

**Entwicklung
eines B-zellspezifischen
retroviralen Vektors
zur Gentherapie**

**Dissertation der
Ludwigs-Maximilians-Universität
München**

Romana Ida Friedrich



München 2010

Aus dem Institut für Immunologie der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorstand: Prof. Dr. T. Brocker

**Entwicklung
eines B-zellspezifischen
retroviralen Vektors
zur Gentherapie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Romana Ida Friedrich

aus
Titisee-Neustadt
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres
Priv. Doz. Dr. Anja Ehrhardt

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 1 Zusammenfassung | 11 |
| 2 Einleitung | 13 |
| 2.1 Das Immunsystem | 13 |
| 2.1.1 <i>Einführung</i> | 13 |
| 2.1.2 <i>Lymphatische Organe</i> | 14 |
| 2.1.3 <i>T-Zellen</i> | 16 |
| 2.1.4 <i>B-Zellen</i> | 19 |
| 2.2 Klinischer Bezug der Arbeit | 24 |
| 2.3 Gentherapie | 25 |
| 2.4 Retroviren und retrovirale Vektoren | 27 |
| 2.4.1 <i>Das Retrovirus</i> | 27 |
| 2.4.2 <i>Retrovirale Vektoren</i> | 29 |
| 2.5 Transkriptionsregulierende Elemente | 31 |
| 2.6 Zielsetzung und Arbeitsprogramm | 32 |
| 3 Material und Methoden | 34 |
| 3.1 Material | 34 |
| 3.1.1 <i>Antikörper</i> | 34 |
| 3.1.2 <i>Chemikalien</i> | 34 |
| 3.1.3 <i>Geräte</i> | 35 |
| 3.1.4 <i>Lösungen und Medien</i> | 35 |
| 3.1.5 <i>Mäusestamm</i> | 38 |
| 3.1.6 <i>Retrovirale Vektoren</i> | 39 |
| 3.1.7 <i>Verbrauchsmaterialien</i> | 40 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden | 41 |
| 3.2.1 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i> | 41 |
| 3.2.2 <i>Bakterienkultur</i> | 41 |
| 3.2.3 <i>Bestimmung von DNA-Konzentrationen</i> | 42 |
| 3.2.4 <i>Herstellung chemokompetenter Bakterien</i> | 42 |
| 3.2.5 <i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel</i> | 42 |
| 3.2.6 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> | 43 |
| 3.2.7 <i>Ligation von DNA-Fragmenten</i> | 43 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.8 | <i>Transformation chemokompetenter Bakterien</i> | 43 |
| 3.3 | Immunologische Methoden | 44 |
| 3.3.1 | <i>Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)</i> | 44 |
| 3.3.2 | <i>Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern</i> | 45 |
| 3.3.3 | <i>Entnahme von lymphatischen Organen bei der Maus</i> | 45 |
| 3.3.4 | <i>Erythrozytolyse</i> | 46 |
| 3.3.5 | <i>Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität</i> | 46 |
| 3.3.6 | <i>Generierung von Knochenmarkschimären</i> | 47 |
| 3.3.7 | <i>Generierung von retroviralen Vektorüberständen</i> | 47 |
| 3.3.8 | <i>Kultur von Phoenix-eco und -ampho-Zellen</i> | 48 |
| 3.3.9 | <i>Kultur von HSPC</i> | 48 |
| 3.3.10 | <i>Kultur von primären murinen B-Zellen</i> | 49 |
| 3.3.11 | <i>Kultur von HELA- und JY-Zellen</i> | 49 |
| 3.3.12 | <i>Magnetische Zellseparation (MACS)</i> | 49 |
| 3.3.13 | <i>Transduktion von HSPC, primären B-Zellen, HELA- und JY-Zellen</i> | 50 |
| 3.4 | Statistik | 51 |
| 4 | Ergebnisse | 52 |
| 4.1 | Entwicklung eines B-zellspezifischen retroviralen Vektors | 52 |
| 4.2 | <i>In vitro</i>-Analyse | 55 |
| 4.2.1 | <i>Zelllinien</i> | 55 |
| 4.2.2 | <i>Primäre murine B-Zellen</i> | 59 |
| 4.3 | <i>In vivo</i>-Analyse | 61 |
| 4.3.1 | <i>Immunzellen der Milz</i> | 62 |
| 4.3.2 | <i>Immunzellen der Lymphknoten</i> | 64 |
| 4.3.3 | <i>Immunzellen des Knochenmarks</i> | 66 |
| 4.3.4 | <i>Immunzellen des Thymus</i> | 69 |
| 4.4 | Einfluss von Mehrfachtransduktion <i>in vivo</i> | 72 |
| 4.4.1 | <i>Immunzellen der Milz</i> | 72 |
| 4.4.2 | <i>Immunzellen der Lymphknoten</i> | 76 |
| 5 | Diskussion | 79 |
| 5.1 | <i>In vitro</i>-Analyse | 79 |
| 5.2 | <i>In vivo</i>-Analyse | 83 |
| 5.3 | Ausblick | 89 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 91 |

| | | |
|------------|----------------------|------------|
| 7 | Anhang | 104 |
| 7.1 | Plasmidkarten | 104 |
| 7.1.1 | <i>CD19-1000</i> | 104 |
| 7.1.2 | <i>CD19-1000-E</i> | 105 |
| 7.1.3 | <i>CD19-200</i> | 106 |
| 7.1.4 | <i>CD19-200-E</i> | 107 |
| 7.2 | Danksagung | 108 |
| 7.3 | Lebenslauf | 110 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| APC | Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) |
| BCR | B-Zellrezeptor (<i>B cell receptor</i>) |
| bp | Basenpaar (<i>base pair</i>) |
| CD | Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>) |
| DC | Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>) |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| eGFP | Verstärkt grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>) |
| FACS | Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>) |
| FBS | Fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>) |
| FITC | <i>Fluoresceinisothiocyanate</i> |
| 5-FU | 5-Fluoro-Uracil |
| HLA | Humaner Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>human leukocyte antigen</i>) |
| HSPC | Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (<i>hematopoietic stem and progenitor cells</i>) |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| i.v. | Intravenös |
| LTR | Lange terminale Wiederholung (<i>long-terminal repeat</i>) |
| MAR | An die Matrix gebundene Region (<i>matrix attachment region</i>) |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) |
| MFI | Mittlere Fluoreszenzintensität |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>buffered saline solution</i>) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PerCP | <i>Peridinin-Chlophyll-a Protein</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| SIN | Selbst-Inaktivierend (<i>self-inactivating</i>) |
| TCR | T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>) |
| TGF | Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>) |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| WPRE | Posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitis- virus des Waldmurmeltiers (<i>woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element</i>) |
| w/v | Masse pro Volumen |
| w/w | Masse pro Masse |

Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten abgekürzt. Für die Abkürzungen gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde gemäß Duden verfahren.

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, einen retroviralen Vektor für gezielte, regulierte Transgenexpression und Expressionsverstärkung in B-Zellen zu entwickeln.

Es wurden Untersuchungen bezüglich des Einflusses eines zellspezifischen Transkriptionsverstärkers ($E\mu$), flankiert von an die Matrix gebundenen Regionen (MARs), und des Einflusses verschiedener Fragmente des B-Zellspezifischen CD19-Promoters (200 bp und 1000 bp) auf die B-Zellspezifität der Transgenexpression durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene retrovirale Vektoren kloniert, welche entweder ein 200 bp- oder ein 1000 bp-Fragment des CD19-Promoters, zum Teil in Kombination mit einem Transkriptionsverstärker MAR- $E\mu$ -MAR, enthielten. Diese Vektoren wurden in Zelllinien und primären B-Zellkulturen *in vitro* sowie in murinen Knochenmarkschimären *in vivo* untersucht.

Hierbei zeigte das 1000 bp-Fragment des CD19-Promoters die gewünschte B-Zellspezifität, während das 200 bp-Fragment zu unspezifischer Expression des Transgens in Zelllinien führte. *In vitro* führte der Transkriptionsverstärker MAR- $E\mu$ -MAR in den Zelllinien zu keiner signifikanten Steigerung der Transgenexpression, während sich in primären murinen B-Zellen eine signifikante Expressionsverstärkung durch den Transkriptionsverstärker MAR- $E\mu$ -MAR zeigte.

Auch bei der Analyse der Knochenmarkschimären zeigte sich eine B-zellspezifische Steigerung der Transgenexpression durch den Transkriptionsverstärker MAR- $E\mu$ -MAR sowohl bei dem 200 bp- als auch bei dem 1000 bp-Promoterfragment. Das kürzere Promoterfragment führte *in vivo* in den Knochenmarkschimären teilweise zu unspezifischer Transgenexpression, während das 1000 bp-Fragment des CD19-Promoters zu weitgehend B-zellspezifischer Transgenexpression führte.

Zusammenfassend führte der retrovirale Vektor mit dem B-zellspezifischen 1000 bp-Fragment des CD19-Promoters und dem Transkriptionsverstärker

MAR-E μ -MAR *in vivo* und *in vitro* zu weitgehend B-zellspezifischer Transgenexpression mit B-zellspezifischer Transkriptionsverstärkung durch MAR-E μ -MAR.

Dieser retrovirale Vektor könnte in Zukunft ein wichtiges Werkzeug zur Weiterentwicklung der Gentherapie sein, bei der aufgrund der gravierenden Nebenwirkungen in der klinischen Anwendung der letzten Jahre, Aspekte der Sicherheit immer mehr an Bedeutung gewinnen. Zellspezifische Transgenexpression führt zu mehr Sicherheit in der Gentherapie. Weitere möglicherweise gefährliche Aspekte wie beispielsweise onkogenes Potential retroviraler Vektoren durch insertionale Mutagenese (Hematti et al. 2004, Montini et al. 2006) oder noch nicht absehbare unerwünschte Nebenwirkungen der klinischen Gentherapie werden sicherlich in naher Zukunft weitere Anforderungen an die Sicherheit und Regulierbarkeit viraler Vektoren stellen.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

2.1.1 Einführung

Erst im 19. Jahrhundert bewies Robert Koch, dass Infektionskrankheiten von pathogenen Mikroorganismen verursacht werden. Vor diesen Pathogenen in Form von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten schützt das körpereigene Immunsystem. Die ersten Barrieren gegen Krankheitserreger sind mechanischer und chemischer Natur: Die Epithelien von Haut und Schleimhäuten schützen vor dem Eindringen pathogener Organismen in den Körper ebenso wie Flimmerepithelien und Zilien im Atmungsapparat. Verschiedene Enzyme und ein niedriger pH, zum Beispiel im Magen, erschweren das Überleben der eindringenden Krankheitserreger. Diese Eigenschaften sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems, welches im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem das phylogenetisch ältere ist und dazu in der Lage, Mikroorganismen sofort zu bekämpfen. Zum angeborenen Immunsystem gehört zudem der alternative Weg der Komplementaktivierung, welches zur Opsonierung von Bakterien führt und ihre Aufnahme durch Phagozyten wie Makrophagen, Natürliche Killerzellen und Granulozyten stimuliert.

Das Hauptmerkmal des adaptiven Immunsystems ist, dass es zuerst induziert werden muss und die Erreger nicht sofort, sondern erst nach einigen Tagen bekämpfen kann. Durch die Gedächtnisfunktion, eine zweite spezifische Eigenschaft des adaptiven Immunsystems, besteht ein gewisser Schutz vor wiederholter Infektion mit demselben Erreger. Zellen der adaptiven Immunabwehr können spezifische Strukturen (Antigene) der Erreger erkennen und so gezielt Abwehrmechanismen in Gang setzen. Bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort spielen die antigenpräsentierenden Zellen (Dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen) eine entscheidende Rolle. Sie präsentieren den Zellen der adaptiven Immunantwort Antigene in Form

eines Komplexes aus Peptid und MHC-Molekül und können so die Zellen aktivieren. Die Effektormechanismen der adaptiven Immunantwort beruhen auf zwei Zellarten: T-Zellen vermitteln die zelluläre Immunität zur Abwehr intrazellulärer Mikroorganismen, B-Zellen sezernieren Antikörper und vertreten somit den humoralen Arm (Janeway et al. 1997). Diese Arbeit befasst sich insbesondere mit B-Zellen, deren Entwicklung und Funktion weiter unten beschrieben wird.

2.1.2 Lymphatische Organe

Die primären adulten lymphatischen Organe, Thymus und Knochenmark, sind die Orte im Körper, an dem aus Vorläuferzellen B- und T-Zellen entstehen. In den lymphatischen Organen finden außerdem die negative und die positive Selektion der genetisch rekombinierten Antigenrezeptoren statt, um Autoaktivität und Funktionstüchtigkeit der Lymphozyten zu überprüfen (Boehm, Bleul 2007).

Ihre Entwicklung wird evolutionär früher angesiedelt als die der sekundären Lymphorgane, wie zum Beispiel Lymphknoten, Milz, Tonsillen oder Peyersche Plaques. Hier treffen Antigene, Lymphozyten und andere Immunzellen aufeinander. Da in der vorliegenden Arbeit einzelne Lymphorgane der Mäuse analysiert werden, folgt eine kurze Beschreibung.

Milz

Die Milz lässt sich strukturell in weiße und rote Pulpa unterteilen. Eine der Aufgaben der Milz ist das Filtern des Blutes. In der weißen Pulpa befinden sich Kompartimente von T- und B-Zellen, deren strenge Organisation u.a. durch Chemokine gesteuert wird. Durch die große Menge an Blut, die durch die Marginalzone der Milz fließt, kann das Blut hier von den Immunzellen gut überwacht werden. In der T-Zell-Zone der weißen Pulpa interagieren T-Zellen mit Dendritischen Zellen und B-Zellen, während in den B-Zell-Follikeln die klonale

Expansion aktivierter B-Zellen stattfindet, die zum Wechsel der Isotypen und zur somatischen Hypermutation führt. Während in der Marginalzone adaptive und angeborene Immunität vorhanden sind, ist die weiße Pulpa dem adaptiven Immunsystem vorbehalten (Mebius et al. 2005). Das Einwandern antigen-präsentierender Zellen in die weiße Pulpa kann die Immunantwort über B- und T-Zellen aktivieren, die sich wiederum gegenseitig weiter zu Differenzierung stimulieren.

Lymphknoten

Lymphknoten bestehen aus der äußeren Kapsel, dem Kortex und der inneren Medulla. Antigene in der Lymphe treten im Lymphknoten in Kontakt mit Immunzellen. Hier findet einerseits unspezifische Phagozytose statt, andererseits wird durch Antigenpräsentation die Differenzierung und Vermehrung der antigenspezifischen Lymphozyten angeregt und somit die spezifische Immunantwort.

Lymphknoten sitzen verteilt im ganzen Körper, insbesondere im Nacken, entlang der Halsgefäße, in der Achselhöhle, der Leiste und an den inneren Organen wie Magen, Darm und Leber (Schiebler 2004, Janeway et al. 1997). Durch das ubiquitäre Vorkommen der Lymphknoten sind sie bei lokalen Entzündungen und Verletzungen die erste Station, wo eine lokale Immunreaktion ausgelöst wird. In dieser Arbeit wurden die inguinalen Lymphknoten von murinen Knochenmarkschimären entnommen und analysiert.

Knochenmark

Das Knochenmark ist beim Erwachsenen der wichtigste Ort der Neubildung von Blutzellen. Hier entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen sowohl Granulozyten, Monozyten, Natürliche Killerzellen, Dendritische Zellen und Lymphozyten als auch Erythrozyten und Thrombozyten. Etwa 0,01% aller kernhaltigen Zellen im Knochenmark von Mäusen sind hämatopoetische Stamm-

zellen. Das Knochenmark ist das lymphatische Organ, in welchem die Entwicklung der B-Zellen von der frühen Pro-B-Zelle bis zur transitionalen B-Zelle stattfindet (Melchers et al. 1995). Mittlerweile geht man davon aus, dass diese im Verlauf der Differenzierung zu einer bestimmten Zelle ihre Pluripotenz länger behalten, als bisher angenommen (Rolink et al. 2006).

Thymus

Der Thymus besteht aus mehreren Lobuli, von welchen jedes in Mark und Rinde geteilt ist. Bei jungen Menschen findet man eingebettet in Stroma, das eine besondere Mikroumgebung bietet, zahlreiche Vorstufen von T-Zellen. Die T-Zell-Produktion im Thymus lässt nach der Pubertät nach, so dass auch das Organ selbst kleiner wird (Schiebler 2004).

Thymozyten aus dem Knochenmark durchwandern die Lobuli von außen nach innen und reifen dabei zu T-Zellen. Die T-Zellen werden positiver und negativer Selektion unterzogen, so dass nur T-Zellen überleben, welche körpereigene MHC-Moleküle erkennen und selbsttolerant sind (Sprent et al. 2001). T-Zellen wandern aus dem Thymus über die Blutbahn zu den sekundären lymphatischen Organen und zirkulieren in den Körperflüssigkeiten.

2.1.3 T-Zellen

Die Entwicklung von T-Zellen

Ebenso wie die B-Zelle stammt die T-Zelle aus dem Knochenmark, sie kann jedoch schon früh, noch als pluripotente Vorläuferzelle, in den Thymus abwandern. Sie differenziert sich dort zu zwei verschiedenen Linien: den $\alpha\beta$ -T-Zellen und den $\gamma\delta$ -T-Zellen. Im Thymus reift die T-Zelle und durchläuft währenddessen im spezialisierten Mikromilieu des Thymus die Umordnung des T-Zell-Rezeptors. Es gibt verschiedene Ansätze dazu, wann und warum sich die Vorläuferzelle zur $\alpha\beta$ - oder zur $\gamma\delta$ -Zelle entwickelt (Joachims et al. 2006).

Die T-Zelle muss zwei Selektionsschritte durchlaufen: Die positive Selektion, die voraussetzt, dass die Zelle eigene MHC-Moleküle erkennt und die negative Selektion, die zur Selbsttoleranz führt. Nur etwa 2% der Vorläuferzellen bestehen beide Selektionen und verlassen den Thymus in Form von reifen naiven T-Zellen. Ein Versagen der Selbsttoleranz kann sich in Form von Autoimmunkrankheiten manifestieren (Zehn et al. 2006, Steinmann 2004). T-Zellen, welche Selbstantigene erkennen und dennoch der intrathymischen negativen Selektion entgehen, können peripher durch verschiedene Mechanismen toleriert werden, unter anderem spielen hierbei auch B-Zellen eine direkte Rolle (Bennett et al. 1998).

T-Zellen können Antigene nur in Form von Peptidfragmenten, die an MHC-codierte Moleküle gebunden sind, erkennen. In welchem Entwicklungsstadium sich die T-Zelle befindet, ist an den spezifischen Oberflächenmarkern zu erkennen. Neben dem T-Zellrezeptor spielen hier CD4 und CD8 eine große Rolle. Die frühesten Vorläufer-T-Zellen sind für beide Oberflächenmarker negativ, dann doppelt positiv, ehe sie sich entweder zu CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen differenzieren und vom Thymusmark in die Peripherie migrieren. Neben diesen $\alpha\beta$ -T-Zellen, entstehen auch $\gamma\delta$ -T-Zellen, die u.a. zur Regulation der $\alpha\beta$ -Zellen dienen und besonders im Gewebe aktiv sind (Hayday and Pennington 2007).

Die Funktion der T-Zelle und der MHC-Komplex

Im Gegensatz zur B-Zelle erkennt die T-Zelle Pathogene nicht in ihrer nativen Form, sondern nur, wenn sie in der Zelle prozessiert wurden und in Peptidform als Komplex mit einem MHC-Molekül präsentiert werden.

MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die polygen und polymorph sind und ein breites Spektrum verschiedener Peptide binden können. MHC I besteht aus einer Alpha-Kette, die membranständig ist und einem Beta2-Mikroglobulin. Zytoplasmatische Proteine werden in der Zelle durch das Proteasom abgebaut, die Peptide werden ins ER transloziert, wo das MHC I-Molekül beladen und mit Hilfe von Calnexin als kompletter MHC I-Peptid-Komplex an die Zelloberfläche

transportiert wird. Da im Zytosol, abhängig vom Gesundheitsstatus, vor allem virale Pathogene zu finden sind, exprimieren fast alle kernhaltigen Zellen MHC I (Janeway 1997). MHC II-Moleküle bestehen aus zwei membranständigen Ketten, der α - und der β -Kette und präsentieren im Gegensatz zu MHC I-Molekülen exogene Antigene. Das exogene Antigen wird internalisiert und proteolytisch in Endo-/Lysosomen gespalten, ehe diese mit vom ER stammenden Vesikeln, welche MHC II-Moleküle enthalten, fusionieren. Die MHC II-Moleküle binden so Peptidfragmente der Pathogene und transportieren diese in Form von MHC II-Peptid-Komplexen an die Zelloberfläche (Geuze 1998). MHC II-Moleküle werden nur von Zellen exprimiert, die an der Immunantwort beteiligt sind, besonders von B-Zellen und Makrophagen, aber auch von anderen antigenpräsentierenden Zellen und im Thymusstroma.

T-Zell-Rezeptoren sind strukturell mit Antikörpern verwandt. Sie werden ebenso wie diese von V-, D- und J-Gensegmenten codiert, die sich zu V-Domänen-Exons umordnen. Der T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei Polypeptidketten, der Alpha- und der Beta-Kette, die eine konstante und eine variable Region bilden. Anhand der MHC-bindenden Corezeptormoleküle CD4 und CD8 können die verschiedenen T-Zellen voneinander unterschieden werden. CD8-T-Zellen treten nur mit Komplexen aus Peptid und MHC I in Verbindung. Durch die Bindung werden sie aktiviert und eliminieren die betroffene Zelle; dies sind die zytotoxischen T-Zellen (Doherty et al. 1992). CD4-T-Zellen erkennen nur Peptide, die an MHC II gebunden sind. Es gibt inflammatorische CD4-T-Zellen, welche u.a. Makrophagen dazu aktivieren, Bakterien zu eliminieren, und CD4-T-Helferzellen, welche B-Zellen zur Produktion von Antikörpern und zum Antikörper-Klassenwechsel aktivieren. Die Bindung des Antigens an den T-Zell-Rezeptor löst eine Reihe biochemischer Veränderungen in der T-Zelle aus, welche zur Stimulierung der Proliferation bei bestimmten Zelltypen führen. Als weitere wichtige T-Zellsubpopulation werden die regulatorischen T-Zellen und deren Rolle bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Immunantworten betrachtet (Le und Chao 2007).

2.1.4 B-Zellen

Da diese Arbeit sich insbesondere mit B-Zellen befasst, sollen diese hier ausführlicher beschrieben werden.

Die Entwicklung von B-Zellen

Durch die Entwicklung von Knochenmarksstammzellen zu reifen B-Lymphozyten entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher B-Zellen, die ein großes Repertoire an Antigenen erkennen. Die ersten Schritte von der hämatopoetischen Stammzelle zur unreifen B-Zelle erfolgen bei Säugetieren im Knochenmark, während der Fetalzeit in der Leber (Hardy et al. 2000). Abhängig von direktem Kontakt mit Stromazellen und von verschiedenen Wachstumsfaktoren wird die Stammzelle zur Differenzierung stimuliert. Die Entwicklungsstadien werden nach dem Status des Arrangements der Genloci der schweren und leichten Kette der Immunglobuline eingeteilt und mit Hilfe von Oberflächenmarkern unterschieden. Für die Festlegung einer Zelle auf eine zukünftige B-Zelle sind drei Transkriptionsfaktoren notwendig: E2A, early B cell factor (EBF) und Pax 5 (Rolink et al. 2001).

Im ersten Schritt entsteht die Prä-Pro-B-Zelle, daraus die Pro-B-Zelle (Abbildung 1). In diesem Stadium verknüpfen sich bereits Anteile der schweren Kette des späteren B-Zell-Rezeptors. Zuerst lagern sich hierbei die Genloci von Dh und Jh zusammen, dann folgt die Umlagerung des Genlocus von Vh an den DhJh-Locus (Rolink et al. 1999). Dieses Arrangement verschiedener Genloci führt zum großen Repertoire unterschiedlicher B-Zell-Rezeptoren und Immunglobuline. Im folgenden Stadium, dem Stadium der Prä-B-Zelle existiert bereits eine intakte schwere Kette, die Umordnung der leichten Kette beginnt. Rund 10% aller B-Zellen exprimieren die schwere Kette im Zytoplasma. Nur die Hälfte dieser Zellen wiederum ist in der Lage, diese auch mit der leichten Kette zu paaren (Rolink et al. 2001). Aus der Prä-B-Zelle entsteht die unreife B-Zelle (Abbildung 1). Sie trägt an ihrer Oberfläche ein komplettes Immunglobulinmolekül. Um Selbst-

toleranz zu entwickeln, führt die Bindung von eigenen Antigenen in diesen frühen Entwicklungsstadien zu Inaktivierung und Verlust der B-Zelle (Murakami et al. 1992). Es findet die positive Selektion statt, die B-Zellen mit nicht funktionellem Zellrezeptor aussortiert und die negative Selektion, die B-Zellen mit autoreaktiven Rezeptoren durch Apoptose und Anergisierung inaktiviert. Es verbleiben nur B-Zellen mit funktionstüchtigem Rezeptor, der nicht gegen körpereigene Zellen gerichtet ist (Melchers et al. 1995).

B-Zellen durchlaufen in ihrer Entwicklung mehrere kritische Selektionspunkte, wie unter anderem die Herstellung einer funktionalen schweren Kette, die erfolgreiche Zusammensetzung des B-Zell-Rezeptors und die Nichtexistenz von Autoreaktivität (Hardy et al. 2000, Melchers et al. 2000, Rolink et al. 1999).

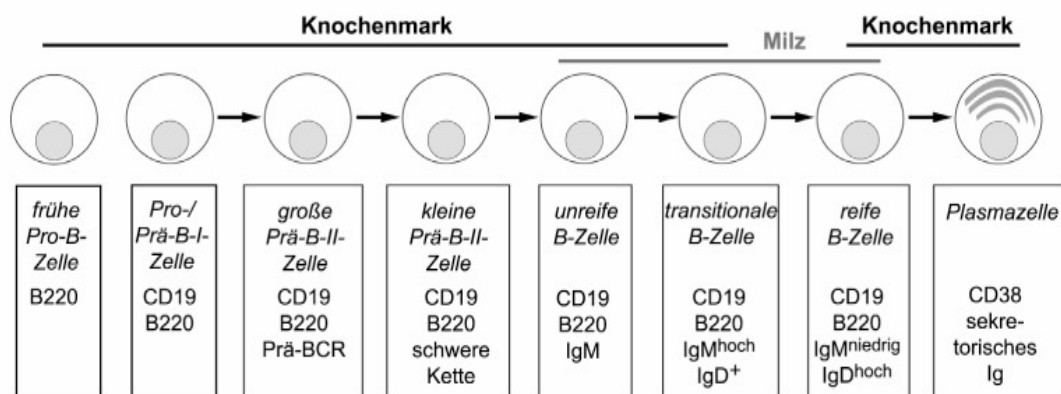


Abbildung 1: Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark und in der Milz. Ausgehend von einer hämatopoetischen Vorläuferzelle differenzieren sich die Zellen über das Pro-B- und Prä-B-Zellstadium zu unreifen und transitionalen B-Zellen. Diese wandern zur Milz und entwickeln sich dort zu reifen B-Zellen, welche durch das Blut, Gewebe, Knochenmark und Lymphe zirkulieren. Binden reife B-Zellen mit ihrem B-Zellrezeptor ihr spezifisches Antigen, so werden sie aktiviert und differenzieren zu Plasmazellen, die große Mengen spezifischer Antikörper sezernieren. Die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der B-Zellen können anhand ihrer differentiellen Expression bestimmter Marker wie B220, CD19, IgM und IgD unterschieden werden (Quelle: Werner 2005).

Die unreife B-Zelle wandert aus dem Knochenmark zur Milz und wird zur transitionalen B-Zelle, die IgM und IgD Moleküle exprimiert (Abbildung 1). Diese ist kurzlebig und funktionell unreif. Nur wenige dieser transitionalen B-Zellen werden zu reifen B-Zellen, die im Blut- und Lymphsystem zirkulieren. Entsteht ein Kontakt mit einem Antigen und einer Ag-spezifischen T-Helfer-Zelle, wandert sie ins Zentrum der Lymphfollikel um ein Keimzentrum zu bilden. Dort findet intensive Proliferation von B-Zellen statt und antikörpersezernierende Plasmazellen entstehen. Diese sind besonders in Milz, Knochenmark und den Marksträngen der Lymphknoten zu finden. Die B-Zellen sind den verschiedenen Entwicklungsstadien anhand der Expression verschiedener Gene (z.B. Rag 1 und 2) auf der Zellmembran und im Zytoplasma sowie anhand des Status des Arrangements der schweren und leichten Ketten der Immunglobuline zuzuordnen (Ghia et al. 1998). Mittels Durchflusszytometrie sind die Stadien der B-Zellen durch die jeweils typischen Oberflächenmarker zu erkennen. Einer der am frühesten zu findenden Oberflächenmarker ist CD45 (in Mäusen B220). Die folgenden B-Zellvorläufer sowie die reifen B-Zellen exprimieren außerdem den Oberflächenmarker CD19 (Hardy, Hayakawa 2001). Trotz einiger Unterschiede ist grundsätzlich der Entwicklungspfad der B-Zellen in Menschen dem murinen sehr ähnlich (Ghia et al. 1998).

Die Funktion von B-Zellen

Die Hauptrolle der B-Lymphozyten in der adaptiven Immunantwort besteht in der Sekretion von Antikörpern. Antikörper gehören zu den Immunglobulinen. Sie bestehen aus je zwei variablen und zwei konstanten Bereichen. Die variablen Bereiche dienen der Erkennung und Bindung spezifischer Antigene, die konstanten Bereiche vermitteln die Effektorfunktion durch verschiedene Isotypen (Neuberger et al. 1993). Es sind fünf verschiedene Isotypen bekannt, die sich im Bezug auf ihre Funktion und den Ort im Körper, wo sie vorkommen unterscheiden. Prozentual am häufigsten ist IgG, welches sowohl das Komplementsystem als auch die Phagozytose aktiviert. In einer Antikörper-

antwort wird zum frühesten Zeitpunkt IgM sezerniert, das hauptsächlich der Aktivierung des Komplementsystems dient. IgE löst eine Degranulierung von Mastzellen aus, während IgA die Immunität der Schleimhäute gewährleistet (Kunkel et al. 2003). Der B-Zellrezeptor ist eine membranständige Form der später sezernierten Antikörper (Abbildung 2). Mit diesem Rezeptor erkennt die B-Zelle Antigene in ihrer nativen Form und bindet sie. Neben oben beschriebenem variablem Arrangement der Genloci, welches zu großer Vielfalt von B-Zell-Rezeptoren und Immunglobulinen führt, ist auch somatische Hypermutation beschrieben, die zu Mutationen in der Region des Gens der variablen Immunglobulinregion führt. Die Mutationsrate in diesem Locus ist bis zu zehn Mal häufiger als in somatischen Zellen und führt dazu, dass die B-Zellklone mit den Rezeptoren mit der höchsten Antigenaffinität selektiert werden (Odegard et al. 2006, Peled et al. 2008).

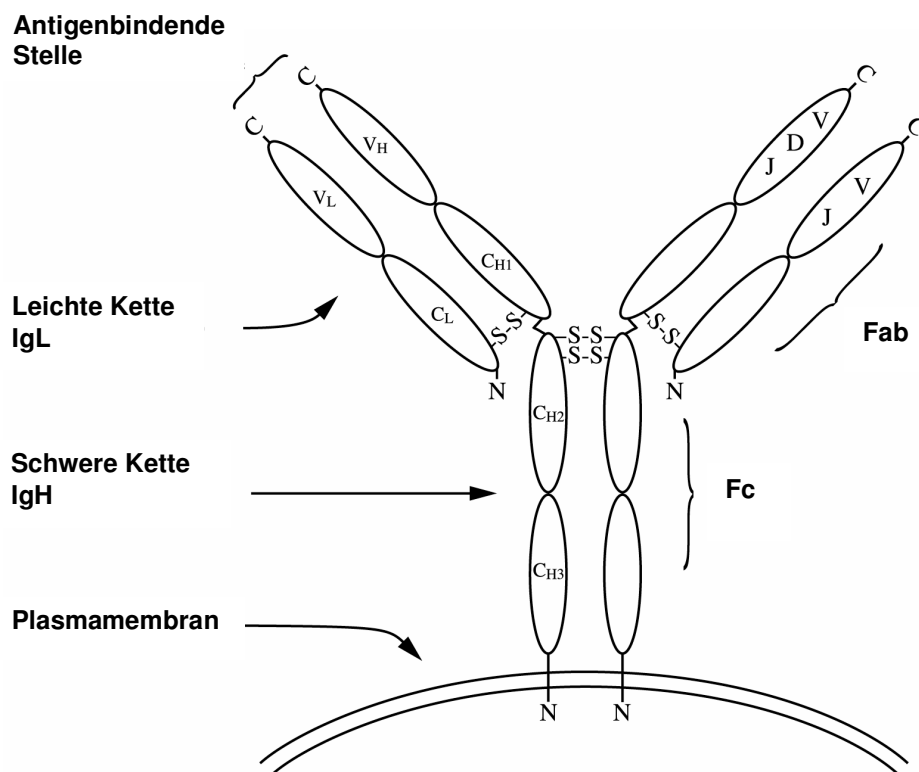


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur des B-Zellrezeptors (Quelle: Pleiman 1994, verändert).

Zur Aktivierung der B-Zelle ist zudem der Kontakt mit einer CD4-T-Zelle notwendig, die mittels einer Bindung über den CD40-Liganden und über Sekretion bestimmter Zytokine zur Aktivierung der B-Zelle und zum Klassenwechsel der sezernierten Immunglobuline beiträgt. Die Kombination aus Antigen-Bindung und Signal einer T-Helferzelle führt zum Transport des Antigens ins Innere der B-Zelle (McHeyzer-Williams et al. 2006 und 2000). Dort wird es abgebaut und prozessiert, um in Form eines MHC II-Peptid-Komplexes an die Zelloberfläche zurückzukehren. Dieser Komplex wiederum führt zur Sekretion von Effektormolekülen aus der T-Zelle.

Die aktivierte B-Zelle entwickelt sich entweder zur Plasmazelle, die sofort frühe Antikörper sezerniert, oder sie wandert in primäre Follikel im Lymphgewebe, um dort Keimzentren zu bilden. An der Bildung von Keimzentren sind auch follikuläre dendritische Zellen beteiligt, welche die B-Zell-Proliferation und Antikörpersekretion steuern. Die B-Zelle wird zur antikörpersezernierenden Plasmazelle oder differenziert zur B-Gedächtniszelle, die keine Antikörper produziert, sondern bei einem späteren Kontakt mit demselben Antigen schnell aktiviert wird. Die Antikörper bilden Antigen-Antikörper-Komplexe mit den Pathogenen, sie opsonieren, und können akzessorische Effektorzellen über Interaktion mit Fc-Rezeptoren aktivieren. Auf diesem Weg werden Makrophagen zur Phagozytose der Antigene stimuliert, Mastzellen werden zur Degranulation gereizt und Natürliche Killerzellen lösen eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität aus. Durch lokale inflammatorische Antworten, die durch spezielle Mediatoren verursacht werden, werden weitere Phagozyten und Antikörper in den Bereich der lokalen Immunantwort rekrutiert. Zudem wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe der klassische Weg der Komplementaktivierung in Gang gesetzt. Diese Kaskade des Komplementsystems führt zur Opsonierung und Zerstörung von Pathogenen durch Lyse und lockt mit Peptidmediatoren weitere inflammatorische Zellen an (Barrington et al. 2001).

Die Rolle von B-Zellen bei der peripheren Toleranzinduktion in T-Zellen wurde in der Vergangenheit mehrfach analysiert (Fuchs et al. 1992, Werner-Klein et al. 2007). Dieser Ansatz wurde diskutiert als therapeutische Option im Kontext der

Autoimmunerkrankungen, bei denen T-Zellen eine Rolle spielen (Liblau et al. 2002), so wie bei der Prävention von Transplantatabstoßungen (Wekerle et al. 2002).

2.2 Klinischer Bezug der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit zellspezifischer Transkriptionsverstärkung einer B-zellspezifischen Transgenexpression von B-zellspezifisch exprimierten Transgenen. Dieser Ansatz verfolgt neben der oben genannten peripheren T-Zell-Toleranzinduktion vor allem auch einen therapeutischen Ansatz bezüglich der Korrektur genetischer B-Zell-Defizienzen.

Ein internationales Komitee von Experten der WHO und später der International Union of Immunological Societies trifft sich seit den siebziger Jahren regelmäßig, um die Klassifikation der primären Immundefizienzen zu aktualisieren. Beim letzten Treffen in Budapest 2005 wurden 120 Immundefekte anerkannt und klassifiziert (Notarangelo et al. 2006). Diese treten sowohl beim angeborenen Immunsystem in Form von Defekten der Neutrophilen, der Phagozyten, Natürlichen Killerzellen oder des Komplementsystems auf, als auch im adaptiven Immunsystem durch Defekte in B- und T-Zellen. Das klinische Erscheinungsbild der Patienten mit primären Immundefekten unterscheidet sich von Defekt zu Defekt. Einige der Immundefekte zeigen in Form von Syndromen oder anderen, teilweise massiven, Begleiterscheinungen komplexe Krankheitsbilder. Ziel ist, diese Defekte mittels Gentherapie, also durch Korrektur der defekten Gene, behandeln zu können. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der B-zellspezifischen Transgenexpression und deren Transkriptionsverstärkung gentechnisch in HSPC eingebrachter Gene.

Aufgrund der Vielfalt der Funktionen und der komplexen Entwicklung sind B-Zellen besonders anfällig für genetische Defekte, deren Folgen die Funktionsfähigkeit der Immunantwort massiv beeinflussen und einschränken können. In den meisten bekannten Fällen leiden die betroffenen Patienten unter schweren und/oder rezidivierenden bakteriellen Infekten. Zu den bekanntesten

primären Immundefekten gehört der schwere, kombinierte Immundefekt (Severe combined immunodeficiency, SCID), welche durch Mutationen in mindestens zehn verschiedenen Genen verursacht werden kann (Buckley 2004). Bei der X-chromosomal gekoppelten Agammaglobulinämie wird die B-Zellentwicklung im Stadium der Pre-B-Zelle unterbrochen. Die Erkrankung wird durch eine Mutation im Gen des Signaltransduktionsmoleküls Btk (Bruton's tyrosine kinase) verursacht (Desiderio 1997).

Es gibt verschiedene Formen des Immundefektes, bei denen unter anderem auch B-Zellen betroffen sind. Therapeutisches Ziel ist es, die defekten Gene zellspezifisch zu korrigieren, womit sich auch diese Arbeit auseinandersetzt. Die Bedeutung B-zellspezifischer, regulierter Expression wurde in der Vergangenheit immer wieder deutlich, wenn ektopische Expression des Transgens in anderen als B-Zellen zu Abnormitäten im Zellwachstum oder der Funktion geführt haben (Khan et al. 2001). Die Entwicklung von viralen Vektoren mit größerer biologischer Sicherheit steht derzeit im Mittelpunkt der gentechnischen Forschung, nachdem gravierende unerwartete Nebenwirkungen wie Leukämien aufgetreten waren (Hacein-Bey-Abina 2003).

Der zweite therapeutische Ansatz der Transgenexpression in B-Zellen liegt in der peripheren T-Zell-Toleranzinduktion durch B-Zellen, was z.B. bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen mit T-Zell-Beteiligung genutzt werden könnte (Raimondi et al. 2006, Werner-Klein et al. 2007).

2.3 Gentherapie

Je genauer Gendefekte erkannt und spezifiziert werden können, desto näher liegt es, dieses Wissen auch therapeutisch zu nutzen. Unter Gentherapie versteht man den Transfer genetischen Materials in spezifische Zellen des Patienten (Mulligan 1993). Das Konzept der Gentherapie, nämlich ein genetisches Element zu nutzen, um einen Defekt in einem wichtigen zellulären Bestandteil zu korrigieren, kam in den frühen 60er Jahren auf (Nienhuis 2008). 1990 wurde der erste Patient mit SCID durch Adenosindeaminase-Mangel

gentherapeutisch mit Hilfe eines retroviralen Vektors behandelt (Blaese et al. 1995).

Mit den Möglichkeiten zur Gentherapie tauchen auch neue, nicht erwartete Probleme und Schwierigkeiten auf. Hierzu zählen nicht nur die bekannten Diskussionen auf ethischer Ebene, sondern insbesondere auch die technische Problematik, das therapeutische Gen effektiv in ein bestimmtes Zielgewebe oder bestimmte Zielzellen zu transferieren, ohne dabei in anderen Zellen unerwünschte Expressionen und Nebenwirkungen zu induzieren. Risikofaktoren stehen unter anderem in Beziehung zu zufälliger Transgeninsertion in das Genom oder unphysiologischer Transgenexpression (Li et al. 2004).

Eines der bekanntesten Beispiele hierzu ist SCID mit einem Gendefekt in der γ -Kette eines Rezeptors für Zytokine, die eine essentielle Rolle in der T-Zell-Entwicklung spielen. Die Transplantation von haploidentischen Stammzellen wurde bereits 1968 erstmals erfolgreich durchgeführt. Die Fünfjahres-Überlebensrate betrug 75% (Cavazzana-Calvo et al. 2005), während die Transplantation HLA-identischer Stammzellen eine Überlebensrate von über 90% erreichte (Hacein-Bey-Abina 2002). Hierzu wurden die Knochenmarkszellen betroffener Kinder *ex vivo* mit Hilfe retroviraler Vektoren transduziert, um das ursprünglich defekte Gen in die Zellen zu integrieren und diese Integration sowie die Expression im Therapieverlauf zu überwachen. Im Verlauf stellten sich, vermutlich durch die Integration des Provirus nahe eines Promoters für das Protoonkogen LMO2, leukämische Komplikationen heraus (Hacein-Bey-Abina 2003, Bonilla 2006). Eine vergleichbare Problematik wurde zuvor bereits im Mausmodell beobachtet (Li et al. 2002).

Die erfolgreiche Gentherapie muss zum einen den effizienten Transfer von Genen ausschließlich in die Zielzelle erreichen, zum anderen eine adäquate Expression des Transgens ausschließlich in der gewünschten Zellpopulation (Lutzko et al. 2003). Die Zukunft der Stammzelltherapie hängt unter anderem von der Entwicklung von sicheren und effizienten Technologien in der genetischen Manipulation ab, um schwerwiegende Nebenwirkungen vermeiden zu können (Li et al. 2004).

Retrovirale Vektoren können in verschiedenen therapeutischen und experimentellen Ansätzen einen effizienten Gentransfer vermitteln (Kay et al. 2001, Mulligan et al. 1993). In dieser Arbeit wurden retrovirale Vektoren basierend auf dem Maus-Leukämievirus (MLV) aus der Gruppe der Gammaretroviren verwendet.

2.4 Retroviren und retrovirale Vektoren

2.4.1 Das Retrovirus

Das Retrovirus wird typischer Weise von einer Hüllmembran, die vom Zytoplasma der Zelle abgeleitet ist, umgeben. Mit dieser Hüllmembran sind Glykoproteine assoziiert, die über transmembranäre Proteine verankert sind.

Diese externen Glykoproteine sind für die Adsorption der Viruspartikel an zelluläre Oberflächenkomponenten verantwortlich (Abbildung 3). Innerhalb der Hüllmembran liegt das Kapsid, welches aus Kapsidproteinen besteht und über Verbindungsproteine mit der Hüllmembran verbunden ist. Im Kapsid befinden sich die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Das retrovirale Genom besteht aus einzelsträngiger RNA. Sie codieren für Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Glykoproteine) (Buchschacher 2001). Eine Besonderheit der Retroviren ist die Umkehrung der normalen Abfolge von DNA über RNA zum Protein. Die RNA im Kapsid wird durch das Enzym Reverse Transkriptase revers zu DNA transkribiert (Abbildung 3). Die doppelsträngige DNA wird als Provirusgenom bezeichnet und in das Genom der Zielzelle integriert. Die virale Integrase ist für die Integration des Provirusgenoms in die Zielzelle verantwortlich und sie kann als Ligase wirken. Die Virusgene werden von langen, terminalen Wiederholungssequenzen (Long Terminal Repeats, LTR) flankiert. Dies sind identische Sequenzfolgen in einer Länge von 600-800 bp die im Verlauf der reversen Transkription entstehen. Sie enthalten die Promoter- und Enhancer-Elemente für die retrovirale Genexpression, die transkriptionalen Terminations- und Polyadenylierungs-

signale und die Sequenzen, die zur Integration in die zelluläre DNA notwendig sind (Buchschacher 2001).

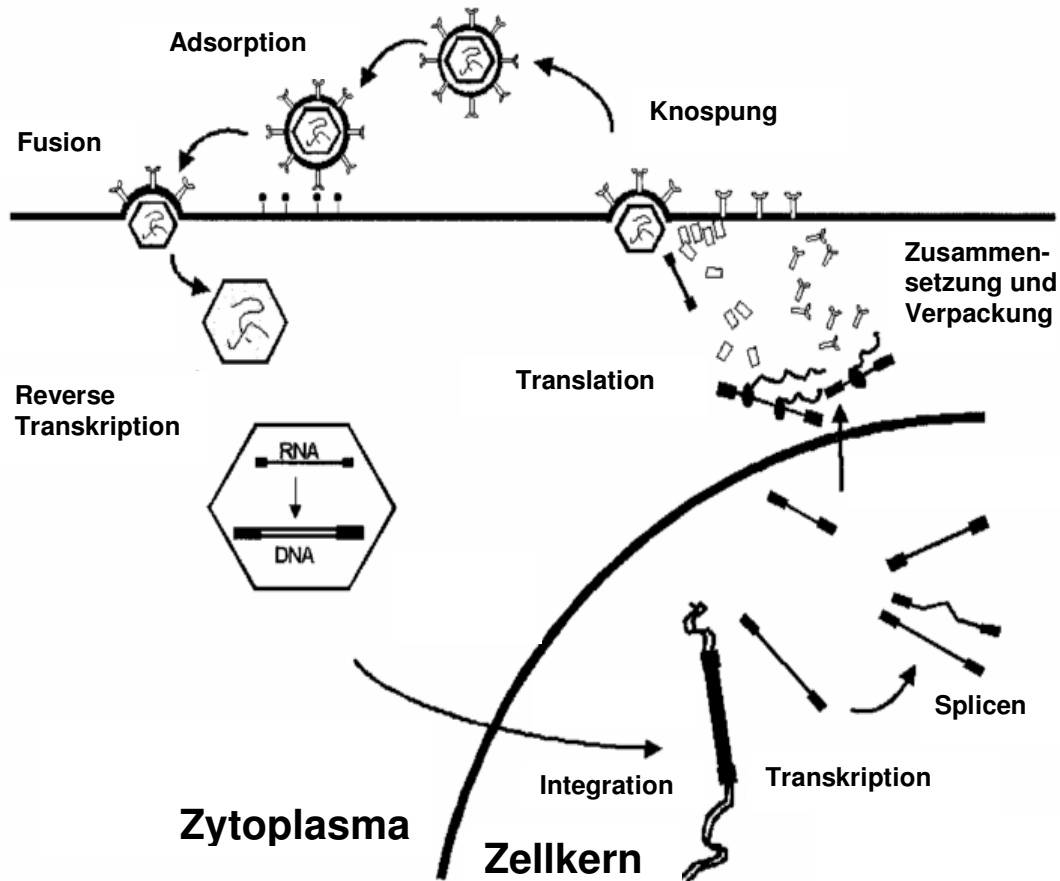


Abbildung 3: Retroviraler Replikationszyklus: Nach der Adsorption an die Zellwand verschmilzt die virale Membran mit der Zellmembran und entlässt das Kapsid ins Zytoplasma. Die virale RNA wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben, welche durch die Integrase in das Wirtsgenom integriert wird. Zusammen mit dem Wirtsgenom oder durch Retrotransposition finden Transkription und Translation des Provirus statt. Die viralen Proteine setzen sich mit der viralen RNA zu neuen Viruspartikeln zusammen und verlassen als solche die Wirtszelle. (Quelle: Palú et al. 2000, verändert).

2.4.2 Retrovirale Vektoren

Virale Vektoren stellten sich in therapeutischen und experimentellen Ansätzen als effiziente Transporter von Transgenen in Zellen bzw. in das Genom heraus, was sie zu attraktiven Vektoren für die Gentherapie macht (Kay et al. 2001, Mulligan et al. 1993). Die Vektoren basieren auf Retroviren. Die Einschränkung retroviraler Vektoren liegt darin, dass sie, abgesehen von den lentiviralen Vektoren, für die Transduktion auf die mitotische Zellteilung der Zielzelle angewiesen sind (Robbins, Ghivizzani 1998). Durch retrovirale Vektoren kann eine stabile Integration in das Genom erreicht werden (Kay et al. 2001, Mulligan et al. 1993), im Vergleich zu lentiviralen Vektoren ist die mögliche Größe des Plasmids und somit der Regulations- und Transgensequenzen bei gamma-retroviralen Vektoren jedoch sehr begrenzt. Die in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektoren basieren auf dem Maus-Leukämievirus (MLV) und gehören zum Genus der Gammaretroviren.

Der Replikationszyklus eines Retrovirus beinhaltet den obligatorischen Schritt der Integration des Virusgenoms in die chromosomale DNA der Zielzelle. Dadurch wird das Provirus gemeinsam mit den zellulären Genen vervielfältigt und erreicht eine permanente genetische Modifikation der Zielzelle. Durch die Entwicklung von Verpackungszelllinien (Abbildung 4) wurde es möglich, nur noch Gene, die von therapeutischem oder experimentellem Interesse sind, in den retroviralen Vektor zu klonieren. Die viralen Partikel umfassen bei den viralen Vektoren ein modifiziertes Genom mit therapeutischem Gen anstelle des viralen Genoms (Kay et al. 2001).

Zwischen LTRs am 3' und am 5' Ende und der Verpackungsdomäne Psi, welche das Signal für die Verpackung der RNA in Viruspartikel darstellt, können exogene Sequenzen platziert werden. Die Verpackungszelllinien beinhalten die genetische Information für die viralen Proteine der Matrix, des Kapsids (gag), die viralen Enzyme (pol) und die Virushülle (env) (Modrow et al. 1998). Sie können jedoch nur nach Transfektion mit dem retroviralen Vektor, der die Psi Region enthält, komplette Viruspartikel mit Genom synthetisieren. Da die viralen Strukturproteine

aufgrund der Verpackungsdomäne Psi nur den viralen Vektor, nicht aber die Helfer-DNA der Verpackungszelle erkennen, entstehen Partikel, die ausschließlich die DNA der viralen Vektoren enthalten (Kay et al. 2001). Auf diese Weise können die viralen Vektoren sich nur in den Verpackungszelllinien vermehren, d.h. sie sind replikationsdefizient, was die Sicherheit der Vektoren gewährleistet. In dieser Arbeit wurden als Verpackungszelllinien Phoenix-eco-Zellen, welche eine ecotrophe Virushülle produzieren, so dass nur Mauszellen infiziert werden können, und Phoenix-ampho-Zellen mit breiterem Wirtsspektrum verwendet. Es handelt sich bei Phoenixzellen um Zelllinien, die stabil mit zwei Plasmiden transfiziert sind, welche jeweils für einen Teil der Strukturproteine kodieren (Abbildung 4), was die Wahrscheinlichkeit eines Auftreten von replikationskompetenten Viren minimiert.

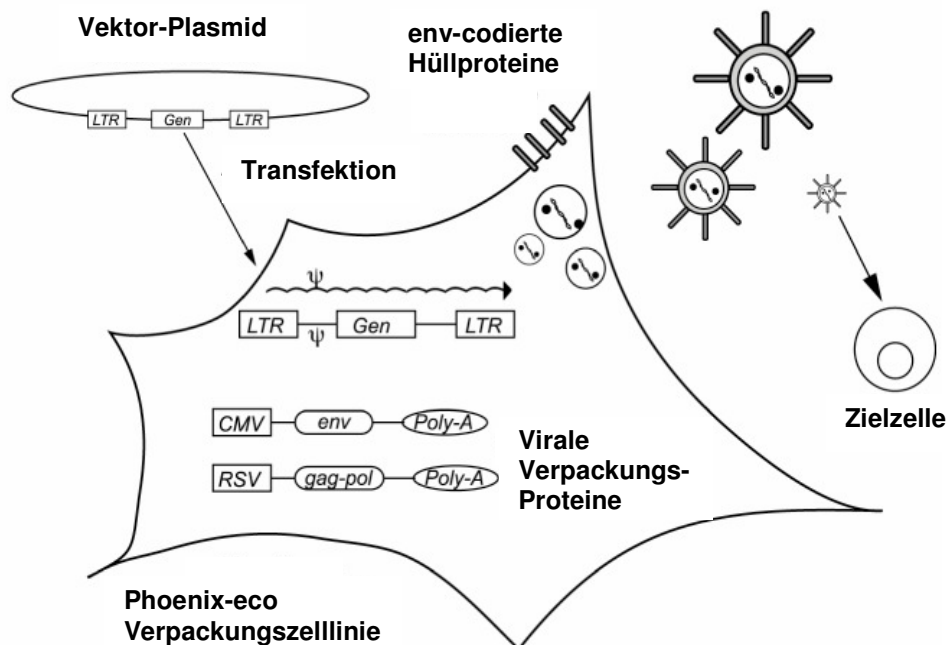


Abbildung 4 Schematischer Aufbau der Funktion einer Verpackungszelllinie. Zur Generierung von Vektorüberständen wird die Phoenix-eco-Zelle mit dem Plasmid transfiziert. Die viralen Proteine können sich ausschließlich in Zellen vermehren, welche die Gene gag, pol und env besitzen, welche für Hüllproteine, Reverse Transkriptase und Protease kodieren. (Quelle: „Retroviral Systems“, Stanford University, Nolan Lab Homepage, verändert).

2.5 Transkriptionsregulierende Elemente

Unter Transkription versteht man den Vorgang im Zellkern, bei dem aus der DNA einer Zelle eine mRNA-Kopie synthetisiert wird. Auf der DNA liegen unter anderem Sequenzen, die als Promoter bezeichnet werden und essentieller Bestandteil eines Gens sind. Diese Promotersequenzen ermöglichen z.B. die zellspezifische oder zeitlich begrenzte Expression eines Gens. Weitere regulatorische Sequenzen sind z.B. cis-Elemente wie Transkriptionsverstärker (Enhancer) und Transkriptionsunterdrücker (Silencer), an die trans-Elemente (Transkriptionsfaktoren) binden können und so die Transkription aktivieren oder unterdrücken.

Transkriptionsverstärker und -unterdrücker sind wichtige Elemente der Genregulation. Beide beeinflussen in gegensätzlicher Weise die Anlagerung des Transkriptionskomplexes an den Promoter. Der Transkriptionsverstärker verstärkt die Transkriptionsaktivität eines Gens, der Transkriptionsunterdrücker schwächt sie ab. Der Transkriptionsverstärker kann sowohl oberhalb als auch unterhalb des Promoters liegen, wichtig für die Wechselwirkung ist lediglich die räumliche Nähe zu diesem, die auch durch die dreidimensionalen Verdrillungen (Supercoils) der DNA erreicht werden kann. Mit dem Ziel der B-zellspezifischen Transkriptionsverstärkung wurde in dieser Arbeit ein B-zellspezifischer Transkriptionsverstärker (E_{μ}) verwendet, welcher die Transkription der schweren Ketten der Immunglobuline verstärkt (Forrester et al. 1994).

An die Matrix gebundene Regionen (Matrix attachment regions, MARs) sind DNA-Elemente, die spezifisch an die nukleäre Matrix binden und so insbesondere *in vitro* zu stärkerer und stabilerer Transgenexpression führen (Allen et al. 2000). MARs agieren sowohl als Verstärker der Genexpression in B-Zellen, z.B. bei der Expression des Genlocus der schweren Immunglobulinketten (Oancea et al. 1997), als auch als Repressoren in anderen hämatopoetischen Zelllinien und sind in der Lage, lokal Chromatinstrukturen zu remodellieren (Jenuwein et al. 1997). Um eine möglichst konstante, positionsunabhängige B-zellspezifische Transkriptionsverstärkung zu erreichen, werden in dieser Arbeit

MARs verwendet, welche den Transkriptionsverstärker $E\mu$ auf dem retroviralen Vektor flankieren (Lutzko et al. 2003).

2.6 Zielsetzung und Arbeitsprogramm

Ziel zukünftiger Gentherapie ist die kontinuierliche, zellspezifische Transgenexpression. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte ein B-zellspezifischer retroviraler Vektor zur Gentherapie entwickelt werden.

Ein Ansatz für gentherapeutische Anwendung ist die gentechnische Korrektur von genetischen B-Zell-Defizienzen bei immunologischen Erkrankungen. Für eine zukünftige gezielte Behandlung von Autoimmunerkrankungen könnte zudem die Ag-spezifische Toleranzinduktion von CD8-T-Zellen durch antigen-exprimierende B-Zellen genutzt werden. Zu den Autoimmunerkrankungen, zu deren Pathologie CD8-T-Zellen einen Beitrag leisten, gehören unter anderem Diabetes mellitus und Multiple Sklerose (Liblau et al. 2002; Goverman et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass neben Dendritischen Zellen auch B-Zellen in der Lage sind, in T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen Toleranz zu induzieren (Fuchs und Matzinger 1992, Werner-Klein et al. 2007). B-Zellen können zwar nicht in den zentralen lymphatischen Organen, aber peripher durch klonale Deletion und funktionelle Unterdrückung zur peripheren T-Zell-Toleranz gegenüber dem von der B-Zelle exprimierten Antigen führen.

Zahlreiche Studien belegen, dass der Erhalt der T-Zelltoleranz von der Persistenz des Antigens abhängt (Pape et al. 1998, Redmond et al. 2003). Daher sollte zum einen durch stabil in das Genom integrierende retrovirale Vektoren eine kontinuierliche Antigenexpression erreicht werden, zum anderen eine spezifische Transgenexpression in B-Zellen. Die Zellspezifität kann durch Verwendung des CD19-Promoters erreicht werden (Werner et al. 2004, Moreau 2004). Ziel dieser Arbeit ist, eine B-zellspezifische Transgenexpression durch verschiedene Fragmente des CD19-Promoters zu erreichen und diese mithilfe eines B-zellspezifischen Transkriptionsverstärkers $E\mu$ zu verstärken. Durch an die Matrix gebundene Regionen (Matrix attachment regions, MARs), welche den

B-zellspezifischen Transkriptionsverstärker E μ flankieren, soll eine konstante, positionsunabhängige Transkriptionsverstärkung *in vivo* erreicht werden (Lutzko et al. 2003).

Diese Transkriptionsverstärkung und deren Zellspezifität wird über die durchflusszytometrische Messung der quantitativen Expression von eGFP in Zelllinien und in naiven B-Zellen *in vitro* sowie in Immunzellen von Knochenmarkschimären *in vivo* analysiert. Die Verwendung transduzierter Stammzellen anstelle von transgenen Mausstämmen bietet die Möglichkeit einer Weiterentwicklung zur gentherapeutischen Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Ein zweiter Vorteil transduzierter Stammzellen ist die deutliche Zeitersparnis gegenüber der Generierung transgener Mausstämmen.

Die in dieser Arbeit generierten und detailliert analysierten retroviralen Vektoren sollen ein nützliches Werkzeug zur weiteren Analyse der B-Zell-Biologie, sowie zur Entwicklung von Gentherapien bei B-Zell-Defekten und zur Entwicklung von Therapiemöglichkeiten bei Autoimmunerkrankungen, z.B. über die Induktion peripherer T-Zell-Toleranz, darstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

| Spezifität (Anti-Maus) | Konjugat | Klon | Bezugsquelle |
|---------------------------|------------|------------|---|
| B220 | APC | RA2-6B2 | BD Pharmingen, San Diego (CA, USA) |
| CD3 | PE | 145-2C11 | BD Pharmingen |
| CD4 | PE, PerCp | H129.9 | BD Pharmingen |
| CD8 | PerCP, APC | 53.67 | BD Pharmingen Bioscience |
| CD11b | PE, PerCP | M1/70 | BD Pharmingen |
| CD11c | APC | HL3 | BD Pharmingen |
| CD19 | APC | 1D3 | BD Pharmingen |
| IgD | PE | M26 | Southern Biotechnical Associates, Birmingham, USA |
| IgM | PerCP | polyklonal | Serotec, Oxford, England |

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)

3.1.2 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.

3.1.3 Geräte

Brutschrank (Hera cell, von Heraeus), Beta-Counter (Wallac, Perkin Elmer, Turku, Finnland), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Durchflusszytometer (FACSCalibur von Becton Dickinson), Feinwaage (Adventurer, Orhaus Corp., Pine Brooks, NJ. USA), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Saufen), PCR-Maschine (Biometra), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Spannungsquelle (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Sterilbank (Heraeus), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington, Cambridge, England), Zellerntegerät (Scatron Instruments, Oslo, Norwegen), Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen). Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

3.1.4 Lösungen und Medien

| | |
|--------------------|--|
| ACK-Puffer | 8,02 g Ammoniumchlorid 1 g Kaliumhydrogencarbonat 37,2 mg EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat H ₂ O ad 1 l pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch 0,2 µm Filter steril filtrieren |
| Auftragspuffer BSU | 21 g Harnstoff 25 g Saccharose 0,1 M EDTA 1 Spatelspitze Bromphenolblau H ₂ O ad 50 ml |

Material und Methoden

| | |
|-----------------|---|
| CFSE-Puffer | Dulbecco's PBD (Gibco) ohne Ca/Mg 0,1% BSA |
| FACS-Puffer | 0,01% Natriumazid (v/v) 2% FBS (v/v) PBS |
| 5-Fluoro-Uracil | 20 mg/ml in Dulbecco's PBS (Gibco) pH mit NaOH auf 10 – 11 einstellen vortexen bis zur vollständigen Lösung pH mit HCl auf 7,5 einstellen sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern |
| MACS-Puffer | Dulbecco's PBS (Gibco) ohne Ca/Mg 0,5% BSA |
| PBS | 150 mM Natriumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4 mit 5N NaOH einstellen |
| PBSN | 0,05% Natriumazid (w/v) PBS |
| 50 x TAE-Puffer | 242 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure (Eisessig) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) |

Transfektionslösungen

| | |
|-------------------|---|
| 2 x HBS | <p>50 mM HEPES 280 mM Natriumchlorid 1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat mit NaOH auf pH 7,05 einstellen sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern (bis 6 Monate)</p> |
| CaCl ₂ | <p>2,5 M Calciumchlorid sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern</p> |

Zellkulturmedien (Firma Gibco über Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

| | |
|----------------|--|
| HSPC-Medium | <p>IMDM 20% FBS (inaktiviert, v/v) 500 mM Beta.Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 200 U/ml hIL-6 10 ng/ml mIL-3 50 ng/ml mSCF</p> |
| Phoenix-Medium | <p>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Mit Glutamax-I 10% FBS (inaktiviert, v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg /ml Streptomycin</p> |

| | |
|---------------------|--|
| Transfektionsmedium | DMEM Glutamax-I 10% FBS (inaktiviert, v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg /ml Streptomycin 1,5 mM Chloroquine (Sigma) |
| B-Zell-Medium | Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 10% FBS (inaktiviert, v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1% Beta-Mercaptoethanol |
| Zelllinien-Medium | RPMI-1640 10% FBS (inaktiviert, v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin |

Tabelle 2: Lösungen und Medien mit Zusammensetzung und Herkunft.

3.1.5 Mäusestamm

Die Mäuse wurden in den Tierställen des Instituts für Immunologie in München gehalten.

C57BL/6

Der MHC-Haplotyp dieser Mausstämmen ist H-2b; sie exprimieren das Ly5.2-Allel für CD45.

3.1.6 Retrovirale Vektoren

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten retroviralen Vektoren sind in Form von Plasmidkarten im Anhang zu finden. Sie basieren auf dem Maus-Leukämievirus (MLV) und gehören zum Genus der Gammaretroviren. Die hier verwendeten SIN-Vektoren basieren auf SIN-SF (Kraunus et al. 2004). In diesem Vektor ist die Promoter/ Enhancer-Region im 3'LTR deletiert, so dass nur die ersten 22 bp und die letzten 14 bp der U3-Region vorhanden sind.

Der gammaretrovirale Vektor CD19-1000 (Werner et al. 2004), auf dem die hier entwickelten Vektoren basieren, enthält anstelle des viralen Promoters ein 999 bp-Fragment des CD19-Promoters, als Transgen eGFP (enhanced green fluorescent protein) und als posttranskriptionell regulatorisches Element WPRE (woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element). In den Vektor CD19-1000 wurde vor den Promoter die transkriptionsverstärkende Sequenz E μ flankiert von an die Matrix gebundenen Regionen (MAR) eingefügt (MAR-E μ -MAR, freundlicher Weise bereitgestellt von DB Kohn, Childrens Hospital Los Angeles, USA). Um die Sequenz des Transkriptionsverstärkers E μ und der beiden flankierenden MARs in diesen Vektor zu klonieren, wurde der Vektor CD19-1000 mit dem Restriktionsenzym NotI vor der Promotersequenz eröffnet. Die transkriptionsverstärkende Sequenz MAR-E μ -MAR, welche 1075 bp umfasst, wurde vor dem Promoter eingefügt und das Plasmid ligiert. Der Vektor bestehend aus Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR, einem 999 bp-Fragment des CD19-Promoters, dem Transgen eGFP und dem posttranskriptionell regulatorischen Element WPRE wird in dieser Arbeit CD19-1000-E genannt. Mit den Restriktionsenzymen AgeI und NotI wurde der 999 bp lange CD19-Promoter herausgeschnitten und durch ein kürzeres CD19-Promoter-Fragment ersetzt, so dass der Vektor CD19-200 entstand. Auch in diesen Vektor wurde MAR-E μ -MAR vor den Promoter kloniert. Der Vektor bestehend aus dem Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR, einem 222 bp-Fragment des CD19-Promoters, dem Transgen eGFP und dem posttranskriptionell regulatorischen

Element WPRE wird in dieser Arbeit CD19-200-E genannt. Das Resultat der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung überprüft.

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------------------------|--|
| Einmal-Spritzenfilter (0,2 + 0,45 µm) | Nalgene Nunc. Int., Rochester, NJ, USA |
| Flaschenfilter | Nalgene Nunc. Int., Rochester, NJ, USA |
| Einmal- Injektionskannüle 26 G x 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 |

Tabelle 3: Herkunft von Verbrauchsmaterialien

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

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente aufgetrennt, isoliert und identifiziert. Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurden Horizontalgele verwendet, die 0,7% bis 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer enthielten. Der flüssigen Agaroselösung wurden zur späteren optischen Analyse der DNA-Banden im UV-Licht (312 nm, Intas, Göttingen) 4 µl pro 150 ml Gelvolumen einer 0,1%-igen (w/v) Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben zu 1/5 ihres Volumens mit Auftragspuffer vermischt. Als Längenstandard wurde eine 1000 bp DNA-Leiter (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V in einer Elektrophoresekammer (Werkstatt, Institut für Immunologie, München) mit 1 x TAE als Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Gel-Dokumentationssystem (Intas, Göttingen) fotografiert.

3.2.2 Bakterienkultur

Transformierte Bakterien wurden in LB-Medium (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) kultiviert. Zur Selektion wurden 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt, da alle hier verwendeten Plasmide und Vektoren das Ampicillin-Resistenzgen enthielten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einem Bakterieneschüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz). Zur Kultur auf festem Medium wurden LB-Agarplatten (7,5 g Agar/ 500 ml LB-Medium) mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die dauerhafte Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 1 ml Glycerin sorgfältig vermischt und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Durch Photometrie (UV-Spektrometer Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) wurde die DNA-Konzentration in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD₂₆₀-Einheit 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml.

3.2.4 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Eine Übernacht-Kultur einer Einzelkolonie von E.coli DH5Alpha wurde 1/100 in 100 ml LB-Medium mit 10 mM MgCl₂ verdünnt bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde bei 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 Mengen von je 100 µl aufgeteilt. Diese Aliquots wurden bei -80°C aufbewahrt.

Es wurde der Stamm Escherichia coli DH5Alpha_s (Genotyp supE44, _slacU169 (_s80d lacZ_sM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Hanahan1983)) verwendet.

3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden zunächst unter UV-Licht fotografiert, aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung des gewünschten Fragments aus dem Gel wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde mit 30-50 µl H₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung kleiner Mengen an DNA (bis 20 µg) aus Bakterien wurden QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit QIAGEN (Qiagen GmbH, Hilden) Plasmid Maxi Kits gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte DNA wurde in H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch so gespalten, dass sie überhängende (sticky) oder stumpfe (blunt), zueinander komplementäre Enden besaßen. Die Reaktion wurde in Ligasepuffer mit 400 U T4-Ligase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), 100 ng gespaltenem Vektor und der zwei- bis dreifachen Menge des zu inserierenden DNA-Fragments in einem Endvolumen von 15 µl durchgeführt. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zur Transformation kompetenter E. coli Bakterien verwendet.

3.2.8 Transformation chemokompetenter Bakterien

Für jede Transformation wurde ein Aliquot (100 µl) chemokompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes und 0,5 - 1 µg Plasmid-DNA wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend für 90 sec in einem Wasserbad einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und dann wieder für 2 min auf Eis gestellt. Um die Expression des Resistenzgens zu erlauben, wurde 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin zugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit Ampicillin plattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit einem FACS Gerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) kann die relative Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim Passieren einer einzelnen Zelle Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward angle light scatter*, FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle. Granulozyten und Makrophagen enthalten mehr Granula als Lymphozyten und weisen daher ein höheres SSC-Signal auf. Tote Zellen sind granulärer als Lymphozyten, dabei aber deutlich kleiner als Granulozyten. Die an der Zelloberfläche gebundenen und fluorochrommarkierten Antikörper absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektronische Signale konvertiert und gibt somit Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen können bestimmte Zellpopulationen durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Streugröße oder Fluoreszenz dargestellt wird, oder das Punktwolkendiagramm (*Dot plot*), bei dem zwei Streugrößen bzw. Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCaliburTM-Durchflusszytometer (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) mit zwei Lasern, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (488 und 633 nm) und einem BD FACSAria- Durchflusszytometer. Die Datenaufnahme erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) und die Datenanalyse mit CellQuest- oder FlowJo -Software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

3.3.2 Färbung von Lymphozyten mit fluorchrommarkierten Antikörpern

Zu 50-100 µl Zellsuspension in einem 5 ml Reaktionsröhrchen wurde das gleiche Volumen an doppelt konzentrierter, in kaltem FACS-Puffer angesetzten Antikörperlösung gegeben, gemischt und für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die unterschiedlichen Antikörper waren zuvor titriert worden und wurden in einer entsprechenden Verdünnung eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. War der primäre Antikörper biotinyliert, so wurde noch mit Fluorchrom konjugiertem Streptavidin gefärbt.

3.3.3 Entnahme von lymphatischen Organen bei der Maus

Zur Organentnahme wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet, äußerlich mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert. Die Lymphknoten wurden mit feinen Pinzetten entnommen und in FACS-Puffer auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Milz, der Thymus und die inguinalen Lymphknoten wurden mit einer Pinzette und einer feinen Schere herausgelöst und in FACS-Puffer auf Eis gelagert. Knochenmark wurde aus den Ober- und Unterschenkeln gewonnen. Mit einer Schere wurde an jeder Seite der Knochen geöffnet und das rote Knochenmark mit einer Spritze (20 ml, Braun) und Dulbecco's PBS in ein 50 ml Röhrchen gespült. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milz, Thymus und Lymphknoten wurden die Organe in einer Petrischale (Ø 5 cm) mit etwas FACS-Puffer zwischen zwei Gazestückchen (Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Porengröße 100 µm) und mit dem Stempel einer 1 ml Injektionsspritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g ($1 \text{ g} = 9,81 \text{ m/s}^2$) und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung im gewünschten Puffer oder Medium suspendiert. Die aus

der Milz gewonnene Zellsuspension wurde anschließend einer Erythrozytolyse unterzogen.

3.3.4 Erythrozytolyse

Zur Entfernung der Erythrozyten aus einer Milzzellsuspension wurde das Milzzell-Pellet nach Zentrifugation in 4 ml ACK Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension mit 10 ml FACS Puffer verdünnt und bei 300 g ($1\text{ g} = 9,81\text{ m/s}^2$) und 4°C für 5 min erneut zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

3.3.5 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 ist 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 auch lebende von toten Zellen und Erythrozyten unterschieden werden.

3.3.6 Generierung von Knochenmarkschimären

Die zukünftigen Rezeptormäuse wurden an Tag -2 und 0 mit 5,5 Gy 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 pro Maus 1 bis 3×10^6 transduzierte HSPC i.v. injiziert. Um eine mögliche bakterielle Infektion während der ersten drei Wochen der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zu vermeiden, wurde dem Trinkwasser Neomycin zugegeben (1,17 g/l Trinkwasser).

3.3.7 Generierung von retroviralen Vektorüberständen

Phoenix-eco und -ampho Zellen wurden durch Calcium-Phosphat transfiziert. Dazu wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen am Vorabend auf einer 100 mm Zellkulturplatte ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch 8 ml warmes (RT) Transfektionsmedium ersetzt. 60 μ l (1 μ g/ μ l) Vektor-Plasmid wurden mit 615 μ l sterilem Millipore-Wasser und 75 μ l CaCl_2 in einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß gemischt. Zuletzt wurden 750 μ l 2xHBS zugegeben und sofort für 8 Sekunden gevortext. Anschließend wurde die Transfektionslösung vorsichtig auf die zu transfizierenden Zellen gegeben und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen einmal mit 5 ml warmen (RT) Dulbecco's PBS (kein Ca^{2+} , kein Mg^{2+}) 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. Nach 12 bis 16 Stunden wurde der Überstand mit einer 20 ml Einmalspritze vorsichtig abgenommen und eventuell abgelöste Phoenix-eco Zellen durch Filtration mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,45 μ m) entfernt. Die Vektorüberstände wurden entweder sofort zur Transduktion eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.8 Kultur von Phoenix-eco und -ampho-Zellen

Phoenix ist eine Verpackungszelllinie zur Produktion von Retroviren, die auf der 293T-Zelllinie basiert (Nolan Lab Homepage). Phoenix wurden in Phoenix-Medium auf 100 mm Zellkulturplatten bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, so dass sie nie mehr als 75%-ige Konfluenz erreichten. Jeden zweiten Tag wurden sie im Verhältnis eins zu fünf auf neue Zellkulturplatten verteilt. Die Zellen wurden in 1 ml FBS mit 10% DMSO eingefroren und bei -180°C gelagert. Phoenix-eco Zellen aus dem -180°C Lager wurden für längstens sechs Monate verwendet. Danach wurden sie für zwei Wochen mit 1 µg/ml Diphtheria-Toxin (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA) und 500 µg/ml Hygromycin B (CNbiosciences LTD., Beeston, UK) reselektioniert und anschließend wieder eingefroren. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von Phoenix-eco wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Eine Probe der Zellsuspension wurde mit Trypanblau (Gibco, 1:10 verdünnt in PBS) gemischt. Die Lebendzellzahl wurde durch Auszählen einer geeigneten Zellverdünnung in Trypanblaulösung in der Neubauerzählkammer bestimmt.

3.3.9 Kultur von HSPC

Zur Gewinnung von HSPC wurden 150 mg/kg Körpergewicht 5-Fluoro-Uracil (5-FU, Amersham, Little Chalfont, UK) i.v. gegeben. 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 der Ober- und Unterschenkel präparierten Zellen wurden in HSPC-Medium (10x10⁶ Zellen/ 10 ml) resuspendiert und in einer 100 mm Zellkulturschale bei 37°C und 5% CO₂ für drei Tage inkubiert. Das HSPC-Medium enthielt rekombinantes Interleukin-6 (hIL-6, 200 U/ml), murines Interleukin-3 (mIL-3, 10 ng/ml) und murinen Stammzellfaktor (mSCF, 50 ng/ml); ein Wachstumsfaktorcocktail, der die weitere Differenzierung der Stamm- und Vorläuferzellen verhindert und diese Zellen zur Proliferation

anregt. Die rekombinanten Wachstumsfaktoren stammten von Strathmann Biotech, Hannover.

3.3.10 Kultur von primären murinen B-Zellen

Die primären B-Zellen wurden nach der Erythrozytolyse (s.o.) mittels MACS (s.u.) aus murinen Milzen separiert und in PBS-Puffer gelöst. Die isolierten B-Zellen wurden gezählt und in B-Zellmedium zu je 2×10^5 Zellen pro Well in 200 μ l Medium mit Zugabe von FGK (Anti-CD40) und IL-4 in Kultur genommen. Die Zellen wurden am Folgetag mit Virusüberstand transduziert (s.u.) und in Folge mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.3.11 Kultur von HELA- und JY-Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in Zelllinien-Medium bei 37°C kultiviert und nach lichtmikroskopischer Beurteilung regelmäßig gesplittet und mit neuem Nährmedium versorgt.

3.3.12 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die magnetische Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) beruht auf der Separation von Zellen mit Antikörpern, welche an paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind. Die Separation erfolgt mit Hilfe einer Säule, die in ein starkes Magnetfeld platziert wird. Die magnetisch markierten Zellen werden dadurch in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen passieren. Sobald die Säule aus dem Magnetfeld herausgenommen wird, können die magnetisch zurückgehaltenen Zellen eluiert werden. Es können prinzipiell zwei Isolationsstrategien verfolgt werden: direkte Isolierung, d.h. die gewünschte Zell-population wird mit Antikörpern markiert und auf der Säule zurückgehalten oder negative Isolierung, d.h. alle unerwünschten Zellen werden markiert und zurückgehalten.

In dieser Arbeit wurden beide Strategien angewendet. Aus der Milz gewonnene Einzelzellsuspensionen wurden mit den vom Hersteller angegebenen Mengen an 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 durch ein Nylonnetz (Reichert Chemie Technik, Porengröße 51 µm) filtriert, bevor sie auf die gemäß den Angaben des Herstellers equilibrierte Säule gegeben wurden. Für die positive Selektion von bis zu 10×10^6 bzw. 100×10^6 Zellen wurde eine MS⁺- bzw. LS⁺-Säule verwendet. Die Zellen wurden mit 3x500 µl bzw. 3x3 ml MACS-Puffer für MS⁺- bzw. LS⁺-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 2x500 µl bzw. 2x3 ml MACS-Puffer eluiert.

3.3.13 Transduktion von HSPC, primären B-Zellen, HELA- und JY-Zellen

Vier Tage nach Injektion von 5-FU wurde das Knochenmark aus beiden Ober- und Unterschenkeln isoliert und in HSPC-Medium vorstimuliert. Nach drei Tagen wurden die HSPC mit einem Zellschaber geerntet, gezählt und mit zellfreien Vektorüberständen und 4 µg/ml Polybrene gemischt. Es wurden $3-5 \times 10^5$ Zellen pro ml Vektorüberstand eingesetzt und durch Spin-Infektion in Sechsllochplatten transduziert. Dazu wurden die Sechsllochplatten mit Parafilm umwickelt und für 2 Stunden bei 32°C mit 300 g ($1 \text{ g} = 9,81 \text{ m/s}^2$) zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten für weitere vier Stunden bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Vektorüberstände mit dem darin enthaltenen Polybrene durch HSPC-Medium ersetzt und die Zellen bei 37°C im Brutschrank weiterkultiviert. Alternativ wurde die Transduktion noch zwei Mal wiederholt, wobei zwischen den einzelnen Transduktionen mindestens 14 Stunden lagen. Am Tag nach der letzten Transduktion wurden die Zellen durch kräftiges Abspülen mit Dulbecco's PBS (kein Ca²⁺, kein Mg²⁺) geerntet.

3.4 Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler und p-Werte (Student's *t*-Test oder ANOVA- und Tukey-Test) wurden mit den Programmen Microsoft Excel 2001, Prism oder SPSS berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines B-zellspezifischen retroviralen Vektors

Die zellspezifische Transgenexpression und deren Transkriptionsregulation sind wichtige Ziele der Gentherapie. Diese Arbeit beschäftigt sich mit B-zellspezifischer Transkriptionsverstärkung. Um B-zellspezifische Genexpression zu erreichen wurde ein B-zellspezifischer retroviraler Vektor mit einem Promoter bestehend aus einem Fragment aus der Promoter-Region des humanen CD19-Gens verwendet (Kleindienst et al. 2000). Da in retroviralen Vektoren nur etwa 5000 bp für das Transgen und regulatorische Sequenzen zur Verfügung stehen, wurde eine Sequenz von 999 bp aus der Promoter-Region des humanen CD19-Gens ausgewählt. Dieses Promoter-Fragment enthält Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie das B-zellspezifische Aktivatorprotein (BSAP) und den frühen B-Zellfaktor (EBF), von denen angenommen wird, dass sie die B-zellspezifische Expression von CD19 regulieren (Gisler et al. 1999, Kozmik et al. 1992). In Studien mit transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass der humane CD19-Promoter die Expression analog zum murinen CD19-Promoter kontrolliert (Tedder et al. 1997, Fujimoto et al. 1998). Das transmembranäre Glykoprotein CD19 wird ab der pro-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle von allen Entwicklungsstufen der B-Zellen außer der Plasmazelle exprimiert. Es hat Einfluss auf die Entwicklung, die Aktivierung, die Reifung von Gedächtnis-B-Zellen und die Regulierung der Toleranz (Sato et al. 1997, Inaoki et al. 1997). In den SIN-Vektor mit dem 999 bp-Fragment des CD19-Promoters wurde ein posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers (WPRE) kloniert, um die Expression des Transgens zu erhöhen (Werner et al. 2004).

Um die Expression *in vitro* und *in vivo* messen zu können, diente verstärktes grün fluoreszierendes Protein (enhanced green Fluorescent Protein, eGFP) als Transgen. Dieses ermöglicht die Detektion einzelner transgenexprimierender Zellen *in vitro* und *in vivo*. Mit dem Ziel der zellspezifischen Transkriptions-

verstärkung wurde in diesen Vektor (CD19-1000) ein B-zellspezifischer Transkriptionsverstärker ($E\mu$) kloniert, welcher die Transkription der schweren Ketten der Immunglobuline verstärkt (Forrester et al. 1994). Um eine möglichst konstante, positionsunabhängige B-zellspezifische Transkriptionsverstärkung zu erreichen, flankieren so genannte an die Matrix gebundene Regionen (Matrix attachment regions, MARs) die Sequenz $E\mu$ (Lutzko et al. 2003). Dies sind DNA-Elemente, die spezifisch an die nukleäre Matrix binden und so insbesondere *in vitro* zu stärkerer und stabilerer Transgenexpression führen (Allen et al. 2000). MARs agieren sowohl als Verstärker der Genexpression in B-Zellen als auch wie Repressoren in anderen hämatopoetischen Zelllinien und sind in der Lage, lokal Chromatinstrukturen zu remodellieren (Jenuwein et al. 1997).

Der Vektor CD19-1000 (Abbildung 5a, Anhang S. 104) besteht aus einem 999 bp-Fragment des CD19-Promoters, dem Transgen eGFP und WPRE. Um die Sequenzen des Transkriptionsverstärkers $E\mu$ und der beiden flankierenden MARs in diesen Vektor zu klonieren, wurde der Vektor CD19-1000 mit dem Restriktionsenzym NotI vor der Promotersequenz eröffnet. Die transkriptionsverstärkende Sequenz MAR- $E\mu$ -MAR, welche 1075 bp umfasst, wurde vor dem Promoter eingefügt und das Plasmid ligiert. Der Vektor CD19-1000 beinhaltet den Transkriptionsverstärker MAR- $E\mu$ -MAR, ein 999 bp-Fragment des CD19-Promoters, das Transgen eGFP und das posttranskriptionell regulatorischen Element WPRE (Abbildung 5b, Anhang S. 105). Es ist vorteilhaft, mit möglichst kurzen regulatorischen Sequenzen eine maximal zellspezifische Expression des Transgens zu erreichen. So bleibt ein größerer Raum für die Transgensequenz. Zum Vergleich mit dem 999 bp-Fragment des CD19-Promoters soll ein 222 bp-Fragment desselben Promoters anstelle des 999 bp-Fragmentes kloniert werden (Moreau et al. 2004). Die Transkriptionsverstärkung durch den Transkriptionsverstärker MAR- $E\mu$ -MAR soll auch im Zusammenhang mit dem 222 bp-Fragment des CD19-Promoters auf Expressionssteigerung und Zellspezifität hin getestet werden.

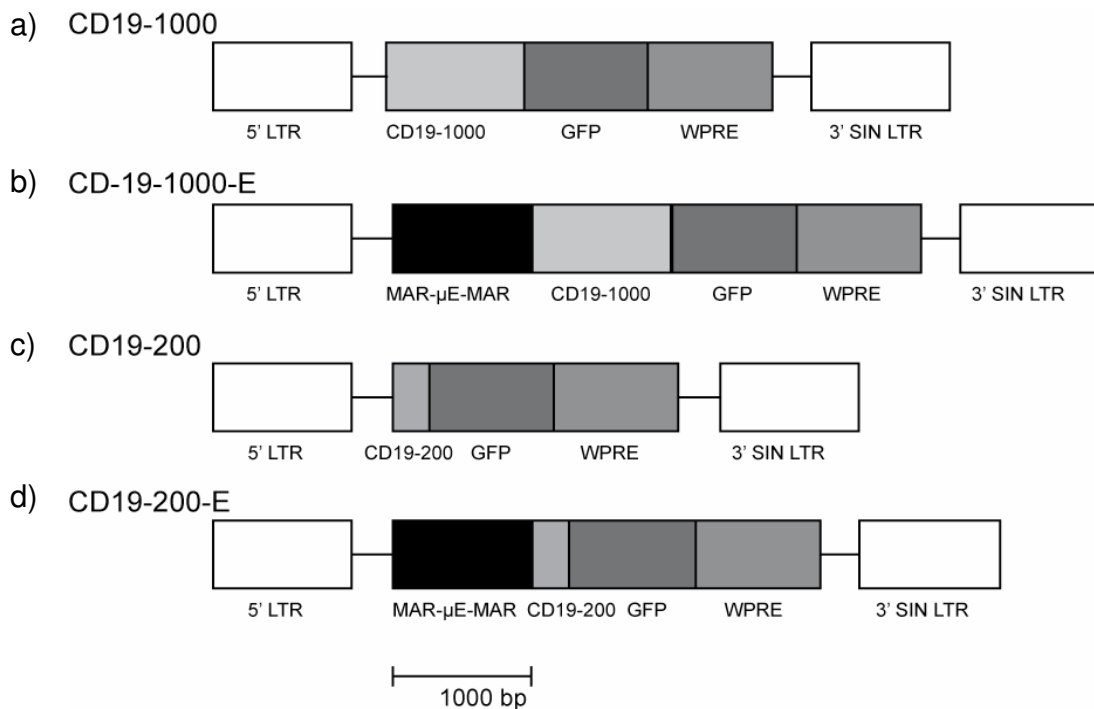


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Vektoren mit 999 bp- und 222 bp-Fragmenten des humanen CD19-Promoters, welche den viralen Promoter ersetzen z.T. in Verbindung mit dem Transkriptionsverstärker E_{μ} flankiert von MARs.

- a)** 999 bp-Fragment des CD19-Promoters ohne Transkriptionsverstärker (CD19-1000);
- b)** CD19-1000 mit Transkriptionsverstärker E_{μ} , flankiert von MARs (CD19-1000-E)
- c)** 222 bp-Fragment des CD19-Promoters ohne Transkriptionsverstärker (CD19-200);
- d)** CD19-200 mit Transkriptionsverstärker E_{μ} , flankiert von MARs (CD19-200-E).

Um den verkürzten Promoter anstelle des 999 bp-Fragments in den Vektoren testen zu können, wurden zusätzliche Vektorkonstrukte kloniert. Das 999 bp-Promoterfragment wurde im bekannten Vektor CD19-1000 durch ein 222 bp-Promoterfragment ersetzt. Dazu wurde das Plasmid CD19-1000 durch die Restriktionsenzyme *AgeI* und *NotI* geschnitten, wodurch das 999 bp-Fragment des CD19-Promoters entfernt wurde. An dessen Stelle wurde durch Ligation ein 222 bp-Fragment des CD19-Promoters integriert. Das Konstrukt enthält neben dem 222 bp-Promoterfragment das Transgen für die Expression von eGFP und das posttranskriptionell regulatorische Element WPRE (Abbildung 5c, Anhang S. 106), der Vektor wird im Folgenden CD19-200 genannt. In einem zweiten

Ansatz wurde in Vektor CD19-200 vor das 222 bp-Fragment des CD19-Promoters über eine NotI-Schnittstelle der Transkriptionsverstärker E μ flankiert von MARs, bestehend aus 1075 bp, kloniert. Es entstand das Konstrukt CD19-200-E (Abbildung 5d, Anhang S. 107).

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung des Transkriptionsverstärkers MAR-E μ -MAR auf die Expression von eGFP in qualitativer Hinsicht, d.h. bezüglich der Expressionsstärke, zu analysieren. Die Vektoren mit und ohne Transkriptionsverstärker (CD19-1000 und CD19-1000-E bzw. CD19-200 und CD19-200-E) werden im Folgenden bezüglich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), welche die Expressionsstärke des Transgens eGFP quantifiziert, verglichen. Zu erwarten ist eine Steigerung der Expressionsstärke des Transgens durch den Transkriptionsverstärker E μ , eine Auswirkung auf die Häufigkeit der Transgenexpression ist nicht zu erwarten (Lutzko et al. 2003).

4.2 *In vitro*-Analyse

4.2.1 Zelllinien

Um die Auswirkungen des Transkriptionsverstärkers *in vitro* zu testen, wurden die humane B-Zelllinie JY und als Kontrolle die humane Epithelzelllinie HeLa mit den Viruspartikeln CD19-1000 und CD19-1000-E sowie CD19-200 und CD19-200-E transduziert.

Am ersten Tag nach der Transduktion konnte mittels FACS noch keine wesentliche Expression von eGFP nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke an den Tagen zwei und drei nach der Transduktion unterschieden sich nicht wesentlich. Um abgestorbene Zellen auszuschließen, wurden die Zellen mit Propidium Iodid (PI) gefärbt und die PI⁺ Zellen nicht in die Auswertung mit einbezogen.

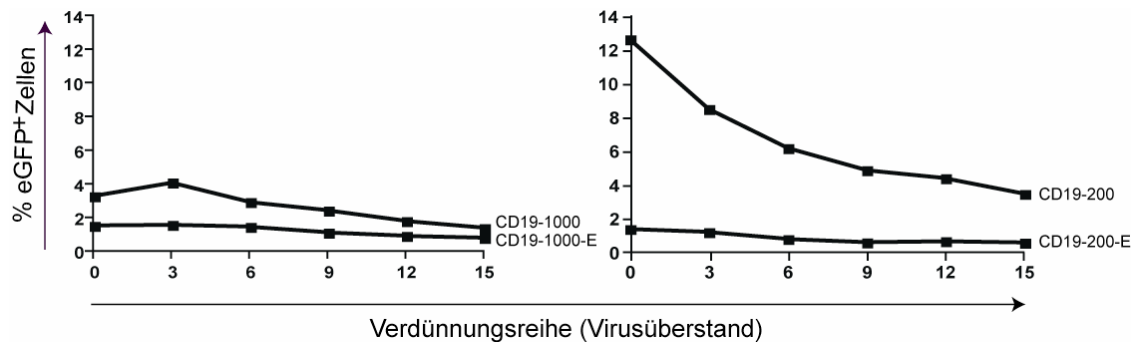


Abbildung 6 Virustitration mittels Durchflusszytometrie der Konstrukte CD19-1000 und CD19-200 jeweils mit und ohne Transkriptionsverstärker (MARs-E μ -MARs) anhand der Expression des Transgens eGFP. (Jeweils n = 6). JY-Zellen wurden mit unverdünntem Virusüberstand und mit seriellen Verdünnungen der respektiven Vektorüberstände zu 1:3, 1:6, 1:9 und 1:12 transduziert und zwei Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch auf die prozentuale Häufigkeit der eGFP-Expression analysiert. **Links:** CD19-1000 führte zu häufigerer Expression von eGFP im Vergleich zu CD19-1000-E. Mit absteigender Viruskonzentration bei zunehmender Verdünnungsreihe fällt die Anzahl eGFP⁺ JY-Zellen bei beiden Konstrukten ab. **Rechts:** CD19-200 führte zu häufigerer Expression von eGFP im Vergleich zu CD19-200-E. Mit absteigender Viruskonzentration bei zunehmender Verdünnungsreihe fällt die Anzahl eGFP⁺ JY-Zellen bei beiden Konstrukten ab. Das kürzeste Konstrukt, welches die wenigsten Basenpaare umfasst, CD19-200 ohne Transkriptionsverstärker, erreicht die höchste Frequenz eGFP exprimierender Zellen.

Im Diagramm (Abbildung 6) ist zu sehen, dass CD19-1000 einen deutlich höheren Prozentsatz eGFP⁺ Zellen erreicht als CD19-1000-E (3,3% bei CD19-1000 vs. 1,5% bei CD19-1000-E) und dass CD19-200 einen deutlich höheren Prozentsatz eGFP⁺ Zellen erreicht als CD19-200-E (12,6% bei CD19-200 vs. 1,4% bei CD19-200-E), aber auch als beide Konstrukte mit dem CD19-1000-Promoter. Der Unterschied bezüglich der Prozentsätze eGFP⁺ Zellen könnte in unterschiedlichen Virustitern begründet sein. Der Unterschied in der quantitativen eGFP-Expression könnte an einer geringeren Kopienzahl des viralen Genoms im Transduktionüberstand liegen oder an einer verminderten Integration des Vektors in das Genom der JY-Zellen, bzw. an einer schlechteren Transgenexpression. Beide Ursachen könnten darin begründet sein, dass CD19-1000-E und CD19-200-E durch den Transkriptionsverstärker

MAR-E μ -MAR jeweils um 1075 bp länger sind als CD19-1000 bzw. CD19-200 ohne Transkriptionsverstärker. Somit könnte der Unterschied in der quantitativen eGFP-Expression der Vektoren mit Transkriptionsverstärker (CD19-1000-E und CD19-200-E) im Vergleich zu den kürzeren Konstrukten CD19-1000 und CD19-200 in einer weniger effektiven Virusproduktion in Verpackungszellen liegen. Auch die Integration in das Genom der transduzierten JY-Zelle kann aufgrund der Größe erschwert sein. Das kürzeste der vier Konstrukte, CD19-200 mit dem auf 222 bp verkürzten Promoterfragment und ohne Transkriptionsverstärker, erreicht den höchsten Prozentsatz eGFP⁺ Zellen.

Der Fokus dieser Arbeit ist die Analyse des Transkriptionsverstärkers MAR-E μ -MAR bezüglich der Transkriptionsverstärkung des Transgens eGFP. Die Titerbestimmung bei retroviralen Vektoren ist unzuverlässig und gelingt schlecht. Diese Arbeit befasst sich im Folgenden insbesondere mit der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) als Ausdruck der Expressionsstärke des Transgens eGFP. Aufgrund der voneinander abweichenden quantitativen eGFP-Expression der vier Vektoren kann diese nicht objektiv verglichen werden. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* findet sich im Folgenden eine durchweg höhere Anzahl eGFP exprimierender Zellen nach Transduktion mit CD19-1000 bzw. CD19-200 im Vergleich zu CD19-1000-E bzw. CD19-200-E, sowie nach Transduktion mit CD19-200 im Vergleich zu CD19-1000.

Die Erwartung an den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR ist nicht die quantitative Steigerung der eGFP Expression, also die Steigerung der Anzahl eGFP exprimierender Zellen, sondern die qualitative Steigerung der eGFP-Expression. Darunter versteht man eine gesteigerte Leuchtintensität, also eine höhere MFI des eGFP in der eGFP⁺ Zelle. Diese kann bei CD19-1000 mit CD19-1000-E und CD19-200 mit CD19-200-E objektiv verglichen werden, auch wenn die absolute Anzahl der eGFP⁺ Zellen sich unterscheidet.

Das Konturendiagramm der durchflusszytometrischen Analyse (Abbildung 7a) zeigt repräsentative JY-Zellen am zweiten Tag nach Transduktion, eGFP⁺ Zellpopulationen sind jeweils durch ein Rechteck eingegrenzt.

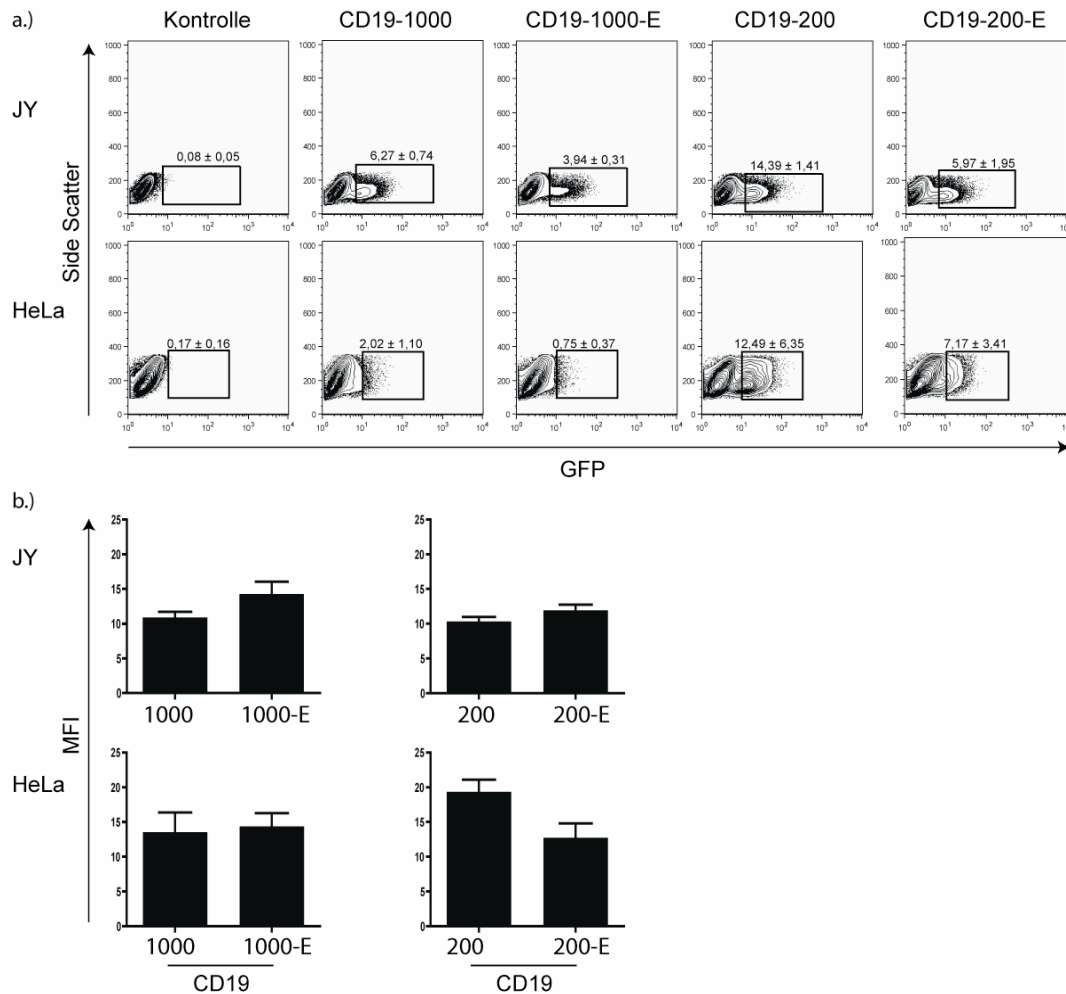


Abbildung 7 a.) Konturendiagramm der JY-Zellen (oben) und der HeLa-Zellen (unten) nach Transduktion mit CD19-1000 und CD19-1000-E sowie mit CD19-200 und CD19-200-E. Die eGFP⁺ Zellpopulation wird jeweils durch ein Rechteck markiert. Diese Zellen wurden auf die Stärke der eGFP-Expression, quantifiziert als MFI, analysiert. (JY: Kontrolle: n = 6, CD19-1000: n = 10; CD19-1000-E: n = 8, CD19-200: n = 10, und CD19-200-E n = 7, HeLa: Kontrolle: n = 4, CD19-1000: n = 6; CD19-1000-E: n = 7, CD19-200: n = 6, und CD19-200-E n = 5, drei unabhängige Experimente). **b.) Balkendiagramm** der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der eGFP⁺ JY- und HeLa-Zellen im Vergleich zur MFI der eGFP⁺ HeLa-Zellen mit und ohne Transkriptionsverstärker. Keine statistisch signifikante Steigerung der MFI (student's t-test).

Bei den Kontrollzellen, die ohne Virusüberstand zum Schein transduziert wurden, sind weder bei JY- noch bei HeLa Zellen in diesem Fluoreszenzbereich zu sehen ($< 0,2\%$). Die Verteilung der Häufigkeit von eGFP-Expression nach Transduktion mit den vier verschiedenen Vektoren entspricht den Erwartungen nach der durchflusszytometrischen Virustitration (Abbildung 5). Während nach Transduktion mit den Vektoren CD19-1000 und CD19-1000-E deutlich mehr JY- als HeLa-Zellen eGFP exprimieren, trifft diese Aussage für die beiden Konstrukte mit kurzem Promoterfragment (CD19-200 und CD19-200-E) nicht zu (Abbildung 7a). Die langen Promoterfragmente (CD19-1000 und CD19-1000-E) führen zu einer nahezu spezifischen Expression in der B-Zelllinie JY, während die kurzen Promoterfragmente (CD19-200 und CD19-200-E) zu unspezifischer Transgenexpression gleichermaßen in JY- und HeLa-Zellen führen. Die MFI der eGFP⁺ Zellen wird durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR in keinem der beiden Konstrukte (CD19-200 und CD19-1000-E) signifikant gesteigert, weder in JY- noch in HeLa-Zellen (Abbildung 7b).

Da die Unterschiede bezüglich der Expressionsstärke des Transgens eGFP in den Zelllinien nur marginal sind (Abbildung 7b) und der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR in diesem Experiment keinen Einfluss auf die Transkriptionsstärke zeigt, sollte im folgenden Versuch die Transduktion von primären murinen B-Zellen *in vitro* mit den bekannten Konstrukten durchgeführt werden.

4.2.2 Primäre murine B-Zellen

Nach der Analyse der Konstrukte CD19-1000 und CD19-1000-E sowie CD19-200 und CD19-200-E in Zelllinien sollte nun die Auswirkung des Transkriptionsverstärkers MAR-E μ -MAR im Zusammenhang mit den beiden verschiedenen CD19-Promoter-Fragmenten auf primäre murine B-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden B-Zellen aus Mäusemilzen mittels magnetisch markierter Antikörper (Magnetic Cell Sorting, MACS) isoliert und in Kultur genommen. Retroviren können nur Zellen in der Zellteilung infizieren, so dass

eine effiziente Zellteilung in der Zellkultur jeweils Voraussetzung für die Transduktion mit den retroviralen Konstrukten ist.

Wie bei den Zelllinien (s.o.) waren auch bei den murinen B-Zellen am ersten Tag nach der Transduktion kaum eGFP⁺ Zellen nachzuweisen, die Analyse erfolgte ab Tag 2.

In den Kontrollzellpopulationen (Abbildung 8) zeigte sich nahezu keine Hintergrundfluoreszenz (< 0,1% der B-Zellen), in den Konturendiagrammen lassen sich nach Transduktion mit den vier Konstrukten jeweils eGFP⁺ Zellpopulationen erkennen (in Abbildung 8 jeweils im Rechteck innerhalb der Konturendiagramme).

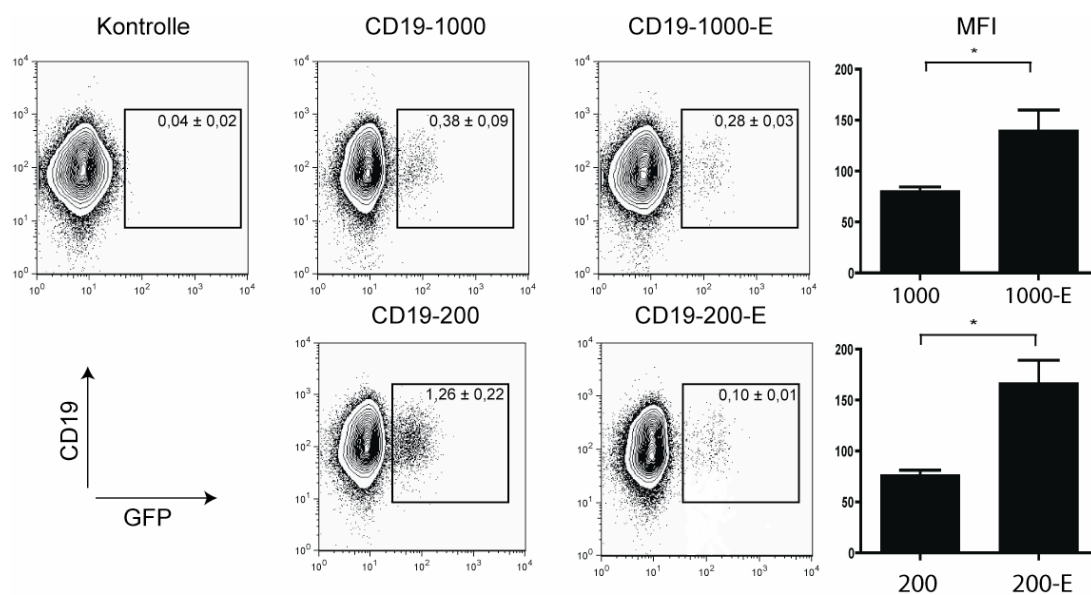


Abbildung 8: Konturendiagramm der transduzierten B-Zellen an Tag zwei nach der Transduktion, analysiert bezüglich der Expression von eGFP. Die Rechtecke innerhalb der Konturendiagramme enthalten jeweils die eGFP⁺ Zellpopulation. (n jeweils = 4; 2 unabhängige Experimente). **Balkendiagramm** zum Vergleich der MFI nach Transduktion mit (CD19-1000-E und CD19-200-E) bzw. ohne (CD19-1000 und CD19-200) Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR. (* = statistische Signifikanz, CD19-1000 vs. CD19-1000-E: p = 0,02; CD19-200 vs. CD19-200-E: p = 0,004, student's t-test).

Im Konturendiagramm (Abbildung 8) ist zu erkennen, dass die eGFP⁺ Zellen (im Rechteck) bei CD19-1000-E im Vergleich zu CD19-1000 und bei CD19-200-E im Vergleich zu CD19-200 entlang der Abszisse nach rechts verschoben sind. Dies zeigt eine gesteigerte Fluoreszenz der eGFP⁺ Zellen durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR bei beiden Konstrukten. Diese Steigerung der MFI ist in den Balkendiagrammen rechts quantifiziert dargestellt, die Konstrukte mit Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR führen jeweils zur statistisch signifikanten Steigerung der MFI in eGFP⁺ Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Konstrukten ohne Transkriptionsverstärker.

In primären murinen B-Zellen *in vitro* zeigt sich eine statistisch signifikante Expressionsverstärkung durch MAR-E μ -MAR sowohl im Konstrukt CD19-1000 mit langem CD19-Promoterfragment als auch im Konstrukt CD19-200 mit kurzem Promoterfragment. Eine B-Zellspezifität lässt sich aufgrund des Versuchsaufbaus, in welchem nur B-Zellen transduziert werden, nicht beurteilen. Um die Zellspezifität des Transkriptionsverstärkers analysieren zu können und den Einfluss des Transkriptionsverstärkers *in vivo* zu sehen, sollten Analysen im Mausmodell folgen.

4.3 *In vivo*-Analyse

Nachdem der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR *in vitro* in primären B-Zellen eine signifikante Transgenexpressionsverstärkung zeigte, sollte seine Auswirkung auf die Immunzellen muriner Knochenmarkschimären analysiert werden. Um auch *in vivo* die Funktion des B-zellspezifischen Transkriptionsverstärkers testen zu können, wurden Knochenmarkschimären mit den Konstrukten CD19-1000, CD19-1000-E, CD19-200 und CD19-200-E generiert. Es wurde hierzu retroviraler Vektorüberstand mit den oben beschriebenen Plasmiden (CD19-1000, CD19-1000-E, CD19-200 und CD19-200-E) hergestellt, mit welchem die HSPC der Spendermäuse transduziert wurden, ehe die Zellen in die Empfängermause transplantiert wurden. Sowohl Spender- als auch Empfängermause waren vom Stamm C57BL/6. Innerhalb von 8-12 Wochen

regenerierte sich ihr Immunsystem und die neu gebildeten Immunzellen aus den lymphatischen Organen Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Thymus wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von eGFP untersucht.

4.3.1 Immunzellen der Milz

Die lymphoiden Organe der Knochenmarkschimären nach Transduktion der Spender-HSPC mit respektivem Virusüberstand aus den Vektoren CD19-1000, CD19-1000-E, CD19-200 und CD19-200-E wurden nach Regeneration der Immunzellen durchflusszytometrisch analysiert. Anhand der Oberflächenmarker CD19 bzw. B220 wurden B-Zellen durchflusszytometrisch als solche erkannt.

In der Milz war bei den Kontrollmäusen, die nicht transduzierte HSPC erhalten hatten, keine eGFP-Expression ($< 0,1\%$) zu sehen (Abbildung 9). Nach Transduktion mit allen Konstrukten zeigte sich jeweils eine eindeutige eGFP⁺ B-Zellpopulation (Abbildung 9, oberer rechter Quadrant). Auch im unteren rechten Quadranten sind eGFP⁺ Zellen zu sehen, diese Zellen sind CD19⁻ und somit Nicht-B-Zellen. Diese unspezifische Transgenexpression tritt bei den vier Vektoren unterschiedlich häufig auf, das kurze Promoterfragment (CD19-200) führt zu häufigerer Transgenexpression in Nicht-B-Zellen als das lange Promoterfragment (CD19-1000).

Die eGFP⁺ B-Zellpopulation (Abbildung 9, oberer rechter Quadrant) ist nach Transduktion mit CD19-1000-E bzw. CD19-200-E entlang der Abszisse nach rechts verschoben im Vergleich zur eGFP⁺ B-Zell-Population nach Transduktion mit CD19-1000 bzw. CD19-200 ohne Transkriptionsverstärker. Somit lässt sich eine Steigerung der Fluoreszenzintensität des eGFP durch den Transkriptionsverstärker in beiden Konstrukten schon im Konturendiagramm erkennen. In den Balkendiagrammen (Abbildung 9, rechts) ist diese Differenz der MFI der eGFP⁺ B-Zellen quantitativ dargestellt. Bei beiden Konstrukten (CD19-1000 und CD19-200) erfolgt eine signifikante Steigerung der MFI der eGFP⁺ B-Zellpopulation durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR (p jeweils $\leq 0,001$, student's t-test). Die eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (Abbildung 9, unterer rechter

Quadrant) unterscheiden sich bezüglich der MFI jeweils nicht signifikant (CD19-1000 vs. CD19-1000-E: $p = 0,11$; CD19-200 vs. CD19-200-E: $p = 0,17$, student's t-test, kein Balkendiagramm gezeigt).

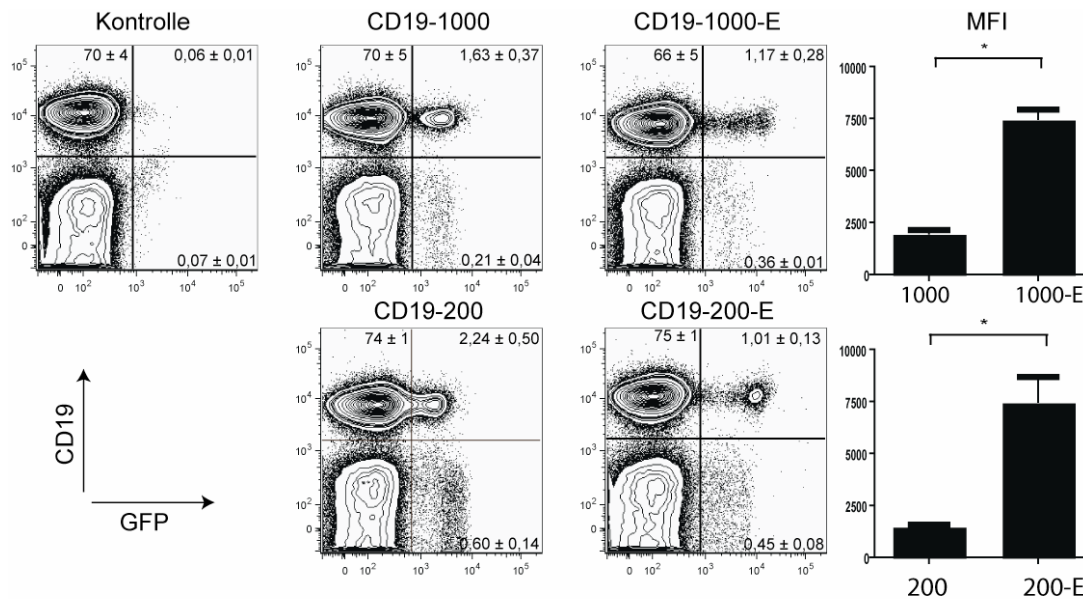


Abbildung 9: Konturendiagramme: Expressionsprofil in der murinen Milz nach einmaliger Transduktion der transplantierten HSPC mit CD19-1000, CD19-1000-E, CD19-200 und CD19-200-E. Die oberen Quadranten zeigen B-Zellen (CD19⁺), die unteren Quadranten Nicht-B-Zellen (CD19⁻); in den rechten Quadranten sind die eGFP exprimierenden Zellen zu sehen. Entlang der x-Achse steigt die Stärke der Fluoreszenz des eGFP. (Kontrolle: $n = 10$, CD19-1000: $n = 13$; CD19-1000-E: $n = 15$, drei unabhängige Experimente, CD19-200 und CD19-200-E: n je = 5). **Balkendiagramme** zum Vergleich der MFI der eGFP⁺ B-Zellen (nur oberer rechter Quadrant) CD19-1000 vs. CD19-1000-E: $p < 0,0001$; CD19-200 vs. CD19-200-E: $p = 0,001$, student's t-test, (* = statistisch signifikanter Unterschied). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt also die Transgenexpression signifikant. Die MFI der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (unterer rechter Quadrant) unterscheidet sich nicht signifikant (CD19-1000 vs. CD19-1000-E: $p = 0,11$; CD19-200 vs. CD19-200-E: $p = 0,17$, student's t-test, kein Balkendiagramm gezeigt). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt die Transgenexpression B-zell-spezifisch. (CD19-1000 und CD19-1000-E: $n = 4$, CD19-200 und CD19-200-E: $n = 5$).

Es lässt sich zusammenfassen, dass der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR die Transgenexpression sowohl in Zusammenhang mit dem langen als auch mit dem kurzen Promoterfragment signifikant verstärkt und dass die Transkriptions-

verstärkung der Transgenexpression durch MAR-E μ -MAR in den Immunzellen der Milz B-zellspezifisch erfolgt. Die Transgenexpression erfolgt nicht streng B-zellspezifisch, da zu einem geringem Anteil auch Nicht-B-Zellen eGFP exprimieren, insbesondere das kurze CD19-Promoterfragment CD19-200 zeigt mit und ohne Transkriptionsverstärker einen deutlichen Anteil eGFP⁺ Nicht-B-Zellen, d.h. unspezifische Transgenexpression.

4.3.2 Immunzellen der Lymphknoten

Zur Analyse der Immunzellen der Lymphknoten wurden die inguinalen Lymphknoten der murinen Knochenmarkschimären entnommen und die Immunzellen durchflusszytometrisch auf ihre Expression des Transgens eGFP hin analysiert. Anhand der Oberflächenmarker CD19 und B220 konnten die Zellen der Lymphknoten als B-Zellen erkannt werden.

Sowohl B- als auch Nicht-B-Zellpopulationen zeigten bei den Kontrollmäusen in den Immunzellen der Lymphknoten nahezu keine Hintergrundfluoreszenz (< 0,1%). Nach Transduktion mit den vier Konstrukten ist jeweils im oberen rechten Quadranten eine eGFP⁺ B-Zellpopulation zu sehen (Abbildung 10). Diese eGFP⁺ B-Zellpopulation ist nach Transduktion mit den Vektoren mit Transkriptionsverstärker (CD19-1000-E und CD19-200-E) innerhalb des Konturendiagramms im Vergleich zu den Vektoren ohne Transkriptionsverstärker deutlich nach rechts verschoben. Diese Steigerung der Expression des Transgens eGFP wird in den Balkendiagrammen (Abbildung 10, rechts) quantifiziert und ist sowohl für das kurze Promoterfragment, als auch für das lange Promoterfragment statistisch signifikant. Alle Vektoren führen auch zur eGFP-Expression in Nicht-B-Zellen (Abbildung 10, unterer rechter Quadrant), wenn auch zu geringerem Anteil als in B-Zellen. Wie auch in den Immunzellen der Milz, so zeigt sich auch in den Lymphknoten ein höherer Anteil unspezifischer Transgenexpression nach Transduktion mit CD19-200 bzw. CD19-200-E, während nach Transduktion mit CD19-1000 und CD19-1000-E nur wenige Nicht-B-Zellen eGFP exprimieren. Die MFI in den eGFP⁺ Nicht-B-

Zellpopulation unterscheidet sich jeweils nicht signifikant (CD19-1000 vs. CD19-1000-E: $p = 0,27$; CD19-200 vs. CD19-200-E: $p = 0,21$; student's t-test, kein Balkendiagramm gezeigt).

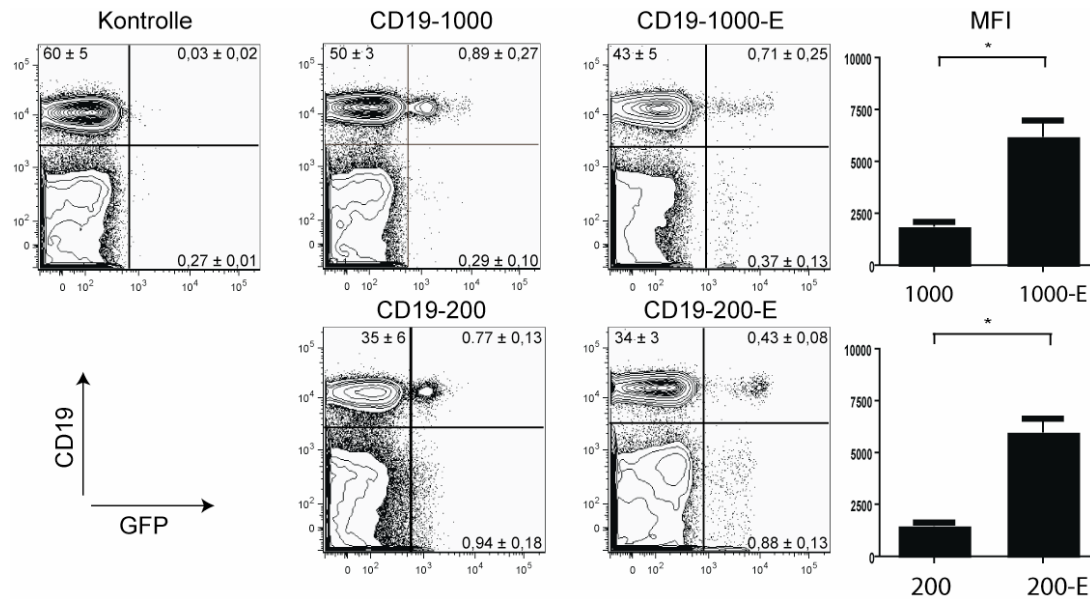


Abbildung 10: Konturendiagramme: Expressionsprofil in murinen Immunzellen der inguinalen Lymphknoten nach einmaliger Transduktion der transplantierten HSPC mit CD19-1000, CD19-1000-E, CD19-200 und CD19-200-E. Die oberen Quadranten zeigen B-Zellen (CD19⁺), die unteren Quadranten Nicht-B-Zellen (CD19⁻); in den rechten Quadranten sind die eGFP exprimierenden Zellen zu sehen. Entlang der x-Achse steigt die Stärke der Fluoreszenz des eGFP. (Kontrolle: $n = 5$, CD19-1000: $n = 9$; CD19-1000-E: $n = 8$, drei unabhängige Experimente, CD19-200 und CD19-200-E: n je = 5). **Balkendiagramme** zum Vergleich der MFI der eGFP⁺ B-Zellen (nur oberer rechter Quadrant) CD19-1000 vs. CD19-1000-E: $p = 0,001$; CD19-200 vs. CD19-200-E: $p = 0,0001$, student's t-test, (* = statistisch signifikanter Unterschied). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt die Transgenexpression signifikant. Die MFI der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (unterer rechter Quadrant) unterscheidet sich nicht signifikant (CD19-1000 vs. CD19-1000-E: $p = 0,27$; CD19-200 vs. CD19-200-E: $p = 0,21$; student's t-test, kein Balkendiagramm gezeigt). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt die Transgenexpression B-zellspezifisch. (Kontrolle: $n = 3$, CD19-1000 und CD19-1000-E: $n = 4$, CD19-200 und CD19-200-E $n = 5$).

Damit entsprechen die Schlussfolgerungen, welche aus der Analyse der Lymphknoten gezogen werden können, den Ergebnissen der Analyse der

Milzzellen (Abbildung 9, Abbildung 10): Es findet eine signifikante B-zell-spezifische Transkriptionsverstärkung durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR statt, sowohl in Verbindung mit dem 200 bp- als auch mit dem 1000 bp-Promoterfragment. Die Expression des Transgens eGFP erfolgt nicht streng B-zellspezifisch, sondern in geringerer Anzahl auch in Nicht-B-Zellen. Die unspezifische Expression differiert hierbei zwischen den verschiedenen Konstrukten, das kurze Promoterfragment CD19-200 ist weniger B-zellspezifisch als CD19-1000.

4.3.3 Immunzellen des Knochenmarks

Besonderes Interesse gilt der Analyse des rekonstituierten Knochenmarks der Chimären, da im Knochenmark nicht nur reife Immunzellen zu finden sind, sondern insbesondere auch die Vorläufer der B-Zellen. Es soll analysiert werden, ab welchem Entwicklungsstadium die B-Zellen das Transgen exprimieren und zu welchem Zeitpunkt die Expression besonders ausgeprägt ist.

Um die Expression von eGFP anhand unterschiedlicher Entwicklungsstadien der B-Zellen zu zeigen, wurden die Subpopulationen der B-Zellen anhand der differentiellen Expression von B220 und IgM identifiziert (Abbildung 11a, Abbildung 12a). Subpopulation A entspricht Nicht-B-Zellen, Subpopulation B den Pro- und Prä-B-Zellen ohne IgM, Subpopulation C entspricht unreifen B-Zellen mit hoher IgM-Expression, Subpopulation D entspricht transitionalen B-Zellen und Subpopulation E schließlich entspricht reifen B-Zellen im Knochenmark mit geringerer Expression von IgM, zu denen auch rezirkulierende B-Zellen zählen. Die Expression von eGFP in den transgenen B-Zellen des Knochenmarks nimmt im Verlauf der fortschreitenden Entwicklungsstadium der Zellen zu (Abbildung 11b, Abbildung 12 b).

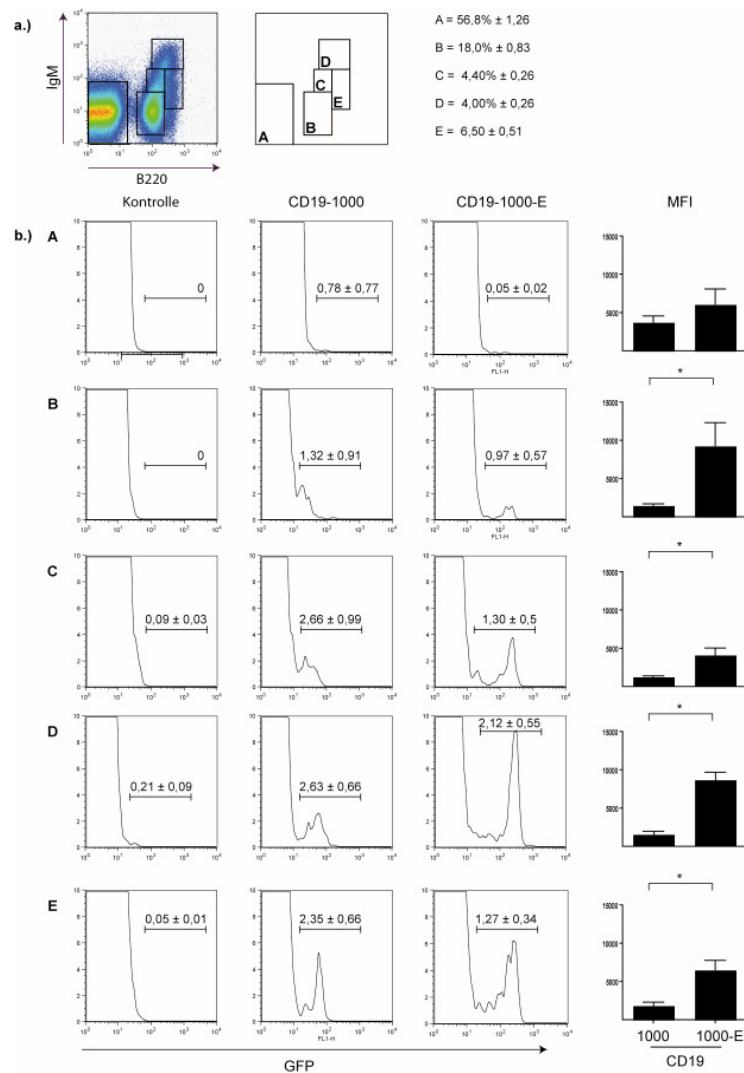


Abbildung 11 a.) Identifikation der verschiedenen aufeinander folgenden B-Zell-Entwicklungsstadien im Knochenmark anhand der Expression von B220 und IgM auf der Zelloberfläche (Population A entspricht Nicht-B-Zellen, die Populationen B bis E den zunehmenden Reifestadien der B-Zellen im Knochenmark, siehe Text). **b.) Histogramme:** Expressionsprofil von eGFP im murinen Knochenmark nach einmaliger Transduktion der HSPC mit CD19-1000 und CD19-1000-E. Die Prozentangaben in den gezeigten Histogrammen entsprechen der Anzahl von eGFP⁺ Zellen der jeweiligen Subpopulation. (Kontrolle: n = 8, CD19-1000: n = 11; CD19-1000-E: n = 13). **Balkendiagramme** zum Vergleich der MFI der eGFP⁺ Zellen CD19-1000 vs. CD19-1000-E: Nicht-B-Zellen (A) p = 0,4; Pro- und Prä-B-Zellen (B): p = 0,4; unreife B-Zellen (C): p = 0,008; transitionale B-Zellen (D): p = 0,016; reife B-Zellen (E): p = 0,003; student's t-test, * = statistisch signifikanter Unterschied, n = 4). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt die Transgenexpression in allen B-Zell-Entwicklungsstadien (B-E) signifikant, während die MFI der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (A) durch den Transkriptionsverstärker nicht signifikant beeinflusst wird.

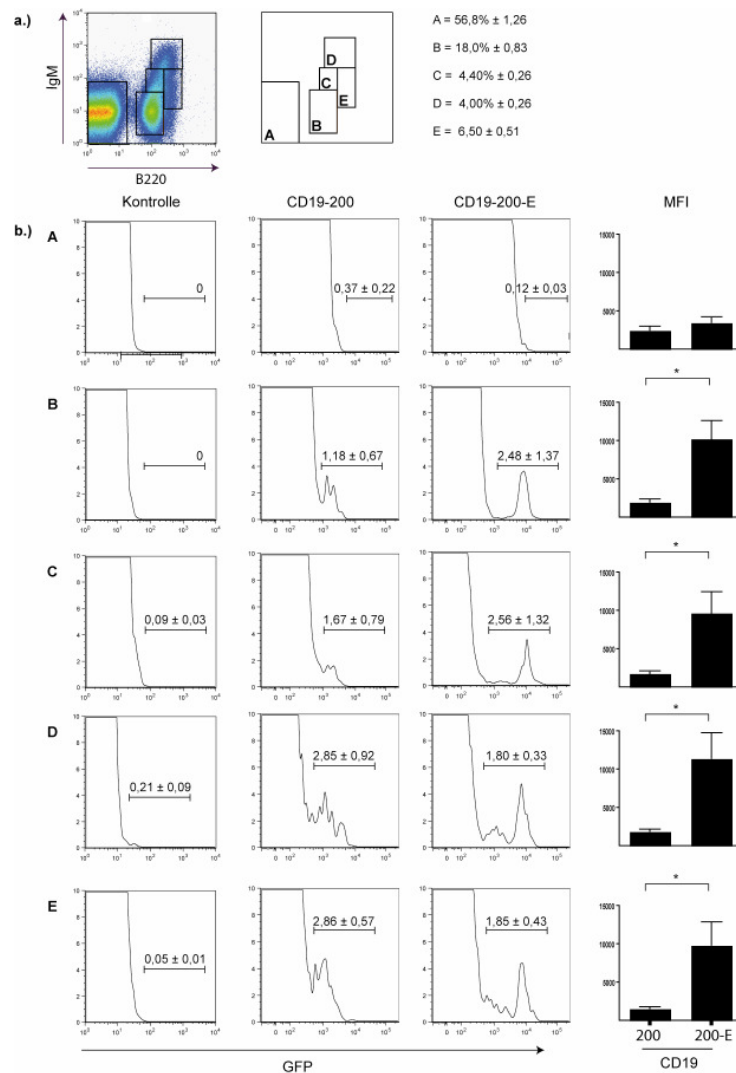


Abbildung 12 a.) Identifikation der verschiedenen aufeinander folgenden B-Zell-Entwicklungsstadien im Knochenmark anhand der Expression von B220 und IgM auf der Zelloberfläche (Population A entspricht Nicht-B-Zellen, die Populationen B-E den zunehmenden Reifestadien der B-Zellen im Knochenmark, siehe Text). **b.) Histogramme:** Expressionsprofil von eGFP im murinen Knochenmark nach einmaliger Transduktion der HSPC mit CD19-200 und CD19-200-E. Die Prozentangaben in den gezeigten Histogrammen entsprechen der Anzahl von eGFP⁺ Zellen der jeweiligen Subpopulation. (Kontrolle: n = 8, CD19-200 und CD19-200-E: n = 5). **Balkendiagramme** zum Vergleich der MFI der eGFP⁺ Zellen CD19-200 vs. CD19-200-E: Nicht-B-Zellen (A) p = 0,17; Pro- und Prä-B-Zellen (B): p = 0,006; unreife B-Zellen (C): p = 0,019; transitionale B-Zellen (D): p = 0,019; reife B-Zellen (E): p = 0,021; student's t-test, * = statistisch signifikanter Unterschied). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt die Transgenexpression in allen B-Zell-Entwicklungsstadien (B-E) signifikant, während die MFI der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (A) durch den Transkriptionsverstärker nicht signifikant beeinflusst wird.

Die Rechtsverschiebung der eGFP⁺ Populationen in den Histogrammen (Abbildung 11b, Abbildung 12b) bei den Zellen der murinen Knochenmarkschimären, deren HSPC mit CD19-1000-E bzw. CD19-200-E transduziert wurden (rechte Spalte), gegenüber denen, welche mit CD19-1000 bzw. CD19-200 transduziert wurden, zeigt in allen B-Zell-Entwicklungsstadien eine deutliche Steigerung der MFI durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR. In der Nicht-B-Zellpopulation (A) wird die MFI und somit die Transkriptionsstärke durch MAR-E μ -MAR nicht beeinflusst (Abbildung 11b, Abbildung 12b). Die MFI der jeweiligen B-Vorläuferzellpopulation (B bis D) und der reifen B-Zellen (E) ist in den Balkendiagrammen quantifiziert dargestellt. In allen B-Zell-Entwicklungsstadien und bei den reifen B-Zellen wird die MFI der eGFP⁺ Zellen durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR sowohl im Vektor CD19-1000 als auch im Vektor CD19-200 signifikant gesteigert, während der Transkriptionsverstärker auf die MFI in den eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (A) keinen signifikanten Einfluss zeigt.

Im Knochenmark zeigte sich also in allen Entwicklungsstadien von den Pro-B-Zellen bis zu den reifen B-Zellen eine spezifische Transkriptionsverstärkung durch MAR-E μ -MAR.

4.3.4 Immunzellen des Thymus

Bei der Analyse der Immunzellen des rekonstituierten Thymus waren bei physiologisch sehr geringem B-Zell-Anteil im Thymus keine eGFP⁺ B-Zellen zu sehen (Abbildung 13a, oberer rechter Quadrant). Nach Transduktion mit jeweils einem der vier Konstrukte exprimierte jeweils ein Teil der Nicht-B-Zellen eGFP (Abbildung 13a, unterer rechter Quadrant.), analog zu den eGFP exprimierenden Nicht-B-Zellen in Milz, Lymphknoten und Knochenmark. In den Immunzellen des Thymus lässt sich eine häufigere unspezifische eGFP-Expression in Nicht-B-Zellen bei den Konstrukten mit Transkriptionsverstärker im Vergleich zu den Vektoren ohne Transkriptionsverstärker beobachten.

Ergebnisse

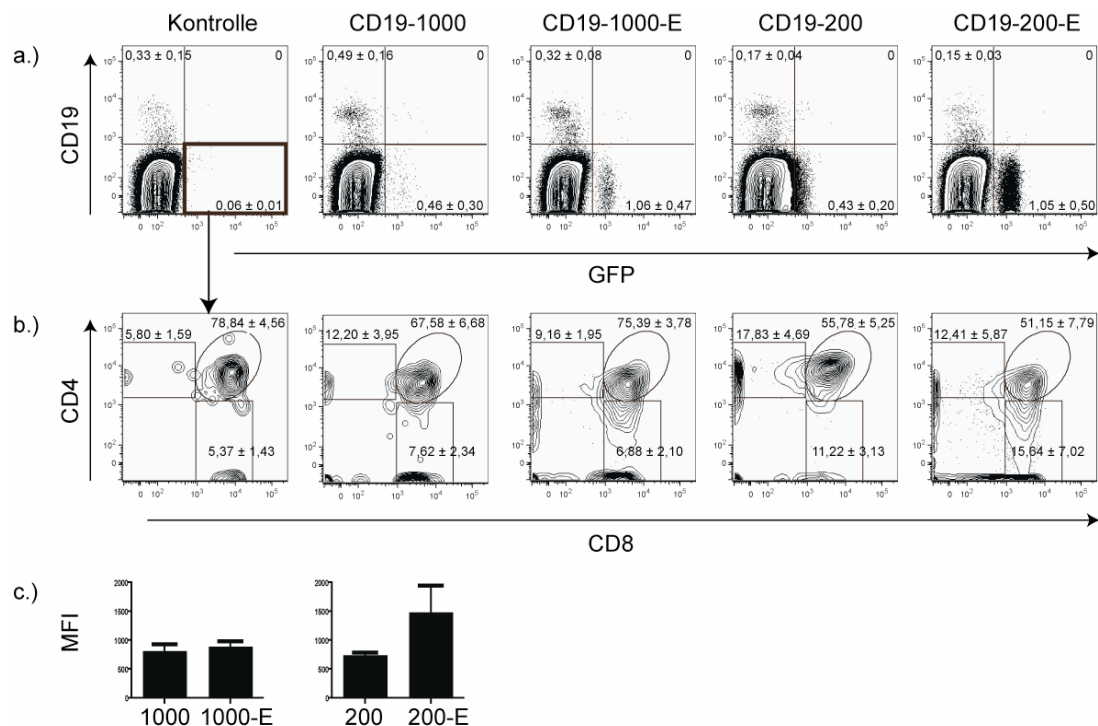


Abbildung 13 a.) Konturendiagramme: Expressionsprofil in murinen Immunzellen des Thymus nach einmaliger Transduktion der transplantierten HSPC mit CD19-1000, CD19-1000-E, CD19-200 und CD19-200-E. Die oberen Quadranten zeigen B-Zellen (CD19⁺), die unteren Quadranten Nicht-B-Zellen (CD19⁻); in den rechten Quadranten sind die eGFP exprimierenden Zellen zu sehen. Entlang der x-Achse steigt die Stärke der Fluoreszenz des eGFP. (Kontrolle: n = 9, CD19-1000: n = 13; CD19-1000-E: n = 15, drei unabhängige Experimente, CD19-200 und CD19-200-E n = 5). **b.)** Identifikation der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (entsprechend dem unteren rechten Quadranten der Abbildung 9a) anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 als T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺). **c.) Balkendiagramme** zum Vergleich der MFI der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (unterer rechter Quadrant) CD19-1000 vs. CD19-1000-E: p = 0,59; CD19-200 vs. CD19-200-E: p = 0,14, student's t-test, kein statistisch signifikanter Unterschied). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR beeinflusst die Stärke der Transgenexpression in den Nicht-B-Zellen nicht signifikant. (Kontrolle: n = 3, CD19-1000 und CD19-1000-E: n = 4, CD19-200 und CD19-200-E n je = 5).

Um die eGFP⁺ Nicht-B-Zellen genauer zuordnen zu können, erfolgte eine weitere durchflusszytometrische Analyse derselben (Abbildung 13b), wobei Färbung und Analyse sich bei der geringen Zellzahl schwierig gestaltete. Die meisten (> 80%) eGFP⁺ Nicht-B-Zellen wurden anhand der beiden Oberflächenmarker CD4 und CD8 als T-Zellen erkannt. Darunter waren die CD4⁺CD8⁺ T-Zellen bei allen vier

Vektoren anteilig die größte Population innerhalb der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (50-80%), ebenfalls große Anteile wurden als einfach positive (CD4⁺CD8⁻: 6-18% bzw. CD4⁻CD8⁺: 5-16%) T-Zellen identifiziert. Es zeigte sich, dass die Transgenexpression in T-Zellen bereits im frühen doppelt positiven Entwicklungsstadium beginnt und auch in reifen T-Zellen fortgesetzt wird, sowohl in CD4⁺ als auch in CD8⁺ T-Zellen.

Die eGFP⁺ Nicht-B-Zellpopulation ist nach Transduktion mit dem Vektor mit Transkriptionsverstärker im Zusammenhang mit dem kurzen Promoterfragment (CD19-200-E) innerhalb des Konturendiagramms im Vergleich zum Vektor CD19-200 ohne Transkriptionsverstärker geringfügig nach rechts verschoben. Nach Transduktion mit CD19-1000-E findet im Vergleich zu CD19-1000 keine sichtbare Zunahme der Expressionsstärke von eGFP statt. Die Expressionsstärke des eGFP wird in den Balkendiagrammen (Abbildung 13c) quantifiziert und unterscheidet sich weder für das kurze Promoterfragment, noch für das lange Promoterfragment durch den Transkriptionsverstärker statistisch signifikant.

Zusammenfassend zeigte sich im Thymus, dass die Nicht-B-Zellen, welche das Transgen eGFP exprimieren, hauptsächlich (> 80%) T-Zellen sind. Die Transgenexpression beginnt bereits im doppelt positiven Entwicklungsstadium der T-Zellen, was sich möglicherweise auf die Unreife der Thymozyten zurückführen lässt, und wird in CD4- und CD8-T-Zellen fortgesetzt. Der Transkriptionsverstärker steigert die MFI in den eGFP⁺ Nicht-B-Zellen nicht signifikant, was den Ergebnissen der B-zellspezifischen Transkriptionsverstärkung in den Immunzellen von Milz, Lymphknoten und Knochenmark entspricht (s.o.).

Es lässt sich nach Analyse der Immunzellen aus Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Thymus zusammenfassen, dass das Transgen eGFP nicht ausschließlich in B-Zellen exprimiert wird, sondern auch in einem geringem Anteil Nicht-B-Zellen. Diese zellunspezifische Transgenexpression nimmt jeweils durch den Transkriptionsverstärker etwas zu (Abbildung 13). Das 200 bp-Promoter-

fragment führt in den Immunzellen von Milz und Lymphknoten deutlich häufiger zu zellunspezifischer Transgenexpression als das 1000 bp-Promoterfragment (Abbildung 9, Abbildung 10). Die Expressionsstärke, quantifiziert als MFI der eGFP⁺ Zellen nimmt durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR in B-Zellen und deren Vorläuferzellen in allen analysierten lymphatischen Organen und in Zusammenhang mit beiden Promoterfragmenten in eGFP⁺ B-Zellen jeweils signifikant zu, nicht aber in eGFP⁺ Nicht-B-Zellen. Die Transkriptionsverstärkung erfolgt B-zellspezifisch.

Ziel ist eine häufige, konstante B-zellspezifische Transgenexpression. Um eine häufigere Expression zu erreichen, wurde eine mehrfache Transduktion der HSPC vor Transplantation in die Empfängermäuse durchgeführt. Da das 200bp-Promoterfragment in den Konstrukten CD19-200 und CD19-200-E sich bereits nach einmaliger Transduktion als nicht B-zellspezifisch herausstellte (Abbildung 9, Abbildung 10) und bei Mehrfachtransduktion eine Abnahme der Zellspezifität zu erwarten ist (Werner et al. 2004), wurde die Mehrfachtransduktion nur mit CD19-1000 und CD19-1000-E durchgeführt, nicht mit den Vektoren mit 200 bp-Promoterfragment.

4.4 Einfluss von Mehrfachtransduktion *in vivo*

4.4.1 Immunzellen der Milz

Bei den bisher durchgeführten *in vivo*-Versuchen, wurden die HSPC vor Transplantation einmalig mit Virusüberstand der Konstrukte CD19-1000, CD19-1000-E, CD-200 und CD200-E transduziert. Im Folgenden soll der Einfluss von dreifacher Transduktion mit Virusüberstand von CD19-1000 und C19-1000-E der HSPC vor Transplantation analysiert werden. In zwei unabhängigen Experimenten wurden die dreifach transduzierten Stammzellen in Empfängermäuse transplantiert, deren Zellen nach Regeneration des Immunsystems durchflusszytometrisch analysiert wurden. Durch die Mehrfachtransduktion ist

eine Zunahme des Anteils eGFP exprimierender Zellen zu erwarten. Da bei Analyse der Einfachtransduktion bei den Konstrukten mit kurzem CD19-Promoterfragment (CD19-200 und CD19-200-E) bereits eine häufigere unspezifische Transgenexpression zu sehen war als bei den Konstrukten mit langem CD19-Promoterfragment (CD19-1000 und CD19-1000-E) (Abbildung 9, Abbildung 10), scheiden die Vektoren CD19-200 und CD19-200-E bereits für eine B-zellspezifische Transkriptionsregulierung aus. Die Mehrfachtransduktion wurde aus diesem Grund nur mit den Vektoren CD19-1000 und CD19-1000-E durchgeführt.

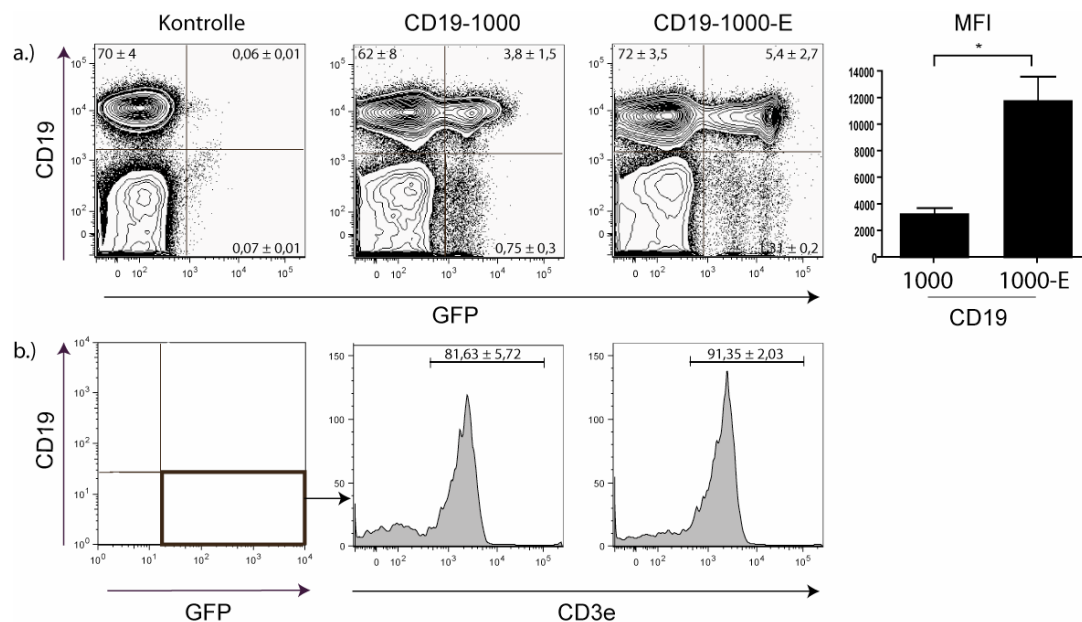


Abbildung 14 a.) Konturendiagramme: Expressionsprofil in murinen Immunzellen der Milz nach dreimaliger Transduktion der transplantierten HSPC mit CD19-1000 und CD19-1000-E. Die oberen Quadranten zeigen B-Zellen ($CD19^+$), die unteren Quadranten Nicht-B-Zellen ($CD19^-$); in den rechten Quadranten sind die eGFP exprimierenden Zellen zu sehen. Entlang der x-Achse steigt die Stärke der Fluoreszenz des eGFP. (CD19-1000: n = 7; CD19-1000-E: n = 6, zwei unabhängige Experimente). **Balkendiagramm:** zum Vergleich der MFI der eGFP⁺ B-Zellen (oberer rechter Quadrant, n jeweils = 3) CD19-1000 vs. CD19-1000-E: p = 0,009; (student's t-test, * = statistisch signifikanter Unterschied). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt die Transgenexpression in den B-Zellen signifikant. **b.) Histogramme** zur Identifikation der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (unterer rechter Quadrant der Abbildung 10 a) anhand des Oberflächenmarkers CD3e überwiegend (> 80%) als T-Zellen.

In den Immunzellen der Milz nimmt im Vergleich zur Einfachtransduktion (Abbildung 9) sowohl nach Mehrfachtransduktion mit CD19-1000 als auch nach Mehrfachtransduktion mit CD19-1000-E die Anzahl eGFP exprimierender B-Zellen und eGFP exprimierender Nicht-B-Zellen zu (Abbildung 9, Abbildung 14). Die Zunahme der Häufigkeit von eGFP-Expression durch Mehrfachtransduktion zeigt sich bei Vektor CD19-1000-E ausgeprägter als bei CD19-1000: Zunahme von 1,2% auf 5,4% eGFP⁺ B-Zellen und von 0,4% auf 1,3% eGFP⁺ Nicht-B-Zellen bei CD19-1000-E und Zunahme von 1,6% auf 3,8% eGFP⁺ B-Zellen und von 0,2% auf 0,8% eGFP⁺ Nicht-B-Zellen bei CD19-1000-E (Abbildung 9 und Abbildung 14a). Diese im Vergleich stärkere Zunahme der eGFP exprimierenden Zellen nach dreimaliger Transduktion mit CD19-1000-E, könnte in einem Ausgleich des möglicherweise niedrigeren Titers bei CD19-1000-E verglichen mit CD19-1000 durch Mehrfachtransduktion liegen. Durch den Mehrfachkontakt mit der Zielzelle steigert sich auch bei niedrigem Virustiter die Anzahl transgenexprimierender Zellen. Es nimmt durch Mehrfachtransduktion bei beiden Konstrukten nicht nur die Anzahl eGFP⁺ B-Zellen, sondern auch die der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen zu. Die Zunahme der Expressionsfrequenz erfolgt unspezifisch sowohl in B-Zellen als auch in Nicht-B-Zellen im Sinne einer linearen Unspezifität. Die eGFP⁺ Nicht-B-Zellen wurden anhand des Oberflächenmarkers CD3e zu > 80% als T-Zellen identifiziert (Abbildung 14b). Dies entspricht der Analyse der eGFP⁺ Nicht B-Zellen im Thymus (Abbildung 13).

Im Konturendiagramm zeigt sich eine deutliche Rechtsverschiebung der eGFP⁺ B-Zellpopulation durch CD19-1000-E im Vergleich zu CD19-1000, also eine Zunahme der Expressionsstärke des Transgens eGFP durch den Transkriptionsverstärker. Die Expressionsstärke des eGFP wurde als MFI in Form von Balkendiagrammen quantifiziert (Abbildung 14a). Die MFI nach Dreifachtransduktion mit CD19-1000-E innerhalb der eGFP⁺ B-Zellpopulation ist statistisch signifikant höher als nach Dreifachtransduktion mit CD19-1000 ($p = 0,009$, student's t-test, Abbildung 14). Die MFI in den eGFP⁺ Nicht-B-Zellen weist zwischen CD19-1000 und CD19-1000-E auch nach Dreifachtransduktion keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,1$, student's t-test, keine Abbildung).

Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR beeinflusst die Transgenexpression auch bei Mehrfachtransduktion B-zellspezifisch.

Um den Einfluss der Mehrfachtransduktion auf die Transkriptionsverstärkung durch MAR-E μ -MAR direkt zu sehen, wurde die MFI der eGFP⁺ B- und Nicht-B-Zellpopulationen in der Milz nach einfacher und dreifacher Transduktion miteinander verglichen (Abbildung 9, Abbildung 14).

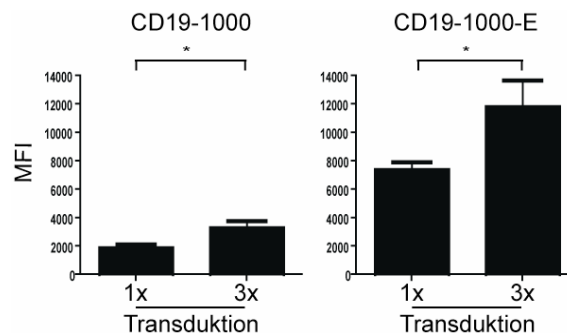


Abbildung 15: Balkendiagramme zum Vergleich der MFI der eGFP⁺ B-Zellen aus der Milz nach einmaliger vs. dreimaliger Transduktion mit CD19-1000 und CD19-1000-E. (CD19-1000: $p = 0,016$; CD19-1000-E: $p = 0,038$; student's t-test, * = statistisch signifikanter Unterschied). n je = 4 (Einfachtransduktion), bzw. $n = 3$ (Dreifachtransduktion). Durch die Mehrfachtransduktion wird die Expressionsstärke des Transgens eGFP signifikant gesteigert im Vergleich zur Einfachtransduktion, sowohl mit als auch ohne Transkriptionsverstärker. Die MFI der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen wird durch Mehrfachtransduktion nicht signifikant beeinflusst (CD19-1000: $p = 0,39$; CD19-1000-E: $p = 0,08$; student's t-test, kein Balkendiagramm gezeigt).

Bei den eGFP⁺ B-Zellen ist bei beiden Konstrukten (CD19-1000 und CD19-1000-E) eine signifikante Zunahme der MFI durch die dreimalige Transduktion im Vergleich zur Einmaltransduktion zu sehen (Abbildung 15, CD19-1000: $p = 0,016$; CD19-1000-E: $p = 0,038$; student's t-test). Bei den eGFP⁺ Nicht-B-Zellen hat die Mehrfachtransduktion keinen signifikanten Einfluss auf die MFI (CD19-1000: Einfach- vs. Dreifachtransduktion: $p = 0,39$; CD19-1000-E: Einfach- vs. Dreifachtransduktion: $p = 0,08$; student's t-test, keine Abbildung).

Die MFI in eGFP⁺ B-Zellen wird auch durch Dreifachtransduktion im Vergleich zur Einfachtransduktion mit CD19-1000 ohne Transkriptionsverstärker gesteigert,

wenn auch auf deutlich niedrigerem Fluoreszenzniveau als mit Transkriptionsverstärker. Dies könnte an Mehrfachtransduktionen einzelner Zellen liegen, welche die Transgenexpression verstärkt. Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR im Vektor CD19-1000-E verstärkt die Transgenexpression durch mehrmalige Transduktion im Vergleich zu einmaliger Transduktion in B-Zellen deutlich stärker als der Vektor CD19-1000. In Nicht-B-Zellen wird die MFI durch Mehrfachtransduktion nicht beeinflusst. Die Transkriptionsverstärkung bleibt auch bei mehrmaliger Transduktion B-zellspezifisch.

4.4.2 Immunzellen der Lymphknoten

Zum Vergleich mit Immunzellen der Lymphknoten nach Einfachtransduktion folgt die Analyse der rekonstituierten Immunzellen der Lymphknoten nach Dreifachtransduktion. Eine dreimalige Transduktion der HSPC mit CD19-1000 und CD19-1000-E führt zu häufigerer Transgenexpression in B-Zellen und in Nicht-B-Zellen der Lymphknoten (Abbildung 16).

Nach dreimaliger Transduktion mit CD19-1000 exprimieren mehr als fünf Mal so viele B-Zellen in den Lymphknoten eGFP im Vergleich zur Einfachtransduktion (Abbildung 10, Abbildung 16; 3,8% vs. 0,7% eGFP⁺ B-Zellen). Auch die Nicht-B-Zellen exprimieren nach Dreifachtransduktion deutlich häufiger eGFP (3,8% vs. 0,4%), dies entspricht einer Zunahme auf fast das Zehnfache im Vergleich zur Einfachtransduktion. Die Zunahme der unspezifischen Transgenexpression in Nicht-B-Zellen, steigt nach Transduktion mit CD19-1000-E viel stärker an als nach Transduktion mit CD19-1000 ohne Transkriptionsverstärker (Abbildung 10, Abbildung 16). Der Vektor CD19-1000 ist durch Mehrfachtransduktion weniger B-zellspezifisch, da sowohl die eGFP-Expression in B-Zellen als auch in Nicht-B-Zellen häufiger wird. Die B-Zellspezifität der Transgenexpression nach Dreifachtransduktion nimmt durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR im Konstrukt CD19-1000-E noch stärker ab, die Transgenexpression nach Dreifachtransduktion mit CD19-1000-E erfolgt nicht zellspezifisch (Abbildung 16, gleiche Anzahl eGFP exprimierender B-Zellen und eGFP exprimierender Nicht-B-

Zellen). Die abnehmende B-Zellspezifität ist in den Immunzellen der Lymphknoten deutlicher zu sehen als in der Milz, da die Gesamtanzahl von Nicht-B-Zellen in Lymphknoten höher ist, als in der Milz, wo der Großteil der Immunzellen B-Zellen sind.

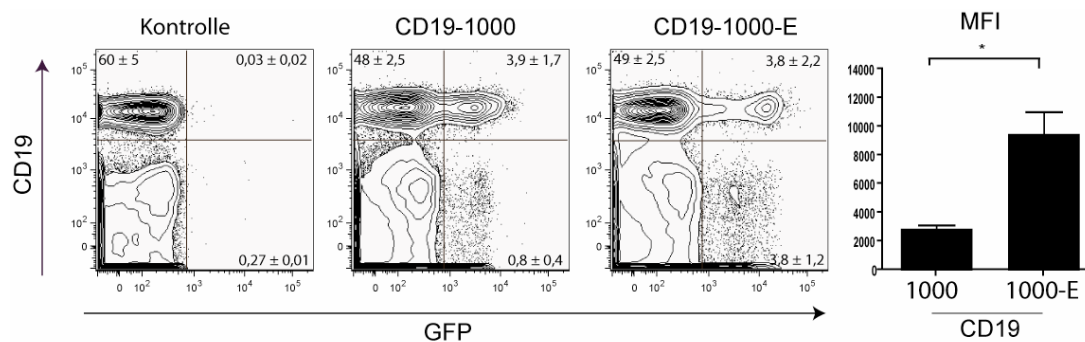


Abbildung 16: Konturendiagramme: Expressionsprofil in Immunzellen der murinen Lymphknoten nach dreimaliger Transduktion der transplantierten HSPC mit CD19-1000 und CD19-1000-E. Die oberen Quadranten zeigen B-Zellen (CD19⁺), die unteren Quadranten Nicht-B-Zellen (CD19⁻); in den rechten Quadranten sind die eGFP exprimierenden Zellen zu sehen. Entlang der x-Achse steigt die Stärke der Fluoreszenz des eGFP. (n je = 7, zwei unabhängige Experimente). **Balkendiagramm** zum Vergleich der MFI der eGFP⁺ B-Zellen (oberer rechter Quadrant, n jeweils = 3) CD19-1000 vs. CD19-1000-E: p = 0,01; (student's t-test, * = statistisch signifikanter Unterschied). Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt also die Transgenexpression in den B-Zellen signifikant. Die MFI in den eGFP⁺ Nicht-B-Zellen (unterer rechter Quadrant) unterscheidet sich auch nach Dreifachtransduktion mit CD19-1000 und CD19-1000-E nicht signifikant (p = 0,53, student's t-test, kein Balkendiagramm gezeigt).

Die MFI in den eGFP⁺ B-Zellpopulationen unterscheidet sich auch nach dreimaliger Transduktion mit CD19-1000 und CD19-1000-E signifikant, der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR verstärkt die Transgenexpression in eGFP⁺ B-Zellen (p = 0,01, student's t-test; Balkendiagramm Abbildung 16). Die MFI in eGFP⁺ Nicht-B-Zellen unterscheidet sich zwischen beiden Vektoren nicht signifikant (p = 0,53, student's t-test, kein Balkendiagramm gezeigt). Die Transkriptionsverstärkung erfolgt auch nach Dreifachtransduktion B-zell-spezifisch.

Die Analyse der Immunzellen des Thymus nach dreifacher Transduktion zeigte ein Verteilungsmuster der eGFP⁺ Nicht-B-Zellen auf die T-Zell-Subpopulationen CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺, was dem nach einfacher Transduktion entsprach (Abbildung 13), so dass auf eine weitere Abbildung verzichtet wurde.

Zusammenfassen lässt sich zu den Ergebnissen der Mehrfachtransduktion, dass Mehrfachtransduktion insgesamt zu häufigerer Transgenexpression führt. Es zeigte sich, dass die Transgenexpression bei CD19-1000 durch dreifache Transduktion im Vergleich zu einfacher Transduktion etwas weniger B-zellspezifisch erfolgte, während bei CD19-1000-E eine nahezu unspezifische Transgenexpression in B-Zellen und Nicht-B-Zellen gleichermaßen erfolgte. Durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR wird das Konstrukt nach mehrfacher Transduktion unspezifisch. Die Transkriptionsverstärkung durch MAR-E μ -MAR im Sinne der Steigerung der MFI innerhalb der eGFP⁺ Zellen bleibt auch nach mehrfacher Transduktion B-zellspezifisch, da nur die Anzahl eGFP exprimierender Nicht-B-Zellen zunimmt, nicht aber die MFI in der eGFP⁺ Nicht-B-Zellpopulation nach Transduktion mit CD19-1000-E höher ist als nach Transduktion mit CD19-1000 und auch nicht im Vergleich von Einmal- zu Mehrfachtransduktion signifikant steigt (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16).

5 Diskussion

5.1 *In vitro*-Analyse

Ziel der Arbeit war, einen retroviralen Vektor für gezielte, regulierte Transgenexpression und Expressionsverstärkung in B-Zellen zu entwickeln. Die Verwendung transduzierter Stammzellen anstelle von transgenen Mausstämmen bietet die Möglichkeit einer Weiterentwicklung zur gentherapeutischen Behandlung von z.B. primären B-Zelldefekten und Autoimmunerkrankungen. Ein zweiter Vorteil transduzierter Stammzellen ist die deutliche Zeitersparnis gegenüber der Generierung transgener Mausstämme.

Therapeutisch ist die zelllinienspezifische Transgenexpression bei Defekten einzelner Zelltypen von großer Bedeutung. In der Gentherapie ist es zudem von Vorteil, die Transgenexpression zellspezifisch steuern zu können, um unerwünschte Nebenwirkungen, wie z.B. eine unspezifische Transgenexpression in anderen Zelllinien, zu vermeiden. Die regulatorischen Sequenzen sollten hierbei möglichst klein gehalten werden, um den größtmöglichen Raum auf dem viralen Vektor für die Transgensequenz zur Verfügung zu haben. Es wurden zwei verschieden lange Fragmente des humanen CD19-Promoters (222 bp und 999 bp) jeweils mit und ohne transkriptionsverstärkende Elemente (MAR-E μ -MAR) bezüglich der Fluoreszenzstärke der transgenexprimierenden Zellen und der B-Zellspezifität verglichen. Der Oberflächenmarker CD19 wird ausschließlich in B-Zellen exprimiert und in deren Vorläuferzellen ab dem Pro-B-Zell-Statium (Riva et al. 1997). Der Transkriptionsverstärker E μ reguliert die Expression des μ -Gens der schweren Ketten der Immunglobuline (Cockerill et al. 1987). Ohne die flankierenden MARs war die Verstärkung der Transgenexpression durch E μ variabel, von den MARs wird vermutet, dass sie Anteil an der Repression der Expression in Nicht-B-Zellen haben und für die von der chromosomalen Positionierung des Gens unabhängige Expression von Bedeutung sind (Forrester et al. 1994, Jenuwein et al. 1997). Für eine konsistente, positionsunabhängige B-zellspezifische Transgenexpression

mussten die MARs, welche E μ -Sequenzen auf dem E μ -Lokus flankieren, in die Regulationssequenzen der Vektoren integriert werden (Lutzko et al. 2003). Die Erwartung an den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR war die Steigerung der schwachen Transgenexpression, welche bei retroviralen SIN-Vektoren beobachtet wurde, sowie Schutz der Transkriptionsregulation vor dem variablen chromosomalen Umfeld bei zufälliger Transgeninsertion in das Genom (Werner et al. 2004) und Zunahme der B-Zellspezifität durch den zellspezifischen Transkriptionsverstärker (Moreau et al. 2004).

Der Einfluss des Transkriptionsverstärkers E μ flankiert von MARs in Kombination mit einem 999 bp-Fragment des humanen CD19-Promoters sowie in Kombination mit einem 222 bp-Fragment desselben CD19-Promoters auf die Transgenexpression von eGFP insbesondere in B-Zellen wurde in dieser Arbeit systematisch analysiert. In Zusammenhang mit CD19-1000 wurde durch das posttranskriptionell regulatorische Element WPRE eine Zunahme des Virustiters sowie der Transgenexpression gezeigt (Werner et al. 2004), so dass alle hier analysierten Vektoren neben oben genannten regulatorischen Sequenzen auch WPRE beinhalten, um die beschriebenen niedrigen Virustiter bei SIN-Vektoren auszugleichen.

Nach dem Klonieren der vier verschiedenen Vektoren wurde durchflusszytometrisch eine Titerbestimmung des jeweiligen respektiven Virusüberstandes durchgeführt. Der Virusüberstand wurde durch Transfektion von Phoenix-Zellen mit den vier verschiedenen Plasmiden, welche als regulatorische Elemente die zu analysierenden Promoter- und Enhancersequenzen enthielten, gewonnen. Nach Transduktion mit den beiden Konstrukten mit Transkriptionsverstärker E μ und MARs (CD19-1000-E und CD19-200-E) war die Anzahl eGFP exprimierender Zellen jeweils deutlich niedriger als nach Transduktion mit den beiden Konstrukten ohne Transkriptionsverstärker und MARs (CD19-1000 und CD19-200). Das Konstrukt mit 222 bp-Promoterfragment (CD19-200) führt zudem zu einer häufigeren eGFP-Expression in den JY-Zellen als das Konstrukt mit 999 bp-Fragment. Dieser Unterschied in der Häufigkeit der Transgenexpression zwischen den

verschiedenen Vektoren könnte z.B. darin begründet sein, dass größere Konstrukte weniger effektiv in die Verpackungszelllinie Pheonix aufgenommen werden, so dass bei den Konstrukten CD19-200-E und CD19-1000-E im Vergleich zum jeweiligen Konstrukt ohne Transkriptionsverstärker eine geringere Anzahl an Viruskopien im Virusüberstand erreicht wird. Ebenso könnte durch das längere Promoterfragment die Anzahl an Viruskopien im Virusüberstand geringer sein als nach Transduktion mit dem kürzeren (222 bp) Fragment, da das Plasmid durch die kürzere regulatorische Sequenz insgesamt kleiner ist. Auch die Transduktion in die JY-Zellen könnte bei den längeren Konstrukten weniger effektiv sein, so dass eine geringere Zahl eGFP⁺ Zellen erreicht wird. Bei lentiviralen Konstrukten wurde in Primärkulturen von CD34⁺ Zellen eine seltenere Integration von Konstrukten mit MAR-E μ -MAR beschrieben, als von Konstrukten ohne den Transkriptionsverstärker (Moreau et al. 2008). Der Unterschied zwischen den Konstrukten, die Häufigkeit der Transgenexpression betreffend, zieht sich sowohl bei den *in vitro*- als auch bei den *in vivo*-Experimenten durch die hier durchgeführten Experimente. Der Fokus dieser Arbeit lag nicht auf einer Analyse der Häufigkeit der Transgenexpression, sondern auf der Analyse der Fluoreszenzintensität der transgenexprimierenden Zellen, welche trotz möglicher Unterschiede in der Anzahl eGFP-exprimierender Zellen objektiv verglichen werden konnte.

Zuerst wurde die B-Zelllinie JY und als Kontrolle die Epithelzelllinie HeLa mit respektivem Virusüberstand aus den vier oben beschriebenen Vektoren transduziert. Während die beiden Vektoren mit 1000 bp-Promoterfragment (CD19-1000) spezifisch zur Transgenexpression nur in der B-Zelllinie führten, war nach Transduktion mit den Vektoren mit 200 bp-Promoterfragment (CD19-200) sowohl in JY- als auch in HeLa-Zellen deutliche eGFP-Expression zu sehen. Moreau et al. zeigten 2004 mit lentiviralen Vektoren und einem vergleichbaren 230 bp-Promoterfragment nahezu keine unspezifische Transgenexpression in epithelialen Zelllinien. Mit einem längeren Fragment des CD19-Promoters entsprach die geringe unspezifische Transgenexpression bei deutlicher Expression in der B-Zelllinie bei Moreau et al. den Ergebnissen in

dieser Arbeit. Die unterschiedlichen Ergebnisse mit dem 200 bp-Fragment könnten in den unterschiedlichen Integrationsstellen in das Genom bei retro- und lentiviralen Vektoren begründet sein. Die bevorzugte Integration des Maus-Leukämievirus (MLV), aus dem die hier verwendeten Vektoren kreiert wurden, erfolgt in offenem Chromatin, während das HI-Virus, auf welchem die meisten lentiviralen Vektoren basieren, vor allem in aktiven Transkriptionseinheiten bzw. nahe von transkriptionellen Start-Loci integriert (Lewinski et al. 2006, Mitchell et al. 2004, Schröder et al. 2002). Die Unterschiede zwischen MLV und HIV bezüglich des Integrationslocus in das Genom wurden auch in HeLa-Zellen bestätigt (Wu et al. 2003), so dass die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der unspezifischen Transgenexpression in HeLa-Zellen zwischen den veröffentlichten Studien (Moreau et al. 2004) und der vorliegenden Arbeit möglicherweise auf Unterschiede im Integrationslocus zwischen gamma-retroviralen und lentiviralen Vektoren zurückzuführen sind.

Weder in HeLa- noch in JY-Zellen beeinflusste der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR die MFI des eGFP. Dies entspricht für HeLa-Zellen der bekannten Datenlage und auch der Erwartung an den B-zellspezifischen Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR. In der Literatur ist für bestimmte B-Zelllinien eine Zunahme der MFI durch MAR-E μ -MAR beschrieben, während der Transkriptionsverstärker in anderen B-Zelllinien keinen Einfluss zeigte (Lutzko et al. 2003). Dieser variable Einfluss des Transkriptionsverstärkers MAR-E μ -MAR korreliert mit dem Niveau der physiologischen Expression des Gens der schweren Immunglobulinkette, welche durch E μ reguliert wird. Für JY-Zellen liegen bezüglich der physiologischen Expression des Gens der schweren Immunglobulinkette keine Daten vor; möglicherweise ist das Ausbleiben der Transkriptionsverstärkung durch MAR-E μ -MAR auf geringe oder fehlende endogene Expression der schweren Kette der Immunglobuline zurückzuführen. Immortalisierte Zelllinien, wie sie in diesem Versuch gezeigt werden, weisen oft große Unterschiede zu primären Zellen auf und sind weniger geeignet, Schlüsse auf die tatsächliche Situation *in vivo* zu ziehen. Um näher an die *in vivo*-Situation zu gelangen, wurden Primärkulturen aus murinen B-Zellen angelegt.

Primäre B-Zellen sind naturgemäß schwierig zu kultivieren, für eine Transduktion mit retroviralen Vektoren ist zudem eine Expansion der Zellen notwendig, da Retroviren nur während der Zellteilung in das Genom integrieren können (Naldini et al. 1996, Uchida et al. 1998). Eine erfolgreiche Kultur mit Zellteilung wurde durch Anti-CD40 und IL-4 erreicht. Unter diesen Bedingungen gelang die Transduktion der primären B-Zellen mit respektivem Virusüberstand. Die Transgenexpression erfolgte nur in einem geringen Prozentsatz der transduzierten B-Zellen. Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR steigerte in Zusammenhang mit beiden Promoterfragmenten (CD19-1000 und CD19-200) die MFI der eGFP⁺ Zellen signifikant. Lutzko et al. zeigten 2003 ebenfalls eine signifikante Steigerung der MFI in einer Primärkultur humaner B-Zellen aus CD34⁺ Vorläuferzellen mit lentiviralen Vektoren, während in myeloiden Zellen keine Zunahme der MFI zu sehen war. Anhand der Transduktion muriner B-Zellen in einer Primärkultur wurde in dieser Arbeit die signifikante Transkriptionsverstärkung durch MAR-E μ -MAR gezeigt. Die Zellspezifität konnte in diesem Versuch nicht überprüft werden, da ausschließlich B-Zellen transduziert wurden.

5.2 *In vivo*-Analyse

Ziel der gentechnischen Veränderung des Genoms ist es, diese Methode therapeutisch bei Menschen mit Gendefekten nutzen zu können. Um zu sehen, welche Auswirkungen der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR im Zusammenhang mit dem 200 bp- und dem 1000 bp-Promoterfragment *in vivo* auf die Transgenexpression hat, wurden murine Knochenmarkschimären generiert. Die HSPC wurden vor Transplantation in die Empfängermause ein- bzw. dreimal mit respektivem Virusüberstand aus den vier Konstrukten transduziert. Nach Rekonstitution des hämatopoetischen Systems wurden die Immunzellen aus den lymphatischen Organen der Knochenmarkschimären durchflusszytometrisch untersucht und bezüglich der Transgenexpression verglichen. Ziel war es, eine B-zellspezifische Expression des Transgens eGFP zu erreichen. Aus diesem

Grund wurden die B-Zellen anhand des Oberflächenmarkers CD19 identifiziert und insbesondere auf die Transgenexpression hin analysiert.

In der Milz und den Lymphknoten waren nach Einmaltransduktion der HSPC vor Transplantation bei allen vier Konstrukten deutliche Populationen eGFP exprimierender B-Zellen zu sehen. Während bei den Konstrukten mit 1000 bp-Promoterfragment kaum unspezifische Transgenexpression in Nicht-B-Zellen zu erkennen war, exprimierten bei CD19-200 und CD19-200-E auch Nicht-B-Zellen das Transgen eGFP. Das 200 bp-Promoterfragment wurde bereits *in vitro* in Primärkulturen von CD34⁺ Zellen als relativ unspezifisch beschrieben (Moreau et al. 2004) und führte *in vitro* in Zelllinien in der vorliegenden Arbeit zu unspezifischer Transgenexpression in HeLa-Zellen.

Die MFI wird in den Immunzellen der Knochenmarkschimären ausschließlich in B-Zellen, nicht aber in Nicht-B-Zellen durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR gesteigert, d.h. die Transkriptionsverstärkung funktioniert sowohl in Zusammenhang mit CD19-200 als auch mit CD19-1000 B-zellspezifisch. Bereits veröffentlichte Daten zeigen eine promoterabhängige Aktivität des Transkriptionsverstärkers MAR-E μ -MAR, der nicht in Zusammenhang mit jedem Promoter Einfluss auf die Transkriptionsregulation hatte (Lutzko et al. 2003), aber bereits in lentiviralen Vektoren in Zusammenhang mit einem 1274 bp-Fragment des CD19-Promoters *in vivo* zur zelllinienspezifischen Steigerung der MFI geführt hat (Moreau et al. 2008). Die Möglichkeit, dass die MFI durch mehrfache Integration von Proviruskopien pro Zelle gesteigert wird und nicht durch Regulation der Transkriptionsaktivität scheint sehr unwahrscheinlich, da die Konstrukte mit MAR-E μ -MAR (CD19-1000-E und CD19-200-E), bei welchen die MFI auf signifikant höherem Niveau liegt, gleichzeitig die Konstrukte sind mit geringerer Frequenz von Transgenexpression. Es ist also zu vermuten, dass der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR das Fluoreszenzniveau durch Regulation der Transkription des Transgens eGFP zelllinienspezifisch steigert, wie auch von Lutzko et al. 2003 und von Moreau et al. 2008 beschrieben.

Im Knochenmark wurde die Transgenexpression in verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung analysiert. Bei beiden Promoterfragmenten zeigte sich kaum

unspezifische Expression in Nicht-B-Zellen, während von den Pro-B-Zellen bis zu reifen B-Zellen eine Transgenexpression zu sehen ist, entsprechend der kontinuierlichen endogenen Expression des Oberflächenmarkers CD19, welcher physiologisch von der frühen Vorläuferzelle an in allen B-Zellstadien bis zur reifen B-Zelle exprimiert wird. Es kommt zum Verlust der CD19-Expression in den terminalen differenzierten Plasmazellen (Kozmik et al. 1992). Werner et al. zeigten mit dem CD19-1000-Promoterfragment im retroviralen Vektor eine uniforme Transgenexpression in allen Entwicklungsstadien, während Studien mit transgenen Mäusen eine Zunahme der Expression des humanen CD19 Gens während der B-Zellentwicklung detektierten (Sato et al. 1997). Dem entspräche die Zunahme der Transgenexpression im Verlaufe der B-Zellentwicklung in dieser Arbeit.

Die MFI in den eGFP⁺ B-Zellen und B-Zell-Vorläufern wird in allen analysierten Entwicklungsstadien durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR signifikant gesteigert. Die physiologische Expression der μ -schweren Kette der Immunglobuline, welche durch MAR-E μ -MAR reguliert wird, wird im Verlauf der B-Zellentwicklung erstmals in Prä-B-Zellen im Zytoplasma und in unreifen B-Zellen auf der Zelloberfläche gesehen und spielt eine wichtige Rolle in der B-Zellentwicklung (Melchers et al. 1995, Lutzko et al. 2003). Diese frühe endogene Expression des μ -Gens der schweren Immunglobulinkette könnte die konstante Steigerung der MFI durch MAR-E μ -MAR in den Entwicklungsstadien der B-Zelle erklären.

Aufgrund der insgesamt relativ geringen Transgenexpression wurden in folgenden Versuchen die HSPC vor Transplantation in die Chimären dreifach mit demselben Virusüberstand transduziert. Das 200 bp-Fragment stellte sich bereits nach einfacher Transduktion als relativ unspezifisch heraus, so dass die Dreifachtransduktion nur mit den Konstrukten CD19-1000 und CD19-1000-E durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen nahm die Frequenz der Transgenexpression in B-Zellen, aber auch in Nicht-B-Zellen deutlich zu. Die B-Zellspezifität der Vektoren nahm durch Mehrfachtransduktion ab, was der bekannten Datenlage entspricht (Werner et al. 2004). Das Konstrukt CD19-1000-E

mit Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR wurde durch die Mehrfachtransduktion im Vergleich unspezifischer als das Konstrukt CD19-1000 ohne Transkriptionsverstärker, was möglicherweise an der Integration mehrerer Proviruskopien pro Zelle liegen könnte. Die erschwerte Integration des größeren Plasmids mit Transkriptionsverstärker könnte durch Mehrfachtransduktion ausgeglichen werden.

Der Einfluss des Transkriptionsverstärkers MAR-E μ -MAR auf die MFI blieb trotz unspezifischer eGFP-Expression in Nicht-B-Zellen auf die eGFP⁺ B-Zellen beschränkt. Die MFI in den eGFP⁺ Nicht-B-Zellen blieb durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR unbeeinflusst, dieser blieb also trotz Mehrfachtransduktion und unspezifischer Transgenexpression B-zellspezifisch. Die MFI nahm durch dreimalige Transduktion im Vergleich zu einmaliger Transduktion bei beiden Konstrukten in eGFP⁺ B-Zellen signifikant zu, was ebenfalls an der Integration mehrerer Proviruskopien pro eGFP⁺ B-Zelle liegen könnte. Die MFI bei Konstrukt CD19-1000-E ist hierbei sowohl nach Einfach- als auch nach Dreifachtransduktion jeweils um etwa das Vierfache höher als bei Konstrukt CD19-1000, was eine B-zelliniensspezifische Transkriptionsverstärkung durch MAR-E μ -MAR in beiden Versuchen zeigt. Da durch Mehrfachtransduktion die unspezifische Transgenexpression zunimmt, scheint dies keine sinnvolle Möglichkeit, die zelliniensspezifische Expression zu steigern. Die Nicht-B-Zellen, welche das Transgen unspezifisch exprimieren wurden nach Einfachtransduktion im Thymus und nach Mehrfachtransduktion in der Milz jeweils überwiegend als T-Zellen identifiziert. Im Thymus stellten sich die eGFP⁺ Nicht-B-Zellen überwiegend als CD4⁺CD8⁺ Thymozyten dar, entsprechend der physiologischen Verteilung der T-Zell-Vorläufer im Thymus. Dies könnte auf fehlende Spezifität der CD4⁺CD8⁺ Thymozyten zurückzuführen sein, da T-Zellen zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung CD19 exprimieren und eine spezifische Promoteraktivität der CD19-Promoterfragmente auszuschließen ist. Bei der Analyse der Immunzellen der Milz bestätigte sich eine persistierende unspezifische Transgenexpression in den reifen T-Zellen. Die MFI in den eGFP⁺

T-Zellen wird durch den Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR jeweils nicht beeinflusst, dieser bleibt B-zelllinienspezifisch.

In einem weiten Spektrum von verschiedenartigen Erkrankungen wird große Hoffnung auf die klinische Gentherapie gesetzt. Hierzu zählen primäre Immundefizienzen (Fischer 2000), hämatopoetische Defekte (Grande et al. 1999, Liu et al. 1994) und Autoimmunerkrankungen (Steinmann 2004, Chan et al. 2008) ebenso wie Krebserkrankungen (Liu et al. 2006, Kershaw et al. 2005). Bislang sind retrovirale Vektoren (inklusive lentivirale Vektoren) die beste Möglichkeit für eine stabile und effiziente Transgeninsertion (Werner et al. 2004, Sinn et al. 2005). Der Nutzen von Retroviren wird unter anderem durch die Sensitivität für Inaktivierung, die Tatsache, dass nur proliferierende Zellen transduziert werden können und durch niedrige Titer limitiert (Mulligan 1993, Crystal 1995, Kay et al. 2001). Ein Beispiel für erfolgreiche klinische Anwendung von Gentherapie ist die X-chromosomale SCID, bei der es gelang, das defekte Gen in der γ c-Kette des IL-2 Rezeptors mittels retroviraler Vektoren *ex vivo* in autologe Vorläuferzellen einzubringen und den Patienten ein normales Leben zu ermöglichen (Hacein-Bey-Abina et al. 2002). Eine andere Form der SCID, welche auf Adenosindeaminase-Defizienz zurückzuführen ist, konnte ebenfalls klinisch erfolgreich durch Gentherapie von HSPC behandelt werden (Aiuti et al. 2002). Neben erfolgreichen klinischen Anwendungen zeigten sich in der Vergangenheit auch gravierende, teils lebensbedrohliche unerwünschte Auswirkungen durch gentherapeutisch veränderte Zellen, welche noch nicht vollständig verstanden sind, so dass das Verhältnis zwischen therapeutischem Nutzen und Risiko schwer einzuschätzen ist (Anderson 2000, Baum 2003). Es kam nach Gentherapie der SCID mittels retroviraler Vektoren zu unerwarteter, prämaligener Proliferation von T-Zellen bis hin zur Leukämie, deren Ursache man in einer Provirusintegration in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Promoter des Protoonkogens LMO2 vermutet (Hacein-Bey-Abina 2003 und 2008). Das genotoxische, onkogene Potential retroviraler Vektoren wurde auch im Mausmodell mehrfach bestätigt (Montini et al. 2006, Li et al. 2002). Fokus der

Entwicklung gentherapeutisch einsetzbarer viraler Vektoren ist eine Zunahme der biologischen Sicherheit. Ansätze zur erhöhten Sicherheit liegen z.B. in der Modifizierung der Spezifität der Integrationsstelle und einer Vektorkomposition mit reduziertem Risiko einer Aktivierung zellulärer Gene sowie in der Festlegung einer Dosierung der Viren (Baum et al. 2003, Kay et al. 2001, Sinn et al. 2005). Eine Möglichkeit, Nebenwirkungen im Organismus zu vermeiden, ist die gewebe- oder zellspezifische Transgenexpression z.B. durch spezifische Transkriptionsregulation.

Es wurden bereits erfolgreich zellspezifische Vektoren für Dendritische Zellen (Dresch et al. 2008) und für Erythrozyten (Grande et al. 1999) entwickelt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, einen retroviralen Vektor für gezielte, regulierte Transgenexpression und Expressionsverstärkung in B-Zellen zu kreieren. Diese Vektoren könnten in Zukunft geeignet sein, genetische Defekte speziell in B-Zellen, durch Einbringen genetischen Materials zu therapieren. Hierzu zählen insbesondere primäre Immundefizienzen. Die Induktion peripherer Toleranz in T-Zellen durch Antigenpräsentation von B-Zellen könnte zudem zu therapeutischem Nutzen B-zellspezifischer Transgenexpression bei Autoimmunerkrankungen führen (Raimondi et al. 2006, Werner-Klein et al. 2007).

Während das 200 bp-Promoterfragment sich als relativ unspezifisch herausstellte, zeigte das 1000 bp-Fragment (CD19-1000 und CD19-1000-E) weitgehend B-zelllinienspezifische Transgenexpression, so lange die Transduktion der HSPC vor Transplantation nicht mehrfach durchgeführt wurde. Der Transkriptionsverstärker MAR-E μ -MAR beeinflusste das Transkriptionsniveau des Transgens eGFP nicht in Zelllinien, aber in primären B-Zellkulturen *in vitro* und in Knochenmarkschimären *in vivo* B-zellspezifisch. Mit diesen Vektoren, CD19-1000 (Werner et al. 2004) und CD19-1000-E, der zu B-zellspezifisch verstärkter Transgenexpression führt, wurden vielversprechende Konstrukte für die gentherapeutische Korrektur von B-Zelldefekten geschaffen, welche hoffentlich durch ihre Zelllinienspezifität die Sicherheit der Gentherapie steigern können und unerwünschte Überexpression des Transgens in anderen Zelllinien zu vermeiden helfen.

5.3 Ausblick

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte B-zellspezifische retrovirale Vektor CD19-1000-E könnte in Zukunft ein wichtiges Werkzeug für die Weiterentwicklung der Gentherapie sein. Aufgrund der ambivalenten Erfahrungen bezüglich gravierender Nebenwirkungen mit gentherapeutischen Versuchen in den vergangenen Jahren (Anderson 2000, Baum 2003) sollte in Zukunft die weitere Entwicklung biologischer Sicherheit bei viralen Vektoren im Mittelpunkt stehen. Wie sich in dieser Arbeit gezeigt hat, besteht trotz zellspezifischem Promoter und Transkriptionsverstärker noch unspezifische Hintergrundexpression, die zu unterdrücken sich als sehr schwierig herausstellte. Möglicherweise finden sich in Zukunft neue Regulationssequenzen für die Transkription, welche eine noch gezieltere Transgenexpression zulassen. Lentivirale Vektoren haben sich mittlerweile als den gammaretroviralen Vektoren in vielerlei Hinsicht überlegen herausgestellt, so dass zukünftige gentherapeutische Ansätze vermutlich eher mit lentiviralen Vektoren durchgeführt werden. Einer der Vorteile von lentiviralen gegenüber retroviralen Vektoren ist, dass erstere auch ruhende Zellen infizieren können, während gammaretrovirale Vektoren nur während der Zellteilung in das Genom der Wirtszelle integrieren können (Naldini et al. 1996, Uchida et al. 1998). Lentivirale Vektoren sind zudem in der Lage, größere Transgensequenzen zu transportieren als andere retrovirale Vektoren, so dass komplexere Regulationskassetten in den Vektor integriert werden können (Logan et al. 2002). Während retrovirale Vektoren wiederholt onkogenes Potential durch insertionale Mutagenese gezeigt haben, wurde für lentivirale Vektoren trotz stärker ausgeprägter Insertion in das Genom und stabiler Expression bislang kein Einfluss auf die Tumorgenese festgestellt, so dass die Hoffnung größerer biologischer Sicherheit auf lentiviralen Vektoren liegt (Hematti et al. 2004, Montini et al. 2006). CD19-Promoterfragmente wurden bereits als zelllinienspezifische Transkriptionsregulatoren erfolgreich in lentiviralen Vektoren eingesetzt (Moreau et al. 2004 und 2008). Lentivirale Vektoren führten zu effizienter Transduktion humaner

HSPC (Woods et al. 2001) und wurden bereits in vielversprechenden ersten klinischen Versuchen z.B. bei HIV- und Thalassämie-Patienten eingesetzt (Levine et al. 2006, Bank et al. 2005), Langzeitergebnisse bleiben abzuwarten. Der nächste Schritt im Hinblick auf den therapeutischen Nutzen des Vektors wäre, das Reportergen eGFP durch ein Gen zu ersetzen, welches zukünftig als Transgen in der Klinik für die Therapie von B-Zelldefekten genutzt werden könnte, wie z.B. Bruton's Tyrosinkinase (BTK) zur Therapie der X-chromosomalen Agammaglobulinämie. Erste Versuche, mit einem vergleichbaren, lentiviralen Konstrukt die Expression von BTK zu erreichen, gelangen in humanen CD34⁺ Zellkulturen jedoch mit wenig präziser Steuerung der zellspezifischen Transgenexpression (Moreau et al. 2008). Eine weitere Herausforderung zeigt sich also in der Steuerung der Transgenexpression in humanen Zellen, welche möglicherweise neue Probleme aufwerfen wird im Vergleich zu murinen Zellen. Insbesondere bei Erkrankungen wie z.B. der X-chromosomalen Agammaglobulinämie, für welche alternative therapeutische Möglichkeiten wie die intravenöse Substitution von Immunglobulinen zur Verfügung stehen, sollte das Verhältnis zwischen Risiko und Nutzen der Gentherapie weiter verbessert werden, ehe sie für eine klinische Erprobung in Erwägung gezogen werden kann. Erste Schritte dahin sind z.B. durch Vektoren, wie sie in dieser Arbeit entwickelt wurden, getan.

6 Literaturverzeichnis

Aiuti A, Shimon Slavin, Memet Aker et al. "Correction of ADA-SCID by Stem Cell Gene Therapy Combined with Nonmyeloablative Conditioning". *Science* 2002; 296: 2410-2413.

Allen GC, Spiker S, Thompson WF. "Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing". *Plant Molecular Biology* 2000; 43: 361-376.

Anderson WF. "Gene Therapy: The Best of Times the Worst of Times". *Science* 2000; 288: 627-629.

Bank A, Dorazio R, Leboulch P. "A phase I/II clinical trial of beta-globin therapy for beta-thalassemia". *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1054: 308-316.

Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. "The role of complement in inflammation and adaptive immunity". *Immunological Reviews* 2001; 180: 5-15.

Baum C, Düllmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williamson DA, von Kale C. "Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells". *Blood* 2003; 6: 2099-2113.

Bennett SR, Carbone FR, Toy T, Miller JF, Heath WR. "B cells directly tolerize CD8⁺ T cells". *Journal of Experimental Medicine* 1998; 188: 1977-1983.

Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al. "T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years". *Science* 1995; 270: 475-480.

Boehm T, Bleul CC. "The evolutionary history of lymphoid organs". *Nature Immunology* 2007; 8(2): 131-135.

Bonilla FA, Geha RS. "Update to primary immunodeficiency diseases". *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 117(2): 435-441.

Buchsacher GL Jr. "Introduction to Retroviruses and Retroviral Vectors". *Somatic Cell and Molecular Genetics* 2001; 26(1-6): 1-11.

Buckley RH. "The multiple causes of human SCID". *The Journal of Clinical Investigation* 2004; 114(10): 1409-1411.

Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, Hacein-Bey-Abina S, Alain Fischer. "Gene Therapy for Severe Combined Immunodeficiency". *Annual Reviews of Medicine* 2005; 56: 585-602.

Chan J, Jun Ban E, Hao Chun K, Wang S, Bäckström BT, Bernard CCA, Toh BH, Alderuccio F. "Transplantation of Bone Marrow Transduced to Express Self-Antigen Establishes Deletional Tolerance and Permanently Remits Autoimmune Disease". *The Journal of Immunology* 2008; 181: 7571-7580.

Cockerill PN, Yuen MH, Garrard WT. "The Enhancer of the Immunoglobulin Heavy Chain Locus Is Flanked by Presumptive Chromosomal Loop Anchorage Elements". *The Journal of Biological Chemistry* 1987; 262(11): 5394-5397.

Crystal RG. "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success". *Science* 1995; 270(5235): 404-410.

Desiderio S. "Role of Btk in B cell development and signaling". *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 534-540.

Doherty PC, Allan W, Eichelberger M, Carding SR. "Roles of Alphabeta and Gammadelta T cell subsets in viral Immunity". *Annual Reviews of Immunology* 1992; 10: 123-51.

Dresch C, Edelmann SL, Marconi P, Thomas Brocker. "Lentiviral-Mediated Transcriptional Targeting of Dendritic Cells for Induction of T Cell Tolerance In Vivo". *The Journal of Immunology* 2008; 181: 4495-4506.

Fischer A. "Gene Therapy of lymphoid primary immunodeficiencies". *Current Opinion in Pediatrics* 2000;12:557-562.

Fischer A. "Severe combined Immunodeficiencies". *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 122: 143-149.

Forrester WC, van Genderen C, Jenuwein T, Grosschedl R. "Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin μ gene on nuclear matrix attachment regions". *Science* 1994; 265: 1221-1225.

Fuchs EJ and Matzinger P. "B Cells Turn Off Virgin But Not Memory T Cells". *Science* 1992; 258:1156-1159.

Fujimoto M, Poe JC, Inaoki M, Tedder TF. "CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals". *Seminars in Immunology* 1998; 10(4): 267-277.

Geuze HJ. "The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning". *Immunology today* 1998; 19(6): 282-7.

Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG, Melchers F. "B-cell development: a comparison between mouse and man". *Immunology Today* 1998; 19(10): 480-485.

Gisler R, Akerblad P, Sigvardsson M. "A human B-cell factor-like protein participates in the regulation of the human CD19 promoter". *Molecular Immunology* 1999; 36(15-16): 1067-1077.

Goverman J, Perchet A and Huseby ES. "The role of CD8⁺ T cells in multiple sclerosis and its animal models". *Current Drug Targets Inflamm. Allergy* 2005; 4: 239-244.

Grande A, Piovani B, Aiuti A, Ottolenghi S, Mavilio F and Ferrari G. "Transcriptional Targeting of Retroviral Vectors to the Erythroblastic Progeny of Transduced Hematopoietic Stem Cells". *Blood* 1999; 93(10): 3276-3285.

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Fischer A, Cavazzana-Calvo M et al. "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1". *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118(9): 3132-3142.

Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Trasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. "Sustained correction of x-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy". *The New England Journal of Medicine* 2002; 246(16): 1185-1193.

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, Cavazzana-Calvo M et al. "LMO2-Associated Clonal T-cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1". *Science* 2003; 302: 415-419.

Hanahan D. "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Journal of Molecular Biology* 1983; 166(4): 557-580.

Hardy R, Hayakawa K. "B cell development pathways". *Annual Reviews of Immunology* 2001; 19: 595-621.

Hardy R, Li YS, Allman D, Asano M, Gui M, Hayakawa K. "B-cell commitment, development and selection". *Immunological Reviews* 2000; 175: 23-32.

Hayday AC and Pennington D. "Key factors in the organized chaos of early T cell development". *Nature Immunology* 2007; 8(2): 137-144.

Hematti P, Hong BK, Ferguson C, Adler R et al. "Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells". *PLoS Biology* 2004; 2(12): e423.

Inaoki M, Sato S, Weintraub BC, Goodnow CC, Tedder TF. "CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes". *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186: 1923-1931.

Janeway CA, Travers P. "Immunologie". Spektrum Akademischer Verlag 1997; Kapitel 1 „ Grundbegriffe der Immunologie“ S.1 ff. und Kapitel 4 "Antigen-erkennung durch T-Lymphocyten" S. 125 ff.

Jenuwein T, Forrester WC, Fernandez-Herrero LA, Laible G, Dull M, Grosschedl R. "Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions". *Nature* 1997; 385: 269-272.

Joachims ML, Chain JL, Hooker SW, Knott-Craig CJ, Linda Thompson. "Human Alphabeta and Gammadelta Thymocyte Development: TCR Gene Rearrangements, Intracellular TCRbeta Expression, and Gammadelta Development Potential – Differences between Men and Mice". *The Journal of Immunology* 2006; 1543 – 1552.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles for therapeutics". *Nature Medicine* 2001; 7(1): 33-40.

Kershaw MH, Teng MW, Smyth MJ, Darcy PK. "Supernatural T cells: genetic modification of T cells for cancer therapy". *Nature Reviews Immunology* 2005; 5(12): 928-40.

Khan WN. "Regulation of B lymphocyte development and activation by Bruton's tyrosine kinase". *Immunol. Research* 2001; 23: 269-272.

Kleindienst P, Chretien I, Winkler T and Brocker T. "Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo". *Blood* 2000; 95(8): 2610-2616.

Kozmik Z, Wang S, Dörfler P, Adams B, Busslinger M. "The Promoter of the CD19 Gene Is a Target for the B-Cell-Specific Transcription Factor BSAP". *Molecular and Cellular Biology* 1992; 2662-2672.

Kunkel EJ, Butcher EC. "Plasma-cell homing". *Nature Reviews Immunology* 2003; 3, 822-829.

Le NT, Chao N. "Regulating regulatory T cells". *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39, 1-9.

Levine BL, Humeau LM, Boyer J et al. "Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006 ; 103(46) : 17372-7.

Lewinski MK, Yamashita M, Ememann M, Ciuffi A, Marshall H et al. "Retroviral DNA Integration: Viral and Cellular Determinants of Target Site Selection". *PLoS Pathogens* 2006; 2(6): e60.

Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B et al. "Murine leukemia induced by retroviral gene marking". *Science* 2002; 296: 497.

Li Z, Modlich U, Baum C. "Safety and efficacy in retrovirally modified haematopoietic cell therapy". *Best Practice and Research Clinical Haematology* 2004; 17(3): 493-503.

Liblau RS, Wong FS, Mars LT, Santamaria P. "Autoreactive CD 8 T cells in organ-specific autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention". *Immunity* 2002; 17:1-6.

Liu JM, Buchwald M, Walsh CE, Young NS. "Fanconi anemia and novel strategies for therapy". *Blood* 1994; 84: 3995-4007.

Liu Y, Deisseroth A. "Tumor vascular targeting therapy with viral vectors". *Blood* 2006; 107(8) : 3027-3033.

Logan AC, Lutzko C, Kohn DB. "Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells". *Current Opinion in Biotechnology* 2002;13(5): 429-36.

Lutzko C, Senadheera D, Skelton D, Petersen D, Kohn DB. "Lentivirus Vectors Incorporating the Immunoglobulin Heavy Chain Enhancer and Matrix Attachment Regions Provide Position-Independent Expression in B Lymphocytes". *Journal of Virology* 2003; 77(13): 7341-7351.

McHeyzer-Williams LJ, Malherbe LP, McHeyzer-Williams MG. "Helper T cell-regulated B-cell immunity". *Microbiological Immunology* 2006; 311: 59-83.

McHeyzer-Williams MG, McHeyzer-Williams LJ, Fanelli Panus J, Bikah G, Pogue-Caley RR, Driver DJ, Eisenbraun MD. "Antigen-specific immunity. Th cell-dependent B cell responses". *Immunology Research* 2000; 22(2-3): 223-236.

Mebius RE, Kraal G. "Structure and Function of the spleen". *Nature publishing group* 2005; 5: 606-616.

Melchers F, ten Boekel E, Seidl T, Chu Kong X, Yamagami T, Onishi K, Shimizu T, Rolink AG, Andersson J. "Repertoire Selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B-cells". *Immunological Reviews* 2000; 175: 33-46.

Melchers F, Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Ghia P, Andersson J. "Positive and negative selection events during B lymphopoiesis". *Current Opinion in Immunology* 1995; 7: 214-227.

Mitchell RS, Beitzel BF, Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD. "Retroviral DNA Integration: ASLV, HIV and MLV show Distinct Target Site Preferences". *PloS Biology* 2004; 2(8): e234.

Modrow S, Falke D. "Molekulare Virologie". 1998; 1. Korrigierter Nachdruck, Spektrum Akademischer Verlag.

Montini E, Cesana D, Schmidt M et al. "Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration". *Nature Biotechnology* 2006; 24(6): 687-696.

Moreau T, Bardin F, Imbert J, Carbannin C, Tonnelle C. "Restriction of Transgene Expression to the B-Lymphoid Progeny of Human Lentivirally Transduced CD34⁺ Cells". *Molecular Therapy* 2004; 10(1): 45-56.

Moreau T, Barlogis V, Bardin F, Nunes JA, Calmels B, Chabannon C, Tonnelle C. "Development of an enhanced B-specific lentiviral vector expressing BTK: a tool for gene therapy of XLA". *Gene Therapy* 2008; 15(12): 942-952.

Mulligan, RC. "The basic science of gene therapy". *Science* 1993; 260: 926-932.

Murakami M, Tsubata T, Okamoto M, Shimizu A, Kumagai S, Imura H, Honjo T. "Antigen induced apoptotic death of Ly-1 B-cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice". *Nature* 1992; 357(6373): 77-80.

Naldini L, Blömer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector". *Science* 1996; 272: 263-267.

Neuberger MS, Patel KJ, Daravach P, Nelms K, Peaker CJ, Williams GT. "The mouse antigen receptor: definition and assembly of the core receptor of the five immunoglobulin isotypes". *Immunology Research* 1993; 132: 147-61.

Nienhuis AW. "Development of gene therapy for blood disorders". *Blood* 2008; 111: 4431-4444.

Notarangelo L, Casanova JL, Conley ME, Geha RS et al. "Primary Immunodeficiency Diseases: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005". (Workshop summary). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 117(4), 883-896.

Oancea AE, Berru M, Shulman MJ. "Expression of the (recombinant) endogenous immunoglobulin heavy-chain locus requires the intronic matrix attachment regions". *Mol. Cell Biology* 1997; 17: 2658-2668.

Odegard VH, Schatz DG. "Targeting of somatic hypermutation". *Nature Reviews. Immunology* 2006; 6(8): 573- 583.

Palú G, Parolin C, Takeuchi Y, Pizzato M. "Progress with retroviral gene vectors". *Reviews in Medical Virology* 2000; 10(3):185-202.

Pape KS, Merica R, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. "Direct evidence that functionally impaired CD4⁺ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance". *Journal of Immunology* 1998; 160(10): 4719-4729.

Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD et al. "The biochemistry of somatic hypermutation". *Annual Review of Immunology* 2008; 26: 481-511.

Pleiman CM, D'Ambrósio D, Cambier JC. "The B-cell antigen receptor complex: Structure and signal transduction". *Immunology today* 1994; 15(9): 393-399.

Raimondi G, Tanoni I, Citterio S et al. "Induction of Peripheral T Cell Tolerance by Antigen-Presenting B Cells. II. Chronic Antigen Presentation Overrides Antigen-Presenting B Cell Activation". *The Journal of Immunology* 2006; 176: 4021-4028.

Redmond WL, Hernandez J, Sherman LA. "Deletion of naive T cells requires persistent antigen and is not programmed by an initial signal from the tolerogenic APC". *Journal of Immunology* 2003; 171(12): 6349-6354.

Riva A, Wilson GL, Kehrl JH. "In Vivo Footprinting and Mutational Analysis of the Proximal CD19 Promoter Reveal Important Roles for an SP1/Egr-1 Binding Site and a Novel Site Termed the PyG Box". *The Journal of Immunology* 1997; 159: 1284-1292.

Robbins PD, Ghivizzani SC. "Viral Vectors for Gene Therapy". *Pharmacological Therapy* 1998; 80(1): 35-47.

Rolink AG, ten Boekel E, Yamagami T, Ceredig R, Andersson J, Melchers F. "B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells". *Immunology letters* 1999; 68: 89-93.

Rolink AG, Massa S, Balciunaite G, Ceredig R. "Early lymphocyte development in bone marrow and thymus". *Swiss Med weekly* 2006; 136: 679-683.

Rolink AG, Schaniel C, Andersson J, Melchers F. "Selection events operating at various stages in B cell development". *Current Opinion in Immunology* 2001; 13: 202-207.

Sato S, Steeber DA, Jansen PJ, Tedder TF. "CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19". *Journal of Immunology* 1997; 158(10): 4462-4469.

Schiebler TH. "Anatomie". Springer Verlag 2004, Kapitel 4 "Blut und Abwehrsystem" S.123 ff.

Schröder AR, Shinn P, Chen H, Ecker JR, Bushman F. "HIV-1 Integration in the human genome favors active genes and local hotspots". *Cell* 2002; 110(4): 521-529.

Sinn PL, Sauter SL, McCray PB Jr. "Gene Therapy Progress and Prospects: Development of improved lentiviral and retroviral vectors – design, biosafety, and production". *Gene Therapy* 2005; 12, 1089-98.

Sprent J, Kishimoto H. "The thymus and central tolerance". *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 2001; 356(1409): 609-616.

Steinmann L. "Immune Therapy for Autoimmune Diseases". *Science* 2004; 305: 212-216.

Tedder T, Inaoki M, Sato S. "The CD19-CD21 Complex Regulates Signal Transduction Thresholds Governing Humoral Immunity and Autoimmunity". *Immunity* 1997; 6: 107-110.

Uchida N, Sutton RE, Frieri AM, He D, Reitsma MJ, Chang WC, Veres G, Scollay R, Weissmann IL. "HIV, but not murine leukemia virus, mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(20): 11939-11944.

Wekerle T, Kurtz J, Bigenzahn S, Takeuchi Y, Sykes M. "Mechanisms of transplant tolerance induction using costimulatory blockade". *Current Opinion of Immunology* 2002; 14: 592-600.

Werner, M. "Untersuchungen zur Rolle von B-Zellen bei der Toleranzinduktion in CD8-T-Zellen *in vivo*". *Dissertation an der Ludwigs-Maximilian-Universität München* 2005.

Werner M, Kraunus J, Baum C, Brocker T. "B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element". *Gene Therapy* 2004; 11(12): 992-1000.

Werner-Klein M, Dresch C, Marconi P, Brocker T. "Transcriptional targeting of B Cells for Induction of Peripheral CD8 T Cell Tolerance". *The Journal of Immunology* 2007; 178: 7738-7746.

Woods NB, Mikkola H, Nilsson E, Olsson K, Trono D, Karlsson S. "Lentiviral-mediated gene transfer into haematopoietic stem cells". *Journal of Internal Medicine* 2001; 249: 339-343.

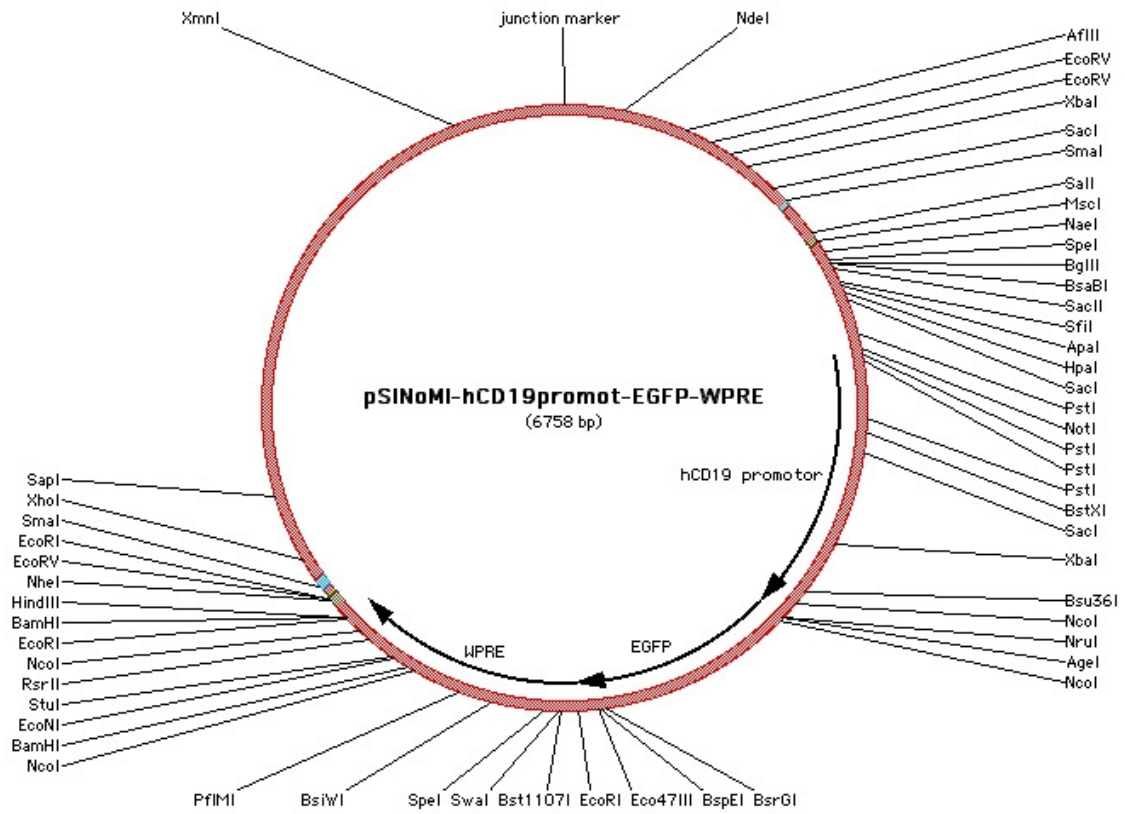
Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. "Transcription Start Regions in the Human Genome are Favored Targets for MLV Integration". *Science* 2003; 300: 1749-1751.

Zehn D, Bevan MJ. "T cells with low avidity for a tissue restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity." *Immunity* 2006; 25(2): 261-270.

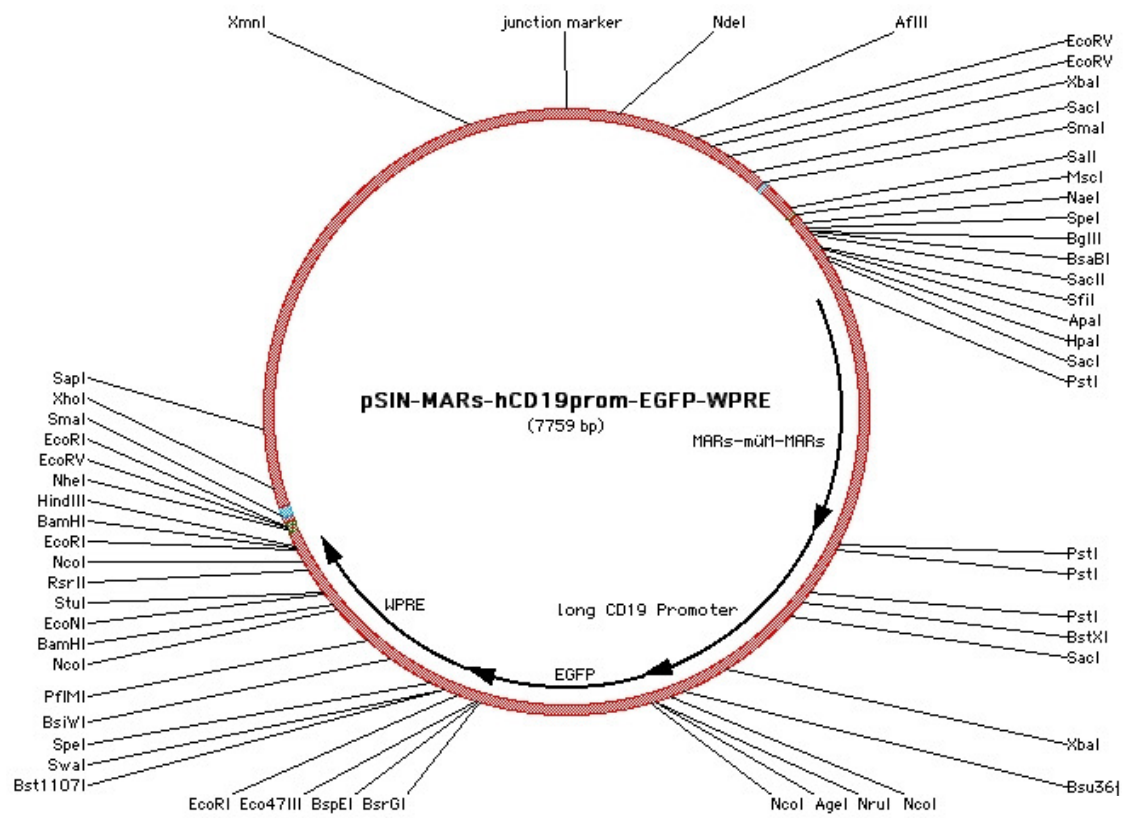
7 Anhang

7.1 Plasmidkarten

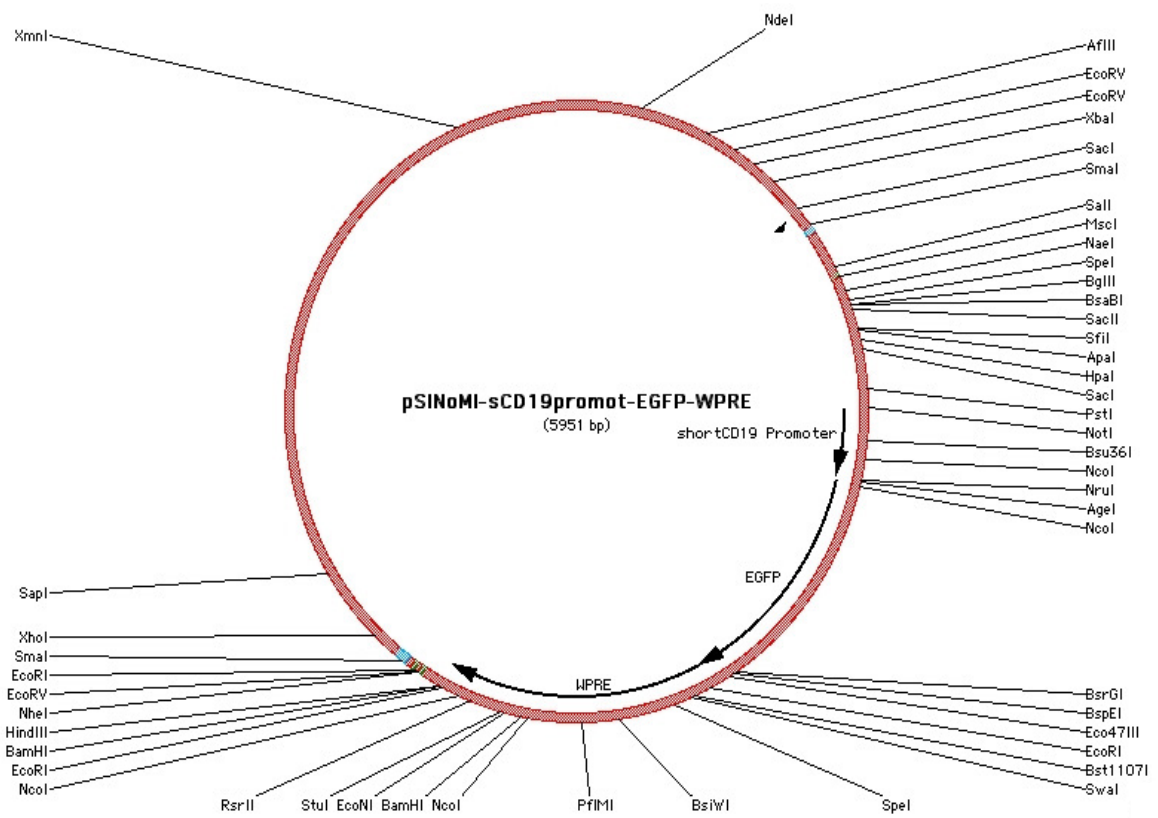
7.1.1 CD19-1000



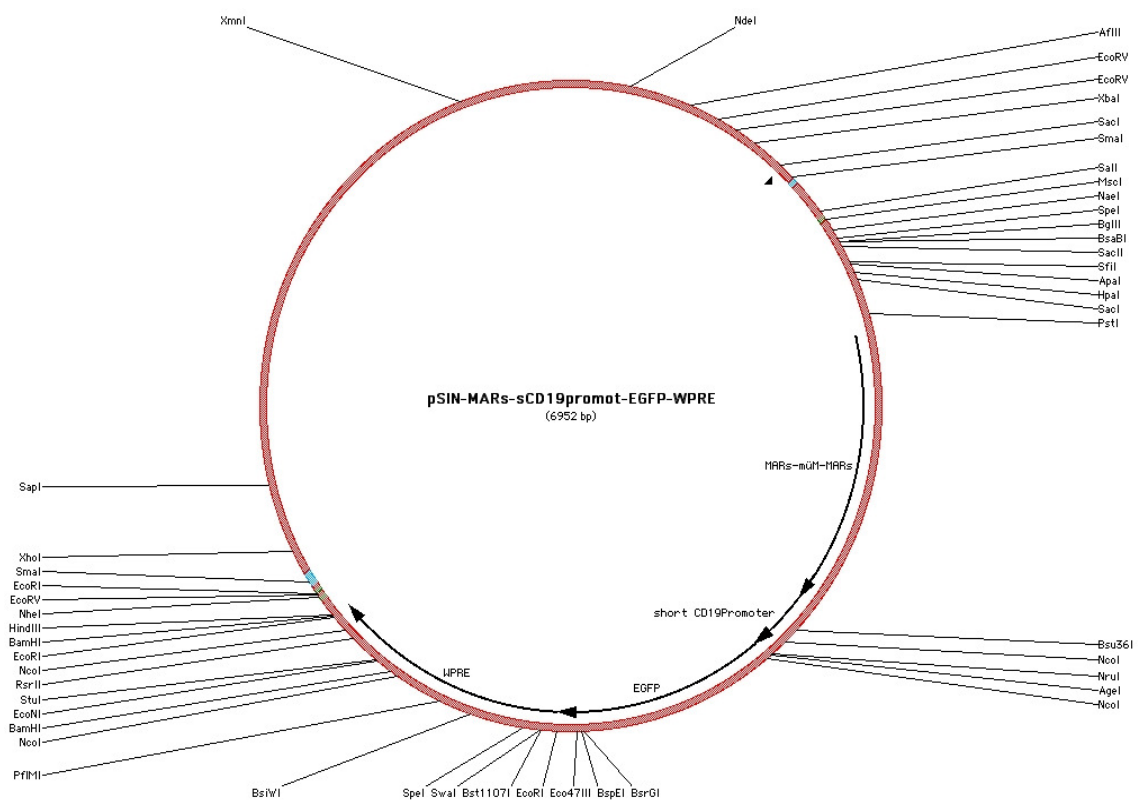
7.1.2 CD19-1000-E



7.1.3 CD19-200



7.1.4 CD19-200-E



7.2 Danksagung

Für große Geduld, für Verständnis und Ausdauer in den letzten vier Jahren danke ich **Professor Thomas Brocker**, der mir ermöglicht hat, meine Dissertation am Institut für Immunologie zu machen und der immer wieder für Fragen ein offenes Ohr hatte, der sich bereit erklärt hat, wiederholt Korrektur zu lesen, der neue Anregungen eingebracht und konstruktive Kritik geübt hat. Vielen Dank, dass immer wieder ein Computer für mich bereit stand.

Insbesondere und von ganzem Herzen möchte ich mich bei **Katrin Nopora** bedanken für unermüdliches Helfen, Antworten, Suchen, Erklären, Korrektur-Lesen, für viele gemeinsame Stunden, für ihren Humor und ihr Verständnis.

Meinen über die Jahre wechselnden **Kollegen am IfI** danke ich für unzählbare Antworten auf unzählbare Fragen, fürs Erklären und Zeigen zahlreicher Labormethoden, für große Toleranz und Unterstützung insbesondere meinen eigenartigen Arbeitsrhythmus betreffend. Vielen Dank, dass Ihr mir immer wieder ein Plätzchen frei geräumt habt. Ich danke **Melanie Werner-Klein** für die Idee zu meiner Doktorarbeit, für die erste Einführung ins Laborleben und in die Arbeitsmethoden sowie die Bereitstellung ihrer Protokolle; **Toni Kraxner** und **Christine Ried** fürs ausdauernde Helfen beim FACSen selbst kurz vor Heilig Abend; **Andrea Bol und Wolfgang Mertl** für die gute Betreuung der Versuchstiere; **Ursula Wolf, Frau Mair und Frau Kozar** für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Unterstützung bei den kleinen organisatorischen Problemen des Alltags und **allen Mitarbeitern der AG Brocker** für immer wieder Unterstützung, gute Laune, Zeit für ein Kännchen oder ein Bier und aufmunternde Worte.

Bei **meinen Eltern und meinen Geschwistern** bedanke ich mich dafür, dass es nie eine Rolle gespielt hat, was ich tue oder wie viel ich leiste. Danke, dass Ihr mich immer einfach so nehmt, wie ich bin; dass Ihr bedingungslos da seid und mich immer habt meinen eigenen Weg gehen lassen.

Ich danke **Thomas Jäger** für seine wertvolle Unterstützung am Computer und das ausdauernde Lesen dieser Arbeit; für sein Zuhören immer und immer wieder, wenn etwas schief ging; für zigtausend gefahrene Kilometer; für endloses Verständnis und Gut-Zureden und sein ausgleichendes Wesen.

7.3 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Romana Ida Friedrich
Wohnort: 79865 Grafenhausen
Geburtsdatum: 27.03.1980 in Titisee-Neustadt

BERUF

01/08-01/09 Assistenzärztin Kinderchirurgische Klinik Augsburg
04/09-09/09 Assistenzärztin Allgemeinmedizinische Praxis
Dr. G. Brecke, Bonndorf im Schwarzwald
Seit 10/09 Assistenzärztin Kinder- und Jugendpsychiatrischer
Dienst Graubünden, Chur, Schweiz

STUDIUM UND SCHULE

10/00 – 03/06 Universität Leipzig, Studium der Humanmedizin
10/03 – 03/04 Université Henri Poincaré, Nancy, Frankreich
ERASMUS, Studium der Humanmedizin
04/06 – 10/07 Technische Universität München,
Studium der Humanmedizin
1990 – 1999 Kolleg St. Blasien, humanistisches Gymnasium,
Abitur 1999

PROMOTION

02/05-03/10

Ludwigs-Maximilian-Universität München,
Institut für Immunologie
AG Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

FREIWILLIGENDIENST IM AUSLAND

1999 – 2000

Arbeit mit Straßenkindern, Casa del Niño,
El Augustino, Lima, Peru