eines minimalen viralen Promotors steht, der allgemein in Lymphozyten und auch Epithelzellen aktiv ist [Hennighausen et al., 1995]. Eine spezifische Regulation der Genexpression unter Verwendung des Tet-on Systems wurde hingegen für B-Zellen bislang nicht beschrieben.

Für diese Studie wurde das Tet-on System ausgewählt, da es aus den oben erwähnten Gründen ideal für eine regulierbare, transiente Genexpression ist. Ein B-zellspezifischer Promotor ermöglichte zudem eine gerichtete Induktion der Genexpression. Darüber hinaus wurden Knochenmarkschimären statt transgener Mäuse generiert, da dies eine zeitsparende Methode ist, um eine stabile Transgenexpression zu erreichen.

Der Transfer des Tet-regulierbaren Systems in Zielzellen erfolgte mit Hilfe gammaretroviraler Vektoren, die auf dem Maus Leukämie Virus basieren (*murine leukemia virus*, MLV). In ihrer ursprünglichen Form wurden die Vektoren von Rainer Löw (Eufets GmbH, Idar-Oberstein) konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In diesem System befinden sich der Transaktivator und die regulierbare Transkriptionseinheit auf zwei unabhängigen Vektoren [Lindemann et al., 1997; Vigna et al., 2002], die beide in das Genom derselben Wirtszelle integrieren müssen, damit eine regulierbare Genexpression stattfinden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden die Originalkonstrukte dahingehend modifiziert, dass die Expression des Transaktivators unter die Kontrolle eines B-zellspezifischen Promotors gestellt wurde und das ursprünglich kodierte Transgen Luziferase gegen OVA ausgetauscht wurde (Abb. 5.20).

Die B-Zellspezifität der Induktion wurde durch ein 999 bp-Fragment des humanen CD19-Promotors gewährleistet, für das bereits früher gezeigt wurde, dass es in Kombination mit einem retroviralen SIN-Vektor ausreichend ist, um die Transgenexpression spezifisch auf B-Zellen während ihrer gesamten Entwicklung in primären und sekundären lymphatischen Organen zu beschränken [Werner et al., 2004].

Bei der regulierbaren Transkriptionseinheit handelt es sich um einen bidirektionalen Vektor, der es ermöglicht, das Modellantigen OVA sowie das Reportergen GFP

gleichzeitig in einer Zelle zu exprimieren. Hierzu wurde die tetO-Sequenz beiderseits mit minimalen viralen Promotoren fusioniert, die jeweils den Startpunkt für die Transkription eines der beiden Transgene bilden [Baron *et al.*, 1995]. Im Vektor pSIN-eGFP-tet-OVA ging die GFP-Transkription von einem minimalen IE (*immediate early*) Promotor des humanen Cytomegalus Virus ( $P_{CMV}$ ) aus und die OVA-Transkription von einem minimalen Promotor aus der LTR-Region des Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV;  $P_{MMTV}$ ). Der zur Verfügung gestellte Originalvektor (S2s-Variante) war bereits durch eine Insertion des MLV *pol/env*-Fragments dahingehend optimiert worden, dass die Aktivität der beiden minimalen Promotoren möglichst nicht durch cis-wirksame regulatorische Elemente des Vektor-Backbones beeinflusst werden sollte (R. Löw, persönliche Kommunikation). Trotzdem birgt die geringe räumliche Distanz dieser beiden starken viralen Promotoren im Vektor pSIN-eGFP-tet-OVA das Risiko der Promotorinterferenz.

Die Analyse der GFP-Expression in der Milz der meisten Knochenmarkschimären zeigte eine geringe Expression in Abwesenheit von Doxycyclin bzw. des Transaktivators (Abb. 5.21). Dies war unabhängig davon, ob die Chimären nur mit dem transgenkodierenden Vektor (pSIN-eGFP-tet-OVA) transduziert worden waren oder mit beiden Vektoren des induzierbaren Systems (pSIN-CD19-rtTA-WPRE + pSIN-eGFP-tet-OVA) zusammen. Das bedeutet, dass bereits durch den transgenkodierenden Vektor allein eine unerwünschte Hintergrundexpression von GFP verursacht wurde.

Die Expression von OVA konnte nur indirekt durch die antigeninduzierte Proliferation von transferierten OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen (OT-1) nachgewiesen werden. In keiner der untersuchten Chimären war eine Hintergrundexpression von OVA anhand der Proliferation der transferierten T-Zellen zu beobachten (Abb. 5.23 und Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass GFP unkontrolliert exprimiert wurde, während die Expression von OVA funktionell nicht nachgewiesen werden konnte.

Für die Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Hintergrundexpression der beiden Transgene gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

Eine Ursache kann in der Wahl der beiden minimalen Promotoren begründet liegen. Für die Kombination  $P_{CMV}$  und  $P_{MMTV}$  wurde beispielsweise berichtet, dass  $P_{CMV}$  selbst im Kontext des hier beschriebenen optimierten S2s-Vektors zu einer bis zu 100-fach höheren Hintergrundexpression führt, als das mit  $P_{MMTV}$  der Fall ist [Loew *et al.*, 2006]. Dies war

jedoch zum Zeitpunkt, als die hier diskutierten Experimente durchgeführt wurden, noch nicht bekannt.

Das Problem könnte theoretisch durch den Einsatz zweier identischer, weniger aktiver minimaler Promotoren, wie z.B. P<sub>MMTV</sub>, umgangen werden. Es zeigte sich jedoch, dass dies zu einer ineffizienten Virusproduktion und folglich zu stark verminderten viralen Titern führt. Es wird angenommen, dass die komplementären Promotorsequenzen störend auf die reverse Transkription oder Verpackung während der Virusgenerierung wirken [Loew *et al.*, 2006]. Ein denkbarer alternativer Ansatz wäre hier, nur einen minimalen viralen Promotor zu verwenden und die Expression des zweiten Transgens über eine IRES-Sequenz zu erreichen (IRES; *Internal Ribosomal Entry Site*).

Auch der Integrationsort der viralen Vektoren im Genom der Wirtszelle spielt für die Regulierbarkeit und tatsächlich erreichbare Spezifität des induzierbaren Expressionssystems eine wichtige Rolle. Minimale Promotoren, wie sie in bidirektionalen Vektoren zum Einsatz kommen, können beispielsweise von zellulären Transkriptionselementen, die über größere genetische Distanzen hinweg wirksam sind, aktiviert werden, wodurch der gesamte Regulationszyklus umgangen werden kann [Bulger and Groudine, 1999; Chambeyron and Bickmore, 2004; Lund and van Lohuizen, 2004]. Dies wird durch die bevorzugte Integration MLV-basierter retroviraler Vektoren in der Umgebung von Transkriptionsstartpunkten des Wirtsgenoms möglicherweise noch begünstigt [Mitchell *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2003].

Um solchen Effekten entgegenzuwirken, wurden von verschiedenen Gruppen transkriptionelle Silencer entwickelt, die in Abwesenheit von Doxycyclin an die tetO-Sequenz binden und so eine unspezifische Transkription zusätzlich blockieren sollen [Freundlieb *et al.*, 1999; Witzgall *et al.*, 1994]. Ob mit Hilfe eines solchen Silencers die GFP-Hintergrundexpression *in vivo* ganz beseitigt oder zumindest reduziert werden könnte, wurde hier nicht untersucht. Erste *in vitro*-Experimente mit einem Silencer in B-Zelllinien hatten zwar gezeigt, dass die GFP-Hintergrundexpression vollständig unterdrückt werden kann, doch war danach eine Induktion der GFP-Expression auch nicht mehr möglich (Daten nicht gezeigt). Eine möglicherweise zu geringe Doxycyclinkonzentration in den Zellen konnte in diesen *in vitro*-Experimenten ausgeschlossen werden.

In den Chimären, die mit beiden Vektoren des induzierbaren Systems transduziert worden waren (pSIN-CD19-rtTA-WPRE + pSIN-eGFP-tet-OVA), kann die häufig beobachtete

unspezifische GFP-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin noch andere Gründe haben. Neben einer erhöhten  $P_{CMV}$ -Promotoraktivität und den bevorzugten Integrationsorten MLV-basierter retroviraler Vektoren kommt hier auch zum Tragen, dass der im Tet-on System aktive reverse Transaktivator rtTA auch ohne Doxycyclin noch eine gewisse Affinität zur tetO-Sequenz aufweisen kann [Urlinger *et al.*, 2000], was ebenfalls zu einer unspezifischen „konstitutiven“ Transgenexpression führt. Dieser Effekt ist umso stärker, je höher die Konzentration von rtTA in der Zelle ist. Vor allem in Systemen, die mit frühen rtTA-Versionen arbeiten, tritt dieses Problem auf [Gossen *et al.*, 1995]. In der vorliegenden Arbeit kam jedoch ein rtTA neuerer Generation zum Einsatz (rtTA-S2), der durch verschiedene Mutationen in der DNA-Bindedomäne eine deutlich geringere Affinität zu tetO in Abwesenheit von Doxycyclin besitzt [Hinrichs *et al.*, 1994; Urlinger *et al.*, 2000]. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass es auch ohne Induktion zur Expression von GFP kam. Auch in diesem Fall könnte ein transkriptioneller Silencer die unerwünschte Hintergrundaktivität möglicherweise verringern.

Einige wenige Chimären wichen von den beschriebenen Ergebnissen ab und wiesen eine geringe GFP-Hintergrundexpression auf (Abb. 5.22 links). Dies kann auf einen transkriptionell weniger aktiven Integrationsort innerhalb des Wirtsgenoms zurückzuführen sein. Verschiedene Studien belegen, dass es nach Integration in bestimmte zelluläre Genorte zu keiner messbaren Hintergrundexpression Tet-regulierter Transgene kommt. Trotzdem erfolgt nach Induktion die Initiation der Transkription mit einer Effizienz, die den starken Promotoren der zellulären Polymerase II vergleichbar ist [Baron and Bujard, 2000; Yin *et al.*, 1996]. Diese Genorte werden als „*silent but activatable*“ (s/a) bezeichnet und sind ideal für die Integration induzierbarer retroviraler Vektoren [Gossen and Bujard, 1992; Schonig *et al.*, 2002]. Eine gerichtete Insertion wäre hier wünschenswert, ist jedoch, anders als z.B. bei der Generierung von Knock-in Mäusen, mit viralen Vektoren noch nicht möglich.

Die Induzierbarkeit der Genexpression war in Chimären mit geringer GFP-Hintergrundexpression weniger gut als erwartet. Nach Doxycyclin-Gabe exprimierte weiterhin nur ein geringer Prozentsatz der B-Zellen GFP (Abb. 5.22 rechts). Ein Grund hierfür kann sein, dass die Konzentration des Transaktivators in den Zellen nicht für eine maximale Induktion der Genexpression ausreichte. Der verwendete Transaktivator rtTA-S2 benötigt zudem eine relative hohe lokale Doxycyclin-Konzentration, um aktiv zu werden

[Urlinger *et al.*, 2000]. Möglicherweise wurde diese in der Milz der Chimären nicht erreicht.

Die regulierbare Expression von OVA hatte sich dagegen anfangs als vielversprechend dargestellt, da eine Hintergrundexpression nicht detektiert werden konnte (Abb. 5.23).

Eine Expression von OVA liess sich jedoch auch nach Doxycyclin-Gabe in keiner der untersuchten Chimären funktionell nachweisen (Abb. 5.24). Auch hier kann die zelluläre Konzentration des Transaktivators und bzw. oder des Doxycyclins möglicherweise nicht ausgereicht haben, um eine messbare OVA-Expression zu erreichen.

Eine theoretische Alternative wäre ein positioneller Austausch der Transgene, was OVA anstelle von GFP unter die Kontrolle von  $P_{CMV}$  bringen würde. Auf das Reporter-gen GFP könnte gegebenenfalls auch ganz verzichtet werden, da es zur Identifikation transduzierter Zellen zwar nützlich, für funktionelle Studien aber nicht unbedingt notwendig ist. Ein Austausch OVA/GFP würde jedoch an der unerwünschten Hintergrundexpression unter  $P_{CMV}$  mit grösster Wahrscheinlichkeit nichts ändern, was wiederum den Einsatz eines Silencers nötig machen würde. Da die bereits erwähnten *in vitro*-Daten gezeigt hatten, dass die Genexpression durch Silencing im Falle von GFP vollständig unterdrückt wird, erschien ein positioneller Austausch der Transgene als wenig erfolgversprechend.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der die Funktionalität des beschriebenen induzierbaren Systems maßgeblich beeinflusst, ist die Notwendigkeit einer Doppeltransduktion der Zielzellen. Nur wenn sich beide Vektoren in einer Zelle befinden, kann eine induzierbare Genexpression stattfinden. Hierbei spielt auch die Transduktionseffizienz eine wichtige Rolle. Diese scheint für primäre murine B-Zellen im Zusammenhang mit onco-retroviralen Vektoren auch abhängig vom verwendeten Hüllprotein zu sein, wobei mit VSV-G nicht die bestmöglichen Transduktionseffizienzen erreicht werden [Janssens *et al.*, 2003].

Die Frage, ob die Expression von OVA tatsächlich nicht induziert werden konnte, oder ob die Expressionsstärke nach Induktion nicht ausreichend war, um sie anhand der Proliferation von OT-1 T-Zellen zu detektieren, konnte nicht abschließend geklärt werden. Hierüber können Westernblot- oder mRNA-Analysen transduzierter Zellen aus Knochenmarkschimären Aufschluss geben. Da sich jedoch der ganze experimentelle Ansatz als wenig erfolgversprechend erwiesen hatte, wurden hier keine weiteren Experimente zur Klärung der Ursachen durchgeführt. Für die geplanten funktionellen Experimente war es unabdingbar, eine OVA-Expression in den Chimären zu erreichen, die

mit Hilfe des sensitiven OT-1 Systems detektiert werden konnte. Da dies in keinem der beschriebenen Experimente der Fall war, musste letztendlich der Aspekt der Regulierbarkeit der Genexpression mit Hilfe des Tet-Systems in B-Zellen verworfen werden.

Bisher berichtet nur eine Veröffentlichung darüber, dass eine regulierte Genexpression mit Hilfe des Tet-on Systems *in vivo* nicht in allen Zelltypen erreicht werden kann [Urlinger *et al.*, 2000]. Es wird spekuliert, dass in diesem Fall die intrazelluläre Konzentration des reversen Transaktivators zu gering ist. Als Ursache kommt die Instabilität der Transaktivator-mRNA in Betracht. Möglicherweise trifft dies auch oder gerade auf murine B-Zellen zu.

#### **6.4 Schlussbetrachtungen**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden lentivirale Vektoren entwickelt, mit deren Hilfe eine spezifische Transgenexpression in B-Zellen ermöglicht wurde. Die Beschränkung der Genexpression auf B-Zellen wurde dabei durch ein 1kb-Fragment des humanen CD19-Promotors erreicht.

Lentivirale Vektoren sind zu wichtigen Werkzeugen in der Grundlagenforschung geworden, haben zugleich aber auch therapeutisches Potential und finden bereits Anwendung im Bereich der Gentherapie. Abhängig von der Art der Applikation können sie als Gentransfervektoren oder aber als Vakzine eingesetzt werden. Eine *ex vivo* Transduktion von Knochenmarksstammzellen mit anschließender Transplantation ermöglicht die dauerhafte Supplementierung fehlender oder mangelhafter Genfunktionen *in vivo*.

Immunisierungen mit lentiviralen Vektoren hingegen können eine starke zytotoxische Immunantwort auslösen. Hier ist eine Anwendung als therapeutische Vakzine denkbar, die beispielsweise eine tumorspezifische Immunantwort auslöst.

In den Experimenten mit Knochenmarkschimären hatte sich gezeigt, dass durchschnittlich 20 % der B-Zellen das Reporter-gen GFP exprimieren, was für eine erfolgreiche Gentransfer-Therapie möglicherweise zu gering ist. Jedoch lösten die Immunisierungen mit den generierten lentiviralen Vektoren eine effektive zytotoxische Immunantwort aus, die in diesem Fall gegen das Modellantigen OVA gerichtet war. Mögliche klinische

Anwendungen dieses Vektorsystems wären daher im Bereich der therapeutischen Vakzinierung denkbar.

Ein wichtiges Ziel für zukünftige Weiterentwicklungen eines B-zellspezifischen Genexpressionssystems bleibt die Induzierbarkeit der Genexpression. So könnte z.B. die Rolle der B-Zelle bei der Antigenpräsentation genauer untersucht werden.

## 7 REFERENZEN

**Adolfsson, J., et al. (2001)**, Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity, *Immunity*, 15(4), 659-669.

**Agwuh, K. N., and A. MacGowan (2006)**, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines, *J Antimicrob Chemother*, 58(2), 256-265.

Allman, D., and S. Pillai (2008), Peripheral B cell subsets, *Curr Opin Immunol*, 20(2), 149-157.

**Aloia, R. C., et al. (1988)**, Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(3), 900-904.

**Altman, J. D., et al. (1996)**, Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, *Science*, 274(5284), 94-96.

**Andreadis, S. T., et al. (1997)**, Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours, *J Virol*, 71(10), 7541-7548.

**Ashton-Rickardt, P. G. (1993)**, The role of peptide in the positive selection of CD8+ T cells in the thymus, *Thymus*, 22(2), 111-115.

**Ashton-Rickardt, P. G., et al. (1994)**, Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus, *Cell*, 76(4), 651-663.

**Bachmann, M. F., et al. (1993)**, The influence of antigen organization on B cell responsiveness, *Science*, 262(5138), 1448-1451.

**Baron, U., et al. (1995)**, Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter, *Nucleic Acids Res*, 23(17), 3605-3606.

**Baron, U., and H. Bujard (2000)**, Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances, *Methods Enzymol*, 327, 401-421.

**Batista, F. D., and M. S. Neuberger (1998)**, Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate, *Immunity*, 8(6), 751-759.

**Bevan, M. J. (1976a)**, Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming, *J Immunol*, 117(6), 2233-2238.

**Bevan, M. J. (1976b)**, Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay, *J Exp Med*, 143(5), 1283-1288.

- Blake, E., et al. (1992)**, Polymerase chain reaction (PCR) amplification and human leukocyte antigen (HLA)-DQ alpha oligonucleotide typing on biological evidence samples: casework experience, *J Forensic Sci*, 37(3), 700-726.
- Blau, H. M., and F. M. Rossi (1999)**, Tet B or not tet B: advances in tetracycline-inducible gene expression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(3), 797-799.
- Bokhoven, M., et al. (2009)**, Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors, *J Virol*, 83(1), 283-294.
- Bousso, P., et al. (1999)**, The composition of a primary T cell response is largely determined by the timing of recruitment of individual T cell clones, *J Exp Med*, 189(10), 1591-1600.
- Boyton, R. J., and D. M. Altmann (2002)**, Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization?, *Trends Immunol*, 23(11), 526-529.
- Breckpot, K., et al. (2007)**, Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics, *Gene Ther*, 14(11), 847-862.
- Bretscher, P., and M. Cohn (1970)**, A theory of self-nonsel self discrimination, *Science*, 169(950), 1042-1049.
- Brocker, T. (1999)**, The role of dendritic cells in T cell selection and survival, *J Leukoc Biol*, 66(2), 331-335.
- Brown, B. D., et al. (2007)**, In vivo administration of lentiviral vectors triggers a type I interferon response that restricts hepatocyte gene transfer and promotes vector clearance, *Blood*, 109(7), 2797-2805.
- Bulger, M., and M. Groudine (1999)**, Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation, *Genes Dev*, 13(19), 2465-2477.
- Butler, S. L., et al. (2001)**, A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo, *Nat Med*, 7(5), 631-634.
- Cancro, M. P., and J. F. Kearney (2004)**, B cell positive selection: road map to the primary repertoire?, *J Immunol*, 173(1), 15-19.
- Cannarile, M. A., et al. (2004)**, The role of dendritic cells in selection of classical and nonclassical CD8+ T cells in vivo, *J Immunol*, 173(8), 4799-4805.
- Chambeyron, S., and W. A. Bickmore (2004)**, Does looping and clustering in the nucleus regulate gene expression?, *Curr Opin Cell Biol*, 16(3), 256-262.
- Coil, D. A., and A. D. Miller (2004)**, Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus, *J Virol*, 78(20), 10920-10926.

**Dardalhon, V., et al. (2001a)**, Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap, *Gene Ther*, 8(3), 190-198.

**Dardalhon, V., et al. (2001b)**, IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16), 9277-9282.

**Deenen, G. J., et al. (1990)**, In rat B lymphocyte genesis sixty percent is lost from the bone marrow at the transition of nondividing pre-B cell to sIgM+ B lymphocyte, the stage of Ig light chain gene expression, *Eur J Immunol*, 20(3), 557-564.

**Dresch, C., et al. (2008)**, Lentiviral-mediated transcriptional targeting of dendritic cells for induction of T cell tolerance in vivo, *J Immunol*, 181(7), 4495-4506.

**DuBridgE, R. B., et al. (1987)**, Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system, *Mol Cell Biol*, 7(1), 379-387.

**Ducrey-Rundquist, O., et al. (2002)**, Modalities of interleukin-7-induced human immunodeficiency virus permissiveness in quiescent T lymphocytes, *J Virol*, 76(18), 9103-9111.

**Dull, T., et al. (1998)**, A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system, *J Virol*, 72(11), 8463-8471.

**Egerton, M., et al. (1990)**, Kinetics of mature T-cell development in the thymus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(7), 2579-2582.

**Eleveld-Trancikova, D., et al. (2005)**, The dendritic cell-derived protein DC-STAMP is highly conserved and localizes to the endoplasmic reticulum, *J Leukoc Biol*, 77(3), 337-343.

**Esslinger, C., et al. (2003)**, In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses, *J Clin Invest*, 111(11), 1673-1681.

**Fazilleau, N., et al. (2009)**, The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding, *Nat Immunol*, 10(4), 375-384.

**Fehr, T., et al. (1996)**, T-independent activation of B cells by vesicular stomatitis virus: no evidence for the need of a second signal, *Cell Immunol*, 168(2), 184-192.

**Firat, H., et al. (2002)**, Use of a lentiviral flap vector for induction of CTL immunity against melanoma. Perspectives for immunotherapy, *J Gene Med*, 4(1), 38-45.

**Frankel, A. D., and J. A. Young (1998)**, HIV-1: fifteen proteins and an RNA, *Annu Rev Biochem*, 67, 1-25.

**Freundlieb, S., et al. (1999)**, A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells, *J Gene Med*, 1(1), 4-12.

**Geraldes, P., et al. (2007)**, Ig heavy chain promotes mature B cell survival in the absence of light chain, *J Immunol*, 179(3), 1659-1668.

**Girao, C., et al. (1997)**, Limits to the differential avidity model of T cell selection in the thymus, *J Immunol*, 159(9), 4205-4211.

**Gossen, M., and H. Bujard (1992)**, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12), 5547-5551.

**Gossen, M., et al. (1995)**, Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells, *Science*, 268(5218), 1766-1769.

**Gossen, M., and H. Bujard (2002)**, Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation, *Annu Rev Genet*, 36, 153-173.

**Gruber, A., and T. Brocker (2005)**, MHC class I-positive dendritic cells (DC) control CD8 T cell homeostasis in vivo: T cell lymphopenia as a prerequisite for DC-mediated homeostatic proliferation of naive CD8 T cells, *J Immunol*, 175(1), 201-206.

**Haas, W., and H. von Boehmer (1984)**, Surface markers of cytotoxic T lymphocyte clones, *Eur J Immunol*, 14(4), 383-384.

**Harada, S., et al. (2008)**, Neutralizing antibodies decrease the envelope fluidity of HIV-1, *Virology*, 370(1), 142-150.

**Hartgers, F. C., et al. (2000)**, DC-STAMP, a novel multimembrane-spanning molecule preferentially expressed by dendritic cells, *Eur J Immunol*, 30(12), 3585-3590.

**Hartley, S. B., et al. (1991)**, Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens, *Nature*, 353(6346), 765-769.

**Heinzinger, N. K., et al. (1994)**, The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15), 7311-7315.

**Heit, A., et al. (2004)**, CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells, *J Immunol*, 172(3), 1501-1507.

**Hennighausen, L., et al. (1995)**, Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system, *J Cell Biochem*, 59(4), 463-472.

**Higuchi, R., et al. (1992)**, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology (N Y)*, 10(4), 413-417.

**Hinrichs, W., et al. (1994)**, Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance, *Science*, 264(5157), 418-420.

- Hofer, M., et al. (1990)**, Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain, *Embo J*, 9(8), 2459-2464.
- Hogquist, K. A., et al. (1995)**, Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8+ T cells, *Immunity*, 3(1), 79-86.
- Homann, D., et al. (2001)**, Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory, *Nat Med*, 7(8), 913-919.
- Hu, Q., et al. (1997)**, Specific recognition of thymic self-peptides induces the positive selection of cytotoxic T lymphocytes, *Immunity*, 7(2), 221-231.
- Hwang, J. J., et al. (1997)**, A conditional self-inactivating retrovirus vector that uses a tetracycline-responsive expression system, *J Virol*, 71(9), 7128-7131.
- Ishihara, K., et al. (1991)**, Stromal-cell and cytokine-dependent lymphocyte clones which span the pre-B- to B-cell transition, *Dev Immunol*, 1(3), 149-161.
- Janssens, W., et al. (2003)**, Efficiency of onco-retroviral and lentiviral gene transfer into primary mouse and human B-lymphocytes is pseudotype dependent, *Hum Gene Ther*, 14(3), 263-276.
- Josefowicz, S. Z., and A. Rudensky (2009)**, Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance, *Immunity*, 30(5), 616-625.
- Kaech, S. M., and R. Ahmed (2001)**, Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells, *Nat Immunol*, 2(5), 415-422.
- Kafri, T., et al. (1997)**, Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors, *Nat Genet*, 17(3), 314-317.
- Kappler, J. W., et al. (1987)**, T cell tolerance by clonal elimination in the thymus, *Cell*, 49(2), 273-280.
- Ke, Y., and J. A. Kapp (1996)**, Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake, *J Exp Med*, 184(3), 1179-1184.
- Kedl, R. M., et al. (2000)**, T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells, *J Exp Med*, 192(8), 1105-1113.
- Kerksiek, K. M., et al. (2005)**, Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo, *Blood*, 105(2), 742-749.
- Kim, J. M., et al. (2007)**, Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice, *Nat Immunol*, 8(2), 191-197.

**Kimura, T., et al. (2007)**, Lentiviral vectors with CMV or MHCII promoters administered in vivo: immune reactivity versus persistence of expression, *Mol Ther*, 15(7), 1390-1399.

**Kisielow, P., et al. (1988)**, Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes, *Nature*, 333(6175), 742-746.

**Kleindienst, P., and T. Brocker (2003)**, Endogenous dendritic cells are required for amplification of T cell responses induced by dendritic cell vaccines in vivo, *J Immunol*, 170(6), 2817-2823.

**Kleindienst, P., et al. (2005)**, Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semimature dendritic cells, *J Immunol*, 174(7), 3941-3947.

**Kozmik, Z., et al. (1992)**, The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP, *Mol Cell Biol*, 12(6), 2662-2672.

**Kretschmer, K., et al. (2004)**, Maintenance of peritoneal B-1a lymphocytes in the absence of the spleen, *J Immunol*, 173(1), 197-204.

**Kumar, M., et al. (2001)**, Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors, *Hum Gene Ther*, 12(15), 1893-1905.

**Kyewski, B., and J. Derbinski (2004)**, Self-representation in the thymus: an extended view, *Nat Rev Immunol*, 4(9), 688-698.

**Lauterbach, H., et al. (2004)**, Protection from bacterial infection by a single vaccination with replication-deficient mutant herpes simplex virus type 1, *J Virol*, 78(8), 4020-4028.

**Lauterbach, H., et al. (2006)**, Insufficient APC capacities of dendritic cells in gene gun-mediated DNA vaccination, *J Immunol*, 176(8), 4600-4607.

**Le Doux, J. M., et al. (1999)**, Kinetics of retrovirus production and decay, *Biotechnol Bioeng*, 63(6), 654-662.

**Levine, M. H., et al. (2000)**, A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6), 2743-2748.

**Levy, S., et al. (1998)**, CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system, *Annu Rev Immunol*, 16, 89-109.

**Lewis, P. F., and M. Emerman (1994)**, Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus, *J Virol*, 68(1), 510-516.

**Li, Y. S., et al. (1996)**, Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow, *Immunity*, 5(6), 527-535.

**Lindemann, D., et al. (1997)**, Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo, *Mol Med*, 3(7), 466-476.

- Liu, C. P., et al. (1980)**, Mapping of heavy chain genes for mouse immunoglobulins M and D, *Science*, 209(4463), 1348-1353.
- Loew, R., et al. (2006)**, Retroviral vectors containing Tet-controlled bidirectional transcription units for simultaneous regulation of two gene activities, *J Mol Genet Med*, 2(1), 107-118.
- Lois, C., et al. (2002)**, Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors, *Science*, 295(5556), 868-872.
- Lopes, L., et al. (2008)**, Immunization with a lentivector that targets tumor antigen expression to dendritic cells induces potent CD8+ and CD4+ T-cell responses, *J Virol*, 82(1), 86-95.
- Luckashenak, N., et al. (2008)**, Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo, *Immunity*, 28(4), 521-532.
- Lund, A. H., and M. van Lohuizen (2004)**, Polycomb complexes and silencing mechanisms, *Curr Opin Cell Biol*, 16(3), 239-246.
- Maddon, P. J., et al. (1986)**, The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain, *Cell*, 47(3), 333-348.
- Malek, T. R. (2002)**, T helper cells, IL-2 and the generation of cytotoxic T-cell responses, *Trends Immunol*, 23(10), 465-467.
- Malim, M.H., and M. Emerman (2008)**, HIV-1 accessory proteins - ensuring viral survival in a hostile environment, *Cell Host Microbe*, 3(6), 388-98.
- Mann, R., et al. (1983)**, Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus, *Cell*, 33(1), 153-159.
- Marodon, G., et al. (2003)**, Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene, *Blood*, 101(9), 3416-3423.
- Marrack, P., and J. Kappler (1987)**, The T cell receptor, *Science*, 238(4830), 1073-1079.
- McKenna, H. J., and P. J. Morrissey (1998)**, Flt3 ligand plus IL-7 supports the expansion of murine thymic B cell progenitors that can mature intrathymically, *J Immunol*, 160(10), 4801-4809.
- Mattison, L. K., et al. (2002)**, Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil pharmacogenetics and pharmacogenomics, *Pharmacogenomics*, 3(4), 485-492.
- Meffre, E., et al. (2000)**, Antibody regulation of B cell development, *Nat Immunol*, 1(5), 379-385.

**Melchers, F., et al. (1993)**, The surrogate light chain in B-cell development, *Immunol Today*, 14(2), 60-68.

**Miller, D. G., et al. (1990)**, Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection, *Mol Cell Biol*, 10(8), 4239-4242.

**Miller, G., et al. (2002)**, Adenovirus infection enhances dendritic cell immunostimulatory properties and induces natural killer and T-cell-mediated tumor protection, *Cancer Res*, 62(18), 5260-5266.

**Miller, R. H., and N. Sarver (1997)**, HIV accessory proteins as therapeutic targets, *Nat Med*, 3(4), 389-394.

**Mitchell, R. S., et al. (2004)**, Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences, *PLoS Biol*, 2(8), E234.

**Miyoshi, H., et al. (1997)**, Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10319-10323.

**Mond, J. J., et al. (1979)**, Expression of Ia antigen on adult and neonatal B lymphocytes responsive to thymus-independent antigens, *J Immunol*, 123(4), 1619-1623.

**Moore, M. W., et al. (1988)**, Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation, *Cell*, 54(6), 777-785.

**Moreau, T., et al. (2004)**, Restriction of transgene expression to the B-lymphoid progeny of human lentivirally transduced CD34+ cells, *Mol Ther*, 10(1), 45-56.

**Moreau-Gaudry, F., et al. (2001)**, High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors, *Blood*, 98(9), 2664-2672.

**Murakami, M., et al. (1992)**, Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice, *Nature*, 357(6373), 77-80.

**Nadler, L. M., et al. (1983)**, B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes, *J Immunol*, 131(1), 244-250.

**Naldini, L., et al. (1996)**, In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector, *Science*, 272(5259), 263-267.

**Nemazee, D. A., and K. Burki (1989)**, Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes, *Nature*, 337(6207), 562-566.

**Nienhuis, A.W. (2008)**, Development of gene therapy for blood disorders, *Blood*, 111: 4431-4444.

- Niuro, H., and E. A. Clark (2002)**, Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals, *Nat Rev Immunol*, 2(12), 945-956.
- Nopora, A., and T. Brocker (2002)**, Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo, *J Immunol*, 169(6), 3006-3014.
- Nussenzweig, M. C., et al. (1987)**, Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu, *Science*, 236(4803), 816-819.
- Nutt, S. L., et al. (1999)**, Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax 5, *Nature*, 401(6753), 556-562.
- Obar, J. J., et al. (2008)**, Endogenous naive CD8<sup>+</sup>T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection, *Immunity*, 28(6), 859-869.
- Odawara, T., et al. (1998)**, Threshold number of provirus copies required per cell for efficient virus production and interference in moloney murine leukemia virus-infected NIH 3T3 cells, *J Virol*, 72(7), 5414-5424.
- Oliver, A. M., et al. (1999)**, IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells, *J Immunol*, 162(12), 7198-7207.
- Osmond, D. G. (1993)**, The turnover of B-cell populations, *Immunol Today*, 14(1), 34-37.
- Palmowski, M. J., et al. (2004)**, Intravenous injection of a lentiviral vector encoding NY-ESO-1 induces an effective CTL response, *J Immunol*, 172(3), 1582-1587.
- Pan, D., et al. (2002)**, Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of in vivo transduction of bone marrow, *Mol Ther*, 6(1), 19-29.
- Parker, D. C. (1993)**, T cell-dependent B cell activation, *Annu Rev Immunol*, 11, 331-360.
- Paulus, W., et al. (1996)**, Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells, *J Virol*, 70(1), 62-67.
- Pawliuk, R., et al. (2001)**, Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy, *Science*, 294(5550), 2368-2371.
- Pear, W. S., et al. (1993)**, Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8392-8396.
- Pfeifer, A., et al. (2002)**, Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), 2140-2145.

- Pichlmair, A., et al. (2007)**, Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-like receptor 9, *J Virol*, 81(2), 539-547.
- Pillai, S., et al. (2004)**, Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development, *Immunol Rev*, 197, 206-218
- Ploegh, H. L. (1998)**, Viral strategies of immune evasion, *Science*, 280(5361), 248-253.
- Radic, M. Z., et al. (1993)**, B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors, *J Exp Med*, 177(4), 1165-1173.
- Ramezani, A., et al. (2000)**, Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells, *Mol Ther*, 2(5), 458-469.
- Rathmell, J. C. (2004)**, B-cell homeostasis: digital survival or analog growth?, *Immunol Rev*, 197, 116-128.
- Refaeli, Y., et al. (2005)**, The protooncogene MYC can break B cell tolerance, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11), 4097-4102.
- Reiser, J., et al. (1996)**, Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(26), 15266-15271.
- Roe, T., et al. (1993)**, Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis, *Embo J*, 12(5), 2099-2108.
- Rolink, A., et al. (1995)**, In-vitro analyses of mechanisms of B-cell development, *Semin Immunol*, 7(3), 155-167.
- Rolink, A. G., et al. (2002)**, BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells, *Eur J Immunol*, 32(7), 2004-2010.
- Rossi, G. R., et al. (2003)**, High-efficiency lentiviral vector-mediated gene transfer into murine macrophages and activated splenic B lymphocytes, *Hum Gene Ther*, 14(4), 385-391.
- Rowe, H. M., et al. (2006)**, Immunization with a lentiviral vector stimulates both CD4 and CD8 T cell responses to an ovalbumin transgene, *Mol Ther*, 13(2), 310-319.
- Ryu, B. Y., et al. (2008)**, An experimental system for the evaluation of retroviral vector design to diminish the risk for proto-oncogene activation, *Blood*, 111(4), 1866-1875.
- Salio, M., et al. (1999)**, Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus, *Eur J Immunol*, 29(10), 3245-3253.
- Sanchez, M., et al. (1993)**, Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta, *J Exp Med*, 178(3), 1049-1055.

**Sato, S., et al. (1997)**, CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19, *J Immunol*, 158(10), 4662-4669.

**Schambach, A., et al. (2000)**, Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors, *Mol Ther*, 2(5), 435-445.

**Schlegel, R., et al. (1983)**, Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site?, *Cell*, 32(2), 639-646.

**Schlegel, R., and M. Wade (1983)**, Neutralized vesicular stomatitis virus binds to host cells by a different "receptor", *Biochem Biophys Res Commun*, 114(2), 774-778.

**Schonig, K., et al. (2002)**, Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo, *Nucleic Acids Res*, 30(23), e134.

**Schorpp, M., et al. (1996)**, The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice, *Nucleic Acids Res*, 24(9), 1787-1788.

**Schwenter, F., et al. (2003)**, Optimization of human erythropoietin secretion from MLV-infected human primary fibroblasts used for encapsulated cell therapy, *J Gene Med*, 5(3), 246-257.

**Sebzda, E., et al. (1994)**, Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide, *Science*, 263(5153), 1615-1618.

**Sethi, S., et al. (2007)**, Role of the CD8+ dendritic cell subset in transmission of prions, *J Virol*, 81(9), 4877-4880.

**Sha, W. C., et al. (1988)**, Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice, *Nature*, 336(6194), 73-76.

**Shen, Z., et al. (1997)**, Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules, *J Immunol*, 158(6), 2723-2730.

**Shortman, K., et al. (1990)**, The generation and fate of thymocytes, *Semin Immunol*, 2(1), 3-12.

**Snapper, C. M., et al. (1995)**, Multivalent, but not divalent, antigen receptor cross-linkers synergize with CD40 ligand for induction of Ig synthesis and class switching in normal murine B cells. A redefinition of the TI-2 vs T cell-dependent antigen dichotomy, *J Immunol*, 154(3), 1177-1187.

**Spangrude, G. J., et al. (1988)**, Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells, *Science*, 241(4861), 58-62.

**Sprent, J., et al. (1988)**, T cell selection in the thymus, *Immunol Rev*, 101, 173-190.

- Steinman, R. M., et al. (2003)**, Tolerogenic dendritic cells, *Annu Rev Immunol*, 21, 685-711.
- Kattman, S. J., et al. (2005)**, Maturation stage-dependent thymocyte responses to TCR engagement, *European Journal of Immunology*, 35(7), 2051-2060.
- Swain, S. L. (1983)**, T cell subsets and the recognition of MHC class, *Immunol Rev*, 74, 129-142.
- Takebe, N., et al. (2001)**, Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells, *Cancer Gene Ther*, 8(12), 966-973.
- Tedder, T. F., and C. M. Isaacs (1989)**, Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily, *J Immunol*, 143(2), 712-717.
- Tedder, T. F., et al. (1997)**, The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity, *Immunity*, 6(2), 107-118.
- Teh, H. S., et al. (1988)**, Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells, *Nature*, 335(6187), 229-233.
- Tiegs, S. L., et al. (1993)**, Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells, *J Exp Med*, 177(4), 1009-1020.
- Timens, W., et al. (1989)**, Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation, *Eur J Immunol*, 19(11), 2163-2166.
- Tonegawa, S. (1983)**, Somatic generation of antibody diversity, *Nature*, 302(5909), 575-581.
- Trono, D. (1995)**, HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast, *Cell*, 82(2), 189-192.
- Uchida, N., et al. (2009)**, Development of an HIV1-based lentiviral vector that allows efficient transduction of both human and rhesus blood cells, *J Virol*.
- Unsinger, J., et al. (2001)**, Retroviral vectors for the transduction of autoregulated, bidirectional expression cassettes, *Mol Ther*, 4(5), 484-489.
- Urlinger, S., et al. (2000)**, Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(14), 7963-7968.

**VandenDriessche, T., et al. (2002)**, Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo, *Blood*, 100(3), 813-822.

**Veiga-Fernandes, H., et al. (2000)**, Response of naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells to antigen stimulation in vivo, *Nat Immunol*, 1(1), 47-53.

**Verhoeyen, E., et al. (2003)**, IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes, *Blood*, 101(6), 2167-2174.

**Vigna, E., et al. (2002)**, Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors, *Mol Ther*, 5(3), 252-261.

**Vogelzang, A., et al. (2008)**, A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells, *Immunity*, 29(1), 127-137.

**Vogt, P.K. (1997)**, Historical introduction to the general properties of retroviruses, in Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, H.E., *Retroviruses*, CSHL Press, New York, 1-25.

**von Boehmer, H., et al. (1989)**, The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen, *Immunol Rev*, 109, 143-151.

**Wang, H., et al. (1991)**, Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter, *Nature*, 352(6337), 729-731.

**Wardemann, H., et al. (2002)**, B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen, *J Exp Med*, 195(6), 771-780.

**Weiss, R. A., and C. S. Taylor (1995)**, Retrovirus receptors, *Cell*, 82(4), 531-533.

**Werner, M., et al. (2004)**, B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element, *Gene Ther*, 11(12), 992-1000.

**Werner-Klein, M., et al. (2007)**, Transcriptional targeting of B cells for induction of peripheral CD8 T cell tolerance, *J Immunol*, 178(12), 7738-7746.

**Wherry, E. J., et al. (1999)**, The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained, *J Immunol*, 163(7), 3735-3745.

**Winkler, T. H., et al. (1995)**, Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface, *Eur J Immunol*, 25(2), 446-450.

**Witzgall, R., et al. (1994)**, The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(10), 4514-4518.

**Wolf, M. L., et al. (1991)**, Development of a bone marrow culture for maintenance and growth of normal human B cell precursors, *J Immunol*, 147(10), 3324-3330.

**Wu, X., et al. (2003)**, Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration, *Science*, 300(5626), 1749-1751.

**Yin, D. X., et al. (1996)**, Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression, *Anal Biochem*, 235(2), 195-201.

**Zandvoort, A., and W. Timens (2002)**, The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens, *Clin Exp Immunol*, 130(1), 4-11.

**Zhou, L. J., et al. (1994)**, Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development, *Mol Cell Biol*, 14(6), 3884-94.

**Zufferey, R., et al. (1997)**, Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo, *Nat Biotechnol*, 15(9), 871-875.

**Zufferey, R., et al. (1999)**, Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors, *J Virol*, 73(4), 2886-2892.

## 8 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name	Katrin Nopora, geb. Sturm
Geburtsdatum	02. November 1978
Geburtsort	München
Nationalität	deutsch
Wohnort	An der Freiheit 105, 82377 Penzberg

### Schulbildung und Studium

Mai 1998	Abitur am Sophie-Scholl-Gymnasium, München
Oktober 1998 - Oktober 2000	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
Oktober 2000 - März 2004	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Februar 2003 - Oktober 2003	Diplomarbeit am Max von Pettenkofer-Institut München, Abt. Prof. J. Heesemann, PD Dr. F. Ebel Titel der Arbeit: „Untersuchung der Interaktionen von Makrophagen mit dem humanpathogenen Schimmelpilz <i>Aspergillus fumigatus</i> “
Januar 2005 - September 2009	Doktorarbeit am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abt. Prof. T. Brocker

### Berufserfahrung

April 2004 - Dezember 2004	Praktikum und Mitarbeit als Diplombiologin bei der Bavarian Nordic GmbH, Martinsried, Abt. Vakzinentwicklung
seit Oktober 2009	Anstellung als <i>Scientist</i> bei der Bavarian Nordic GmbH, Martinsried, Abt. Vakzinentwicklung



## 9 DANKSAGUNG

**Frau Prof. Ruth Brack-Werner** danke ich herzlich für ihre Bereitschaft, das Erstgutachten zu übernehmen und mir damit die Promotion an der Fakultät für Biologie der LMU München zu ermöglichen. Besonders geschätzt habe ich ihr Interesse an meiner Arbeit und die konstruktiven Vorschläge.

**Herrn Prof. Charles N. David** danke ich, dass er trotz des straffen Zeitplans dazu bereit war, das Zweitgutachten zu übernehmen.

**Herrn Prof. Thomas Brocker** möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, sowie für die konzeptionelle und wissenschaftliche Freiheit, die er mir bei der Bearbeitung meines Projekts eingeräumt hat. Auch die Gelegenheit zur Teilnahme an verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen habe ich sehr geschätzt.

Ein großer Dank gilt allen **Labor-Kollegen** für die freundschaftliche und fröhliche Atmosphäre, sowie die stete Hilfsbereitschaft und Anteilnahme sowohl in wissenschaftlicher als auch persönlicher Hinsicht. Danke für die schöne Zeit!

Bei **Andrea Bol** und dem ganzen **Tierstallteam** möchte ich mich für die zuverlässige Mäusepflege, sowie die Flexibilität bei kurzfristig geplanten Versuchen bedanken.

**Frau Mair, Frau Rothenaigner, Frau Wolf und Frau Kozar** danke ich für die verlässliche Hilfe in allen administrativen Angelegenheiten.

**Adam** danke ich sehr für das genaue und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie für die Hilfe in allen Fragen der Formatierung. Und dafür, dass er zur richtigen Zeit am richtigen Ort war.

Mein größter Dank gilt **meinen Eltern** für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung, mit der sie mein Leben begleiten.





## 10 ERKLÄRUNG

### Erklärung

Ich versichere, dass ich die Dissertation „Entwicklung lentiviraler Vektoren für die B-zellspezifische Expression von Transgenen *in vivo*“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Hilfen und Quellen bedient.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat auch noch keinen anderen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

(Katrin Nopora)