Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Entwicklung von GM-CSF-produzierenden EBV-Vektoren für die Immuntherapie der B-CLL

von

Eva Hellebrand

München, April 2003

Eingereicht am	24. April 2003
1.Gutachter	Prof. Dr. Dirk Eick
2.Gutachter	PD Dr. Daniele Zink
Tag der mündlichen Prüfung	22. Juli 2003

1. Einleitung *6*

1.1. GM-CSF zur Gentherapie von Lymphomen **6**

1.2. Dendritische Zellen als Hauptmediatoren der Immunantwort **8**

1.2.1. Herkunft und Differenzierung der dendritischen Zellen 8

1.2.2. Funktionen der dendritischen Zellen 8

1.3. Therapeutische Möglichkeiten bei der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) **11**

1.4. Das Epstein-Barr Virus **13**

1.4.1. Latenz und lytische Phase von EBV 13

1.4.2. Wichtige Onkogene und Regulatoren von EBV 14

1.5. Genvektoren **15**

1.5.1. Verschiedene virale Vektoren **16**

1.5.2. EBV-Vektoren **18**

1.6. Aufgabenstellung **19**

2. Material *21*

2.1. Antikörper **21**

2.2. Bakterien **22**

2.3. Oligonukleotide **22**

2.4. Plasmide **23**

2.5. Zelllinien **24**

2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges **25**

3. Methoden *29*

3.1. Bakterienkultur **29**

3.1.1. Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien 29

3.1.2. Transformation und Elektroporation von *E. coli* 29

3.1.3. Fermentation von *E. coli* 30

3.2. Eukaryontische Zellkultur **31**

3.2.1. Zellkulturbedingungen 31

3.2.2. Aufbewahrung von Zellen 32

3.2.3. Präparation myelo-monozytärer Vorläuferzellen aus peripherem Blut und Reifung zu dendritischen Zellen 32

3.2.4. Kultivierung und Stimulierung spezifischer T-Zell-Klone 33
3.2.5. Präparation primärer B-Zellen 34
3.2.6. Stabile Transfektion von Zellen und Selektion der Zellklone mit Hygromycin 34
3.2.7. Transiente Transfektion von Zellen mit GM-CSF-Expressions-plasmiden und Blockierung des intrazellulären Transports durch Brefeldin A 35
3.2.8. Elektroporation eukaryontischer Zellen 35
3.2.9. Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerbestimmung 36
3.2.10. Konzentration von Viruspräparationen 36
3.2.11. Infektion von Raji-Zellen und primären B-Zellen mit Maxi-EBV-Vektoren zur Bestimmung der GM-CSF-Sekretion 37
3.2.12. Messung der MTT-Konversion einer GM-CSF-abhängigen Zelllinie 37

3.3. DNA-Arbeitstechniken 38
3.3.1. Rekombinante Plasmide 38
3.3.2. Extraktion zellulärer DNA aus eukaryontischen Zellen 41
3.3.3. Schnellaufreinigung von Plasmiden mit einer Größe von bis zu 30kb 41
3.3.4. Präparative Plasmidreinigung 41
3.3.5. Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus *E. coli* 42
3.3.6. Homologe Rekombination in *E. coli* zur Konstruktion von Maxi-EBV-Mutanten 42
3.3.7. Southern-Blot-Hybridisierung 43
3.3.8. Radioaktive Markierung von DNA 44
3.3.9. PCR-Analysen 44

3.4. Proteinnachweistechniken 45
3.4.1. Immunfluoreszenzanalysen 45
3.4.2. Durchflusszytometrie 45
3.4.3. Immunoblot-Analyse 46
3.4.4. GM-CSF-ELISA 47

4. Ergebnisse 49

4.1. Herstellung der rekombinanten EBV-Vektoren 50
4.1.1. Homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183 51
4.1.2. Homologe Rekombination in *E. coli* DH10B 52
4.1.3. ‚chromosomal building' 54
4.1.4. Etablierung der Dreifachdeletionsmutante als sicheren EBV-Genvektor 56

4.2. Einführung des Transgens GM-CSF in die EBV-Vektoren 57
4.2.1. Klonierung der Expressionskassetten mit GM-CSF unter der Kontrolle verschiedener Promotoren 57
4.2.2. Transfer der Expressionskassetten in die Dreifachdeletionsmutante 63

4.3. Herstellung von rekombinanten Viren 68

4.3.1. Etablierung stabiler Maxi-EBV-produzierender HEK293-Zelllinien 68
4.3.2. Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung des Virustiters 68
4.3.3. Herstellung konzentrierter Maxi-EBV-Präparationen 71

4.4. Transduktion verschiedener B-Lymphozyten mit den GM-CSF-Vektoren 72

4.4.1. Einfluss der (EBNA2, LMP1, BZLF1-) Deletionen auf die Infizierbarkeit von B-Lymphozyten 72
4.4.2. Transduktion von B-Zelllinien 73
4.4.3. Transduktion von B-CLL-Zellen 76

4.5. Biologische Wirkung des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF 81

4.5.1. Proliferation einer GM-CSF-abhängigen Zelllinie 81
4.5.2. Etablierung eines Reifungsprotokolls für DC aus monozytären Vorläufern mittels GM-CSF und IL-4 83
4.5.3. Gewinnung von GM-CSF-haltigen Überständen aus Raji-Infektionen 84
4.5.4. Reifung von DC aus monozytären Vorläufern des peripheren Bluts mit Hilfe des nach Gentransfer in B-Zellen sezernierten GM-CSF 86
4.5.3.1. Nachweis der DC-typischen Oberflächenmarker 86
4.5.3.2. Aktivierung spezifischer CD4-positiver T-Zell-Klone durch exogen beladene DC, die mit -nach Gentransfer sezerniertem- GM-CSF kultiviert wurden 88

5. Diskussion 94

5.1. Genvektoren auf der Basis von Maxi-EBVs 94

5.1.1. Sicherheitskriterien als entscheidende Parameter 94
5.1.2. Expression des Transgens 95

5.2. Transduktion von B-Zellen mit den Maxi-EBV-Genvektoren 97

5.3. Funktionen des GM-CSF 99

5.4. Hypothese zur Wirkung des GM-CSF im Rahmen von B-CLL-Zell-Vakzinen 103

5.5. Ausblick: Anwendung der EBV-Genvektoren in der Immun- und Gentherapie? 104

6. Zusammenfassung 107

7. Abkürzungen 109

8. Literatur 111

Anhang 123

Lebenslauf 130

Danksagung 131

1. Einleitung

1.1. GM-CSF zur Gentherapie von Lymphomen

Der Granulozyten-Makrophagen-stimulierende Faktor (**GM-CSF**) gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren und reguliert Wachstum und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Es handelt sich je nach Glykosylierungsgrad um ein 18-40kD großes monomeres Glykoprotein, das vor allem von T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen nach Aktivierung sezerniert wird. Bisher hat GM-CSF in der Klinik vor allem bei der Regeneration des hämatopoetischen Systems nach Chemotherapie und Knochenmarktransplantation Anwendung gefunden. Jüngste Forschungsbemühungen haben aber gezeigt, dass die Immuntherapie von Krebserkrankungen ein neues vielversprechendes Anwendungsgebiet ist. In Tumorpatienten existieren zwar tumorspezifische T-Zellen, jedoch bewirken diese keine effiziente Anti-Tumorantwort. Maligne Zellen können der Immunantwort dadurch entkommen, dass sie ihre Tumorantigene und kostimulatorische Signale, die notwendig sind zur T-Zell-Aktivierung, unzureichend exprimieren (Chen et al., 1992). Um die Immuntoleranz gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) zu überwinden, wurden autologe, genetisch veränderte Tumorzellen als Krebsvakzine eingesetzt, die Zytokine exprimieren. 1993 wurde von Dranoff et al. gezeigt, dass GM-CSF-produzierende Tumorzellen einen sehr wirksamen Stimulus für eine spezifische Antitumor-Immunität im B16-Melanom-Mausmodell vermitteln (Dranoff et al., 1993). Der immunisierende Effekt ist auf die Rekrutierung und Differenzierung von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) zurückzuführen (Huang et al., 1994; Steinman, 1991). Die DC und T-Zell-Rekrutierung scheint dabei Folge einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen durch GM-CSF zu sein. GM-CSF erhöht die Synthese von IL-8 und MIP-1α, die T- und B-Zellen anlocken (Roberge et al., 1998). Die dendritischen Zellen nehmen die tumorspezifischen Antigene auf, prozessieren sie und induzieren dadurch CD4- und CD8-positive T-Zellen, die je nach Tumormodell gleichermaßen an einer Anti-Tumorantwort beteiligt sein können (Dranoff et al., 1993). Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser GM-CSF-modifizierten Zellvakzine ist die Tatsache, dass die

Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers Tumor-assoziierte Antigene aufnehmen und präsentieren können. Die T-Zellen des Empfängers werden nicht direkt von den Tumorzellen aktiviert, sondern durch Antigen-präsentierende Zellen über einen Prozess, der Kreuzpräsentation genannt wird (Huang et al., 1996; Huang et al., 1994). Seit dieser Studie aus dem Jahr 1993 haben zahlreiche weitere Publikationen die antitumorale Wirkung von GM-CSF unterstützt. Umstritten ist die Frage, wie hoch die Expression des Transgens im Empfänger sein muss. Weitere Untersuchungen an Mausmodellen haben gezeigt, dass GM-CSF-transduzierte Tumorzellen Mäuse vor einer tödlichen Dosis an Tumorzellen schützen (Levitsky et al., 1996) und bereits geringe Mengen des Zytokins (unter 1ng/ 10^6 Zellen/ 24 Stunden) ausreichend sind (Strehl et al., 1999). Sicherlich sind hierbei die Sensitivität des Tumortyps und die besonderen Parameter des Tumormodells entscheidend.

Verschiedene klinische Phase-I-Studien an Patienten haben in den letzten Jahren diese Ergebnisse untermauert. Autologe Tumorzellen, die *ex vivo* mit GM-CSF transduziert waren, wurden als Vakzine gegen Nierenzellkarzinom (Simons et al., 1997), Melanom (Dranoff et al., 1997; Mahvi et al., 1997; Soiffer et al., 1998) und Sarkom (Mahvi et al., 2002) eingesetzt. Die Anforderung besteht darin, ein Expressionsniveau des Zytokins zu erreichen, das zu einer systemischen Immunantwort führt, keine oder geringe Toxizität zeigt und eine klinisch relevante Antitumor-Antwort bewirkt. Diese Studien erzielten zumeist sehr positive Ergebnisse, da an der Immunisierungsstelle T-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen und Eosinophile einwanderten und eine Immunantwort induzierten, die zur Zerstörung des Tumors führte. Bei einigen Patienten kam es zu Reaktionen an der Injektionsstelle und Hypersensitivitätsreaktionen. Allerdings herrscht sehr unterschiedliche Meinung über die klinisch relevante Mindestmenge des sezernierten GM-CSF (10- 150ng/ 10^6 Zellen/ 24 Stunden) (Mahvi et al., 1996; Mahvi et al., 2002; Simons et al., 1997; Soiffer et al., 1998). In den meisten Fällen wurde das Transgen über retrovirale Vektoren in die Tumorzellen eingebracht, in einem Fall über virusfreien Partikel-vermittelten Gentransfer. Diese Ergebnisse legen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten eines Patienten-spezifischen GM-CSF-transduzierten Zellvakzins nahe.

1.2. Dendritische Zellen als Hauptmediatoren der Immunantwort

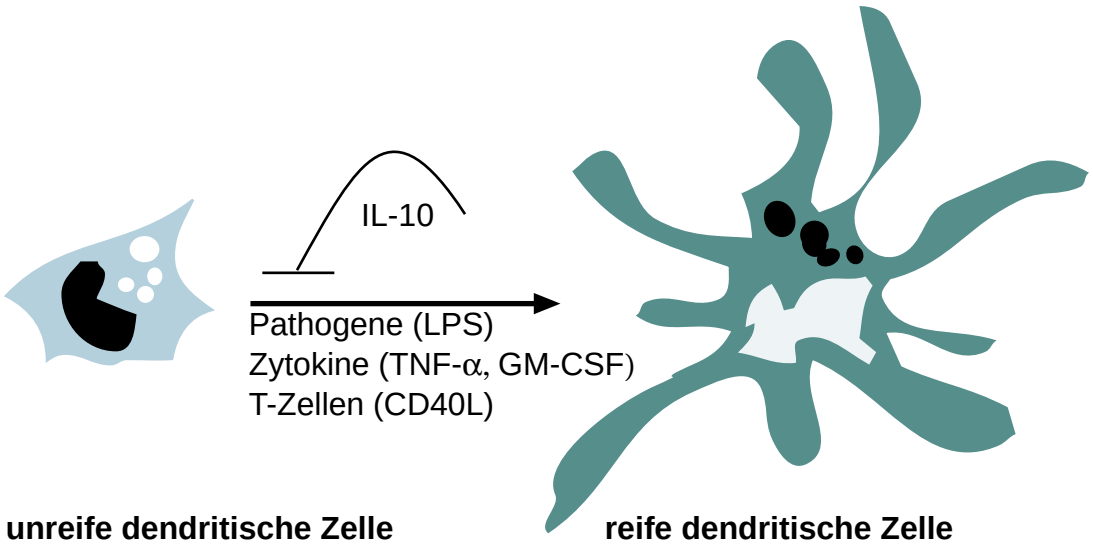
1.2.1. Herkunft und Differenzierung der dendritischen Zellen

Die effizientesten Antigen-präsentierenden Zellen für die Immunantwort gegen Tumore, bakterielle und virale Infektionen sind reife, immunologisch kompetente dendritische Zellen (DC). Intensive *in vitro*-Studien zur Produktion von humanen DC für die Immuntherapie haben verschiedene Möglichkeiten der Etablierung untersucht. Umstritten bleibt, ob diese *in vivo* exakt dieselben sind. Zwei Hauptlinien zur *in vitro*-Generierung von dendritischen Zellen aus Monozytenvorläufern und CD34-positiven Vorläufern (myeloide Linie) oder lymphoiden Vorläufern (lymphoiden Linie) sind beschrieben (Ardavin et al., 2001; Banchereau et al., 1998). Bei der Produktion von DC aus myeloiden Vorläufern erfolgt zuerst eine Differenzierungsphase, gefolgt von einem Reifungsschritt. Periphere Blut-Monozyten, die mit GM-CSF und Interleukin-4 (IL4) kultiviert werden, entwickeln sich zu unreifen DC, die wiederum mittels Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) zu reifen DC werden. Andere Reifungsmediatoren wie LPS, IFN-γ oder CD40-Ligand haben ähnliche Effekte, auch wenn sie zu einem geringfügig anderen Phänotyp führen (Romani et al., 1996; Sallusto et al., 1994). CD34-positive Zellen aus dem Nabelschnurblut oder Knochenmark differenzieren zu DC, wenn sie mit GM-CSF und TNF-α kultiviert werden. Hier entstehen zwei unabhängige, unreife DC-Intermediate, die sich durch die Expression entweder von CD14 oder von CD1a auszeichnen. Davon ausgehend, können reife DC, Langerhans-ähnliche DC oder Makrophagen entstehen, je nach weiterer Zugabe von Zytokinen. Diese Reifungswege sind allerdings sehr empfindliche Systeme, die durch geringfügige Eingriffe gestört werden können.

1.2.2. Funktionen der dendritischen Zellen

DC besitzen zwei Schlüsselfunktionen. Als unreife Zellen sind sie weniger effiziente Initiatoren der Immunantwort, aber darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und MHC-Peptid-Komplexe zu bilden. Als reife DC hingegen stimulieren sie T-Zellen (Banchereau et al., 1998; Steinman et al., 1991). In den meisten Geweben und im Blut liegen dendritische Zellen in einem unreifen Status

vor. Diesen DC fehlen die akzessorischen Signale zur Aktivierung von T-Zellen wie CD40, CD54, CD80 und CD86. Sie zeichnen sich aber dadurch aus, dass sie Fremdpartikel über Phagozytose (Reis e Sousa et al., 1993; Svensson et al., 1997) aufnehmen können oder mittels Makropinozytose (Sallusto et al., 1995) extrazelluläre Flüssigkeit und lösliche Stoffe in großen pinozytotischen Vesikeln sammeln. Als weiteres Merkmal exprimieren sie Rezeptoren wie die Lektin-Rezeptoren vom C-Typ (zum Beispiel Mannose-Rezeptor oder DEC-205) oder verschiedene Fc-Rezeptoren, die Endozytose vermitteln können (Sallusto et al., 1995; Sallusto et al., 1994). Rezeptor-vermittelte Endozytose macht die Antigenpräsentation so effizient, dass picomolare und nanomolare Konzentrationen des Antigens ausreichen. Haben die unreifen DC einmal Antigen aufgenommen, so nimmt diese Fähigkeit rasch ab, sie erhalten durch die Aufnahme einen Reifungsstimulus und beginnen Antigen-MHCII-Komplexe zu bilden. Es existieren MHCII-reiche Kompartimente (MIICs) (Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997), die in unreifen DC zahlreich und nur in einer kurzen Entwicklungsphase der Zellen vorhanden sind. Während der Reifung verwandeln sich die MIICs in nicht-lysosomale Vesikel und entleeren ihre MHC-Peptid-Komplexe an die Oberfläche, wo diese mehrere Tage stabil verbleiben. Über MHCI-Komplexe werden hauptsächlich virale Proteine präsentiert, die durch die Infektion Zugang zum Zytosol besitzen. Allerdings ist unklar, wie Antigene, die keinen Zugang zum Zytosol haben, wie zum Beispiel Transplantations- und Tumor-abgeleitete Antigene, in einer MHCI-restringierten Weise präsentiert werden. Jedoch ist beschrieben, dass Antigene von sterbenden virusinfizierten Zellen ebenso wie von Tumorzellen über einen Prozess namens Kreuzpräsentation (Huang et al., 1996) den T-Zellen präsentiert werden können. Eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen und mikrobiellen Produkten können die Reifung von dendritischen Zellen fördern (LPS, IL1, TNF-α etc.) andere hemmen sie (zum Beispiel IL-10) (Banchereau et al., 1998) (siehe Abbildung 1.1).



unreife dendritische Zelle	**reife dendritische Zelle**
viel intrazelluläres MHCII (MIICs)	viel Oberflächen- MHCII
Endozytose, einschliesslich FcR	wenig Endozytose und FcR
wenig CD54, CD58, CD80, CD86	viel CD54, CD58, CD80, CD86,
CD40, CD25, IL-12, CD83, p55,	CD40, CD25, IL-12, CD83, p55,
granuläre Antigene	M342, 2A1, MIDC-8 Antigene
Aktinfasern	keine Aktinfasern

Abb1.1: Eigenschaften von dendritischen Zellen, die sich während der Reifung ändern.

Unreife DC nehmen Antigen auf unterschiedliche Weise auf (z.B. Phagozytose oder Makropinozytose). Die Reifung wird zusätzlich induziert durch pathogene Moleküle wie z.B. LPS, durch Zytokine wie GM-CSF und TNF-α oder durch die Bindung des T-Zell-Liganden CD40L an CD40 auf DC. IL-10 kann die Reifung inhibieren. In der Abbildung ist beschrieben welche Eigenschaften sich während der Reifung verändern (Banchereau et al., 1998).

Warum DC so effizient an T-Zellen binden und diese besonders effizient aktivieren, scheint ein Effekt zu sein, der auf zahlreiche Ursachen zurückzuführen ist. MHC-Produkte und Peptidkomplexe werden zehn- bis hundertmal höher auf DC als auf anderen APC exprimiert. Reife DC sind resistent gegen die inhibierende Wirkung von IL-10, aber synthetisieren große Mengen an IL-12, das die angeborene (NK-Zellen) und erworbene Immunität (B-und T-Zellen) verstärkt. Außerdem exprimieren DC eine Reihe akzessorischer Moleküle, die mit Rezeptoren auf T-Zellen interagieren, um Adhäsion und Signaltransduktion zu verbessern (CD58, CD54, CD86 etc.).

1.3. Therapeutische Möglichkeiten bei der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL)

Maligne Lymphome lassen sich in Hodgkin-und Non-Hodgkin-Lymphome einteilen. Zu den Non-Hodgkin-Lymphomen zählt die **Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)**, ein meist leukämisch verlaufendes B-Zell-Lymphom von niedrigem Malignitätsgrad. Es handelt sich um die klonale Proliferation und Akkumulation von CD5-positiven B-Lymphozyten im peripheren Blut, in Lymphknoten, Milz und Knochenmark. Die neoplastischen B-Lymphozyten exprimieren kaum kostimulatorische und MHC-Moleküle und haben eine verlängerte Lebenszeit. Die CLL stellt die häufigste aller Leukämieformen in der westlichen Welt dar mit einer Inzidenz von 5/100.000 Fällen pro Jahr. Der Altersgipfel liegt im siebten Lebensjahrzehnt. In 70% der Fälle erfolgt die Diagnosestellung zufällig, da die meisten Patienten anfangs symptomfrei sind oder nur unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Blutarmut, Petechien, häufiges Fieber und Lymphknotenschwellungen aufweisen. Da größtenteils nur noch klonale CD5-positive B-Lymphozyten im Blut vorliegen, werden andere Bestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten (vor allem Neutrophile) zurückgedrängt. Dies führt zu häufigen bakteriellen Infektionen auf Grund von Neutropenie, Hypogammaglobinämie (verminderte Produktion von Antikörpern) und Defekten bei der Zell-vermittelten Immunität und Phagozytose. Die malignen B-Zellen können Antigen nicht effizient präsentieren und produzieren wahrscheinlich immunsuprimierende Zytokine. Die fehlende Fähigkeit der B-Zellen, eine T-Zell-Antwort herbeizuführen, scheint nicht an der mangelnden Expression von MHC-Molekülen zu liegen, sondern vielmehr an den fehlenden kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen. Dies kann Toleranz zur Folge haben, was bedeutet, dass Antigen-spezifische T-Zellen unfähig sind, auf dominante Epitope zu reagieren, da entweder die Stärke des Stimulus zu gering war oder inhibierende Moleküle exprimiert werden (Schultze, 1999).

Bisher werden die Patienten größtenteils einer konventionellen Chemotherapie unterzogen. Als Standardtherapeutikum erfolgt die intermittierende Gabe von Chlorambucil (Leukeran®), das zwar eine starke Wirkung auf das lymphatische System hat, aber kaum eine Depression der Granulozyten und Thrombozyten zur Folge hat. Die Therapie wird beendet, wenn sich die Leukozytenzahlen unter

20000/µl bewegen. Inzwischen wird häufiger Fludarabin (Fludara®) eingesetzt, das in 30% der Fälle zur Remission führt. Knochenmark- oder Stammzell-Transplantationen werden auf Grund des fortgeschrittenen Alters der Patienten selten angewandt. Mit Hilfe der klassischen Chemotherapie gibt es keine Heilungen, sie führt aber zumindest in 80% der Fälle zu einer besseren Prognose.

Große Hoffnungen werden mit neuen adjuvanten Behandlungsmethoden verknüpft, die auf Gen- und Immuntherapie beruhen. Ein Ansatzpunkt ist die Zell-vermittelte Therapie. Der Transfer von immuntherapeutischen Genen in leukämische Zellen führt zu einer lokalen Expression des Transgens unmittelbar in der Umgebung der Tumorzellen. Systemische Nebenwirkungen, die bei einer systemischen Gabe von Zytokinen auftreten können, werden hiermit stark reduziert. Klinische Studien haben bewiesen, dass hämatopoetische Wachstumsfaktoren in immunsupprimierten Patienten wie auch in CLL-Patienten therapeutische Effekte zeigen. Die systemische Gabe von rekombinantem **GM-CSF**-Protein (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) zur Unterstützung der Chemotherapie erhöht die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut ebenso wie die Anzahl der myeloiden Zellen im Knochenmark (Russo et al., 1999). Dies beugt bakteriellen Infektionen vor, die in einem Drittel bis der Hälfte der Fälle das größte Problem der CLL-Patienten darstellt (de Nully Brown et al., 1999). Bisher bleiben die genauen molekularen Mechanismen allerdings weitgehend unverstanden, ein direkter anti-leukämischer Mechanismus über das Zytokin-Zytokinrezeptor-System ist jedoch nicht ausgeschlossen. Problematisch sind aber die Nebenwirkungen der systemischen Gabe, die die Therapie limitieren. Häufig kommt es zu Müdigkeit, Ödemen, Thrombozytopenie und lokalen Reaktionen. Wegen der Nebenwirkungen musste die Behandlung häufig abgebrochen werden (Itala et al., 1998).

In niedrigen Dosen stimuliert GM-CSF die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen und Monozyten-Abkömmlingen, während bei höheren Dosen zuerst die Neutrophilen- und dann die Eosinophilen-Linie stimuliert werden (Itala et al., 1998). Abgesehen davon hat GM-CSF eine Reihe von stimulierenden Effekten auf Immunzellen wie Neutrophile, Eosinophile und Antigen-präsentierende Zellen (APC).

1.4. Das Epstein-Barr Virus

1.4.1. Latenz und lytische Phase von EBV

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist eine humanes γ-Herpesvirus, das nach der Primärinfektion im infizierten Wirt lebenslang in einem latenten Zustand persistieren kann. In diesem Zustand liegt das Genom als episomales Plasmid in der Zelle vor. Das EBV-Genom besteht aus linearer doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 172 kb und kodiert für etwa 90 verschiedene Proteine.

Der Lebenszyklus von EBV weist, wie der anderer Herpesviren, eine lytische und eine latente Phase auf. Die Primärinfektion verläuft über den Nasen-Rachenraum (Oropharynx) und ist gekennzeichnet durch lytische DNA-Replikation, Expression aller viralen Gene, Virusproduktion und Lyse der befallenen Zellen. Meist erfolgt diese akute Phase der Infektion im frühen Kindesalter und verläuft in der Regel ohne klinische Symptome. Findet der Kontakt mit EBV jedoch im frühen Erwachsenenalter oder später statt, kann sich dieser in einer infektiösen Mononukleose (IM) manifestieren. Diese akute Phase der Infektion geht mit einer massiven Proliferation der B-Lymphozyten einher, die zu einer starken T-Zell-Akivierung und damit zu den klinischen Symptomen der IM führt.

Im weiteren Verlauf der Virus-Wirts-Beziehung herrscht eine latente Infektion vor, die nur zeitweilig von einer lytischen Phase der Virusproduktion unterbrochen wird. Während der Latenz werden nur noch elf der ca. 90 viralen Gene exprimiert. Die überwiegende Mehrzahl der viralen Gene kodiert für Proteine, die während der lytischen Phase des EBV die Produktion von Nachkommenviren sicher stellt. Im infizierten Wirt kommt es gelegentlich oder regelmäßig zu klinisch inapparenten Schüben, in dem Virus z.B. im Rachenraum freigesetzt wird.

In der latenten Phase liegt das EBV-Genom als extrachromosomales Plasmid vor, repliziert zusammen mit dem zellulären Genom und wird an die Tochterzellen weitergegeben. Das virale Genprodukt EBNA1 (EBV-nukleäres Antigen 1) bindet an den latenten Replikationsursprung *oriP* und ist dafür verantwortlich, dass das virale Genom in latent infizierten Zellen als Episom erhalten bleibt. Die gleichmäßige

Verteilung des Episoms auf die Tochterzellen wird höchstwahrscheinlich durch die Interaktion von EBNA1 mit Chromatin gewährleistet (Wu et al., 2000; Yates et al., 1985). Auf diese Weise kann das Virus ohne Auslösung von Krankheitssymptomen lebenslang im Wirt persistieren. *In vitro* bewirkt EBV die Transformation primärer B-Zellen zu permanent proliferierenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCL). *In vivo* werden EBV-infizierte B-Zellen normalerweise effizient durch das Immunsystem eliminiert, ohne dass es zu einer lymphoproliferativen Erkrankung kommt. In Fällen einer Immunschwäche, z.B durch eine HIV-Infektion oder nach einer Organ- oder Knochenmarkstransplantation, kann EBV an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein. Darüber hinaus ist EBV ätiologisch eng mit einer Reihe von Krebserkrankungen wie z.B. dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom und dem Nasopharynx-Karzinom und bestimmten T-Zell-Lymphomen assoziiert (Kieff et al., 2001).

Die Mechanismen, die *in vivo* in latent infizierten Zellen zu einer Induktion des lytischen Zyklus führen, sind nicht bekannt. In der produktiven Phase kommt es im Gegensatz zur latenten Phase, in der nur wenige Gene exprimiert werden, zur sequenziellen Aktivierung lytischer Gene. Diese werden nach der Reihenfolge ihrer Aktivierung als sehr frühe (immediate early), frühe (early) und späte (late) Gene bezeichnet. Frühe Gene sind in der Regel Transkriptionsfaktoren, die alle nachfolgenden Gene direkt oder indirekt aktivieren. Der wichtigste Transaktivator von EBV ist das virale Genprodukt BZLF1, das an den lytischen Replikationsursprung (*oriLyt*) bindet, von dem aus die DNA-Replikation erfolgt (Countryman et al., 1985; Hammerschmidt et al., 1988). Ein weiterer Transaktivator des lytischen Zyklus ist BRLF1 (Ragoczy et al., 1998). Beide Proteine sind essenziell für die lytische DNA-Replikation.

1.4.2. Wichtige Onkogene und Regulatoren von EBV

Proliferierende EBV-infizierte B-Zellen stehen in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren, wobei die Expression der viralen Gene zwischen den verschiedenen Tumoren variiert. Das Expressionsmuster der Latenz III, d.h. die Expression der EBV-nukleären-Antigene EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, und EBNA-LP, der drei latenten Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B sowie von kleinen, nicht-polyadenylierten RNAs, EBER1 und EBER2, ist

charakteristisch für immunoblastische B-Zell-Lymphome. In anderen Tumoren wie Nasopharynxkarzinomen, Hodgkin-und T-Zell-Lymphomen sowie Burkitt-Lymphomen, wird nur ein geringer Teil dieser Gene exprimiert. Allerdings sind nicht alle der genannten Proteine notwendig für den Prozess der B-Zell-Immortalisierung. Lediglich EBNA1, EBNA2, EBNA3A, -C sowie LMP1 gelten als essenziell (Tab.1.1).

Protein	Molekulargewicht	Funktion
EBNA1	70-80 kD	Latentes Kernprotein, bindet an oriP und unterstützt die episomale Replikation; korrekte Segregation der EBV-Episomen bei der Zellteilung (Aiyar et al., 1998; Yates et al., 1985); Glycin-Alanin-Repeats verhindern die MHC-KlasseI-Präsentation (Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997)
EBNA2	75-88 kD	Latentes Kernprotein, Transaktivator für EBNA und LMP-Promotoren, bewirkt erhöhte Expression der B-Zell-Aktivierungsmarker CD21, CD23 (Calender et al., 1987; Wang et al., 1990), einiger zellulärer und viraler Gene LMP1, 2A und 2B und des viralen C-Promotors (Cp) (Abbot et al., 1990; Jin et al., 1992) (Sung et al., 1991; Zimber-Strobl et al., 1991); wichtigstes EBNA-2-Zielgen ist c-myc (Kaiser et al., 1999) (Jayachandra et al., 1999)
EBNA3A und 3C	90-110 kD	Latentes Kernprotein, essenziell für B-Zell-Immortalisierung (Tomkinson et al., 1993a); Feinregulation von viralen und zellulären Promotoren (Allday et al., 1993) (Silins et al., 1994).
LMP1	70 kD	Latentes und integrales Membranprotein, ist auch *in vivo* ein virales Onkogen (Kulwichit et al., 1998); induziert Expression von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-2 (Henderson et al., 1991) und B-Zell-Aktivierungsmarkern wie CD21, CD23 und CD40 (Wang et al., 1988) (Wang et al., 1990) über TNF-Rezeptor-ähnliche Signalkaskade

Tabelle 1.1: Eigenschaften und Funktionen der während der Latenz gebildeten, für die B-Zell-Immortalisierung essenziellen Proteine des Epstein-Barr Virus

1.5. Genvektoren

Das Ziel der Gentherapie ist das Einbringen von therapeutischen Genen in Zellen, um die Symptome einer Krankheit zu lindern oder deren Ursache zu korrigieren. Die therapeutischen Anwendungsgebiete reichen von der Behebung mono-genetischer Defekte bis zur Bekämpfung von Tumoren und der Behandlung von

neurodegenerativen Erkrankungen. Die Grenzen der Gentherapie liegen jedoch in der Verfügbarkeit effizienter Übertragungssysteme, die eine ausreichende Expression der Transgene gewährleisten und gleichzeitig keine störende Immunreaktion des Empfängers hervorrufen. Virale Vektoren scheinen nach dem heutigen Wissensstand diese Bedingungen am besten zu erfüllen. Der ideale Virusvektor soll eine hohe Konzentration an Viruspartikeln generieren, um viele Zellen zu transduzieren, und in seiner Herstellung praktisch und reproduzierbar sein. Er muss entweder sequenzspezifisch ins Chromosom integriert werden oder erfolgreich als stabiles Episom etabliert werden. Die regulatorischen Elemente sollten manipulierbar sein, um die Transgenexpression zu regulieren und die Transduktion sollte zelltypspezifisch erfolgen. Als wichtigste Bedingung bleibt jedoch Duldung durch das Immunsystem, was bedeutet, dass keine Komponenten des Virusvektors eine Immunreaktion auslösen dürfen (Verma et al., 1997).

1.5.1. Verschiedene virale Vektoren

Retrovirale Vektoren gehören bisher zu den am häufigsten verwendeten Gentransfersystemen. Retroviren sind Lipid-umhüllte, lineare, positiv-einfachsträngige RNA-Viren, deren Genom ungefähr 7-11 kb umfasst. Die LTR (Long Terminal Repeat)-Sequenzen begrenzen das Tandem *gag, pol* und das Hüllproteingen *env* , die für die Strukturproteine, die Polymerase und Integrase sowie für Oberflächenglykoproteine kodieren. Nach Eintritt des Virus in die Zelle muss die RNA zuerst revers transkribiert und in doppelsträngige DNA umgewandelt werden. Die Lage der meisten cis-agierenden Sequenzen in den ‚Terminal Repeats' hat einen einfachen und effektiven Vektoraufbau ermöglicht (Kay et al., 2001). Bis zu acht kb Fremd-DNA können zwischen den ‚Terminal Repeats' anstelle der viralen Gene eingesetzt werden. Moderne Verpackungszelllinien können solche retroviralen Genvektoren mit einer Titerausbeute von 1x 10^7 transduzierenden Partikeln pro Milliliter verpacken. Eine ambivalente Eigenschaft des Retrovirusgenoms ist die Fähigkeit, zufällig in das Chromatin der Zielzellen zu integrieren, was eine stabile Expression des Transgens garantieren kann, jedoch auch zu der Möglichkeit der Aktivierung von Onkogenen und der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen kann. Dieses Vektorsystem ist auf sich teilende Zellen beschränkt, die eine

strikte Voraussetzung für eine erfolgreiche Expression des therapeutischen Gens darstellt (Miller et al., 1990).

Zur Konstruktion **adenoviraler Vektoren** dienten meistens die humanen Adenovirus-Serotypen 2 und 5. Das 36 kb große doppelsträngige Genom kann ruhende und mitotisch aktive Zellen infizieren. Replikations-defiziente Adenovirus-Vektoren werden in der Regel durch das Ersetzen der für die Replikation essenziellen E1A- und E1B-Proteine durch das Transgen (bis zu 30kb Klonierungskapazität) und ein Promotor-Enhancer-Element generiert. Ein Helfer-abhängiges Vektorsystem stellt die zur Replikation notwendigen viralen Gene zur Verfügung und ermöglicht die Produktion von bis zu 10^{10} viralen Partikeln pro Milliliter in permissiven Zellen (Kay et al., 2001). Diese Vektoren wurden bisher in vorklinischen Tierversuchen verwendet, um ein breites Spektrum an Zellen wie Leber-, Skelettmuskel-, Herz-, Lungen- und Tumorzellen zu transduzieren (Bramson et al., 1995). Problematisch bleiben die bestehende Immunität gegen Adenoviren und die Frage nach der akuten Toxizität hoher Dosen viraler Partikel. Klinische Behandlungsversuche schließen Zystische Fibrose und die Übertragung von blutgefäßbildenden Faktoren bei peripheren vaskulären und koronaren Erkrankungen ein (Rosengart et al., 1999).

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind einzelsträngige (DNA-) Parvoviren und benötigen für die produktive Infektion ein Helfervirus, wie zum Beispiel Adenovirus. Der in den meisten Studien verwendete Serotyp AAV-2 ist mit keiner bekannten Erkrankung verbunden, was ihn zu einem idealen Kandidaten für die Gentherapie macht. Das *rep*-Protein für die virale Genomreplikation und das für Strukturproteine kodierende *cap*-Protein sind von invertierten ‚Terminal Repeats' flankiert und von Verpackungssignalen umgeben (Kay et al., 2001). Die Funktionen können wiederum auf zwei unterschiedlichen Plasmiden getrennt und die essenziellen adenoviralen Helfer-Gene auf einem dritten Plasmid in trans zur Verfügung gestellt werden. Die Limitation des Systems stellt die geringe Verpackungskapazität von nur fünf kb dar. Da die AAV-Vektoren keine virus-kodierten Sequenzen beinhalten, bringt dieses Vektorsystem keine viralen Gene ein, so dass diese Vektoren kaum mit Toxizität oder einer Entzündungsreaktion assoziiert sind. Die Vektorpartikel können durch *in vivo*-Verabreichung in viele Organe wie das Zentrale Nervensystem (ZNS), die Leber, die Lunge und den Muskel transportiert werden (Monahan et al., 2000).

Klinische Studien mit AAV-Vektoren zur Behandlung von Zystischer Fibrose, Hämophilie und Muskeldystrophie sind im Gange (Kay et al., 2000; Wagner et al., 1999).

1.5.2. EBV-Vektoren

EBV-Vektoren eignen sich besonders als Genfähren für den Transport von therapeutischen Genen in erkrankte Zellen, da sie nach der Primärinfektion im latenten Zustand episomal persistieren und somit für eine lang anhaltende Expression des Transgens sorgen können. Aufgrund ihres strikten B-Zell-Tropismus, der durch den zellulären CD21-Rezeptor vermittelt wird, eignen sie sich besonders für die genetische Rekonstitution von genetischen Defekterkrankungen in B-Zellen oder zur Behandlung von B-Zell-assoziierten Krebserkrankungen. Nach intensiver Forschung in der EBV-Genetik in den letzten Jahren sind die Funktionen der wichtigsten EBV-Gene soweit bekannt, dass es möglich sein sollte, durch genetische Manipulation sichere EBV-Vektoren herzustellen. Je nach Beschaffenheit der Vektoren wird eine Klonierungskapazität von 30 bis 150kb erreicht, abhängig davon, wie viele EBV-Elemente noch erhalten sind. Dies bedeutet, dass multiple Expressionskassetten für verschiedene Transgene oder humane Gene in ihrer eigenen regulatorischen Umgebung eingesetzt werden können. Bisher existierten ausschließlich Amplikon-abgeleitete Vektoren, die für das EBNA1-Protein, die Verpackungssignale (TR), und die beiden Replikationsursprünge (*oriP* und *oriLyt*) kodierten sowie heterologe DNA aufnehmen konnten (Robertson et al., 1996). Als Verpackungszelllinie wurde die natürliche EBV-Deletionsmutante P3HR-1 (Δ EBNA-LP und EBNA2) verwendet, die zwar transformationsinkompetent und replikationskompetent ist, aber nach etwaigen Rekombinationsvorkommnissen auch Wildtyp-EBV entstehen läßt. Die Klonierung des EBV-Stammes B95-8 als F-Faktor-Plasmid hat eine neue methodische Grundlage zur Herstellung von gezielten EBV-Mutanten geschaffen (Delecluse et al., 1998). Das auf diese Weise etablierte Maxi-EBV-System diente als Grundlage zur Konstruktion der in meiner Arbeit entwickelten neuen Generation von EBV-Vektoren.

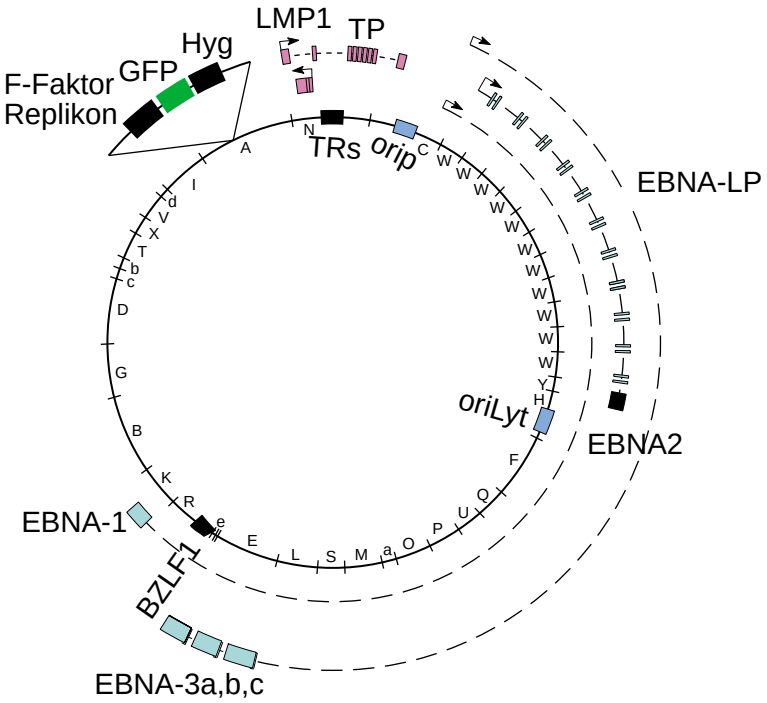


Abb1.2: Karte des Maxi-EBV-Plasmids.

Das Plasmid pMBO131, welches den Replikationsursprung des F-Faktors, die Gene für die Chloramphenicol- und Hygromycin-Resistenz (hier als Cam^{res} und Hyg bezeichnet) sowie das ‚Green Fluorescent Protein' (GFP) trägt, wurde in das EBV-Genom in B95-8- Zellen eingefügt (Delecluse et al., 1998). Die Plasmid-DNA aus Hygromycin-resistenten B95-8-Klonen wurde anschließend in *E.coli* transformiert. Unter anderem zeigt die Plamidkarte die Position der Gene LMP1, EBNA1, EBNA2, EBNA3 und BZLF1.

Während EBNA1 für die Aufrechterhaltung des Episoms benötigt wird, sind die potenziellen Onkogene EBNA2, EBN3A und EBNA3C sowie LMP1 (siehe Tab.1.1) für die gewünschten Eigenschaften eines EBV-abgeleiteten Genvektor prinzipiell entbehrlich.

1.6. Aufgabenstellung

Maligne B-Zell-Lymphome des Menschen sind in der Regel unheilbar, so dass neue Behandlungsstrategien überprüft werden müssen. Ziel meiner Arbeit war die Entwicklung von neuartigen EBV-Vektoren, die das immunstimulatorische Zytokin GM-CSF in B-Zell-Lymphom-Zellen zur Expression bringen sollen. Die modifizierten Tumorzellen könnten dann in gentherapeutischen Ansätzen zur Vakzinierung von Patienten verwendet werden.

Um die wesentlichen Sicherheitsaspekte des EBV-Systems abzudecken, musste die Entstehung replikations-kompetenter Viren, sowie die Expression von Onkogenen, die essenziell sind für die Immortalisierung von primären B-Zellen, ausgeschlossen werden. Ziel war daher, mit Hilfe des Maxi-EBV-Systems (Delecluse et al., 1998), das die Manipulation von EBV in *E. coli* ermöglicht, die Gene EBNA2, LMP1 und BZLF1 genetisch zu deletieren. Durch die Deletion von LMP1 und EBNA2, die *in vitro* beitragen zur unlimittierten Proliferation von B-Zellen, und die Deletion des BZLF1-Gens, das essenziell ist für die Induktion des lytischen Zyklus, sollte ein sicherer EBV-Basis-Vektor etabliert werden.

Da über die Expression von Transgenen im EBV-Kontext wenig bekannt ist, mussten verschiedene Expressionskassetten für das Zytokin kloniert und diese über homologe Rekombination in den EBV-Basis-Vektor eingebracht werden. Die Expressionskassetten unterscheiden sich durch ihre Promotoren und das plasmidale Rückgrat, das verschiedenen expressionsfördernde Sequenzen trägt. Diese EBV-abgeleiteten GM-CSF-Vektoren sollten anschliessend verwendet werden zur Transduktion von Raji-Zellen (Burkitt-Lymphom-Zelllinie) und primären B-CLL-Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (B-CLL). Die Expression des Zytokins sollte untersucht und über mehrere Tage beobachtet werden.

Als zweites Ziel dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob das nach Gentransfer sezernierte GM-CSF *in vitro* biologisch aktiv ist. Dies kann über einen Bioassay mit Hilfe einer GM-CSF-abhängigen Zelllinie oder in einem physiologischeren Versuchsaufbau, der die *in vitro*-Reifung von dendritischen Zellen (DC) umfasst, untersucht werden. Da GM-CSF auch *in vivo* beteiligt ist an der Herbeiführung einer effizienten Immunantwort gegen Tumore und andere Fremdantigene, indem es die Rekrutierung und Reifung von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) fördert, eignet sich dieses System gut zur Evaluierung der biologischen Relevanz des Zytokins. Ein Reifungsprotokoll sollte daher etabliert werden, bei dem nach Gentransfer von B-Zellen sezerniertes GM-CSF zur Gewinnung von DC eingesetzt wird und ihr Phänotyp sowie ihre Funktion in Abhängigkeit von Genvektor-transduziertem GM-CSF untersucht werden kann.

2. Material

2.1. Antikörper

gekoppelte sekundäre Antikörper

Spezies	Spezifität	Isotyp	Markierung	Firma
Ziege	Ratte	IgG	PE	Dianova
Ziege	Maus	IgG	FITC	Dianova
Ziege	Maus	IgG	Cy3	Dianova
Esel	Kaninchen	IgG	HRP	Promega
Ziege	Ratte	IgG	HRP	Promega
Maus	CD83	IgG_1	FITC	Pharmingen
Maus	CD14	IgG	PE	Coulter
Maus	CD14	IgG_1	FITC	Promega
Maus	CD86	IgG_{2b}	APC	Pharmingen

sonstige Antikörper

Spezies	Spezifität	Typ	Firma
Maus	CD80	CBL518	Cymbus
Maus	CD86	CBL520	Cymbus
Maus	HLA-DR, DQ, DP	TÜ39	Pharmingen
Maus	gp350/220	72AI	ATCC (Hybridom)
Ratte	EBNA2	R3+E16	E. Kremmer, GSF
Ratte	EBNA2	R3	E. Kremmer, GSF
Ratte	GST	-	E. Kremmer, GSF
Kaninchen	GM-CSF	AB1447P	Chemicon
Maus	GM-CSF	DY215	R&D Systems

2.2. Bakterien

E. coli DH5α	F-, *lac*I-, *rec*A1, *end*A1, *hsd*R17, Δ(*lac*ZYA-*arg*F), U169, F80d*lac*ZΔM15, *sup*E44, *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1 (Hanahan, 1985)
E. coli DH10B	F-, *mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), Φ80d*lac*ZΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rec*A1, *end*A1, *ara*D139, Δ(*ara*, *leu*)7697, *gal*U, *gal*K, λ-, *rps*L, *nup*G (Life Technologies)
E. coli BJ5183	F-, endA, sbcB-, recBC-, galK, met-, str^R, thi-1, bioT, hsdR (r_k-, m_k+), λ- (Hanahan, 1985)

2.3. Oligonukleotide

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide wurde bei den Firmen ARK Scientific, Darmstadt und Metabion, München, in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5' bis 3'-Orientierung angegeben.

• Sequenzierungs-Primer zur Überprüfung des humanen GM-CSF-Gens:

GM-CSF/Primer1: `AGC ACT GCC CTC CAA CCC C`

GM-CSF/Primer2: `AGT CCT TCA GGT TCT CTT TG`

• PCR-Primer für die Konstruktion der GM-CSF-Kassette unter dem EBNA2 (*W*pr)-Promotor:

p2955/Primer1: `ACC AAG GTC AGC CAA GGG AC`
(#3245- 3264 in p2955)

p2955/Primer2: `GGG GCG GCC GCA GAT AAA GCA AAA CAC AAG CG`
(#3603- 3581in p2955) *NotI*

p2955/Primer3: `CCC GCT AGC CCT CTC CAG CAA CCA ATG TAT C`
(#5084-5106 in p2955) *NheI*

p2955/Primer4: `AAG CAG CCA CCT ATC AAT AAA CTG`
(#5439-5416 in p2955)

p2526/Primer5: `CCC GCG GCC GCC ACC ATG GGG CTG CAG AGC CTG`
(#340-358 in p2526) *NotI*
`CTG CTC TTG GGC`

p2526/Primer6: `CCC ACT AGT GAC CAT CCT GAG TTT CTA GCT C`
(#838-816 in p2526) *SpeI*

2.4. Plasmide

Ein Teil der folgenden Plasmide war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Plasmide wurden von mir hergestellt. Die folgende Auflistung gibt alle verwendeten Plasmide als Auszug aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren wieder.

p509	pCMV-BZLF1 (Hammerschmidt et al., 1988)
p1919	pMBO131 mit dem Hygromycingen, GFP und B95-8
p2088*	BZLF1-Deletion; Kanamycin-Gen von FRT-Seiten flankiert
p2465	pIRES2eGFP Klonierungsvektor (Hildinger et al., 1999)
p2466	pSF11(SHX) retroviral cloning vector (Hildinger et al., 1999)
p2567*	GM-CSF im pIRES-GFP-Expressionsplasmid (p2465)
p2569 *	GM-CSF im BCMGS-Expressionsplasmid (p2515)
p2581	pSTγ mit Kanamycin-Resistenzgen, recA und t_s-ori
p2598*	p2567 in p1919; GM-CSF-IRES-GFP-Expressionskassette im EBV-Kontext für die homologe Rekombination
p2599 *	p2598 mit Kanamycin-Resistenzgen
p2658 *	Eliminierung des BPV-Anteils in p2569 (GM-CSF-BCMGS)
p2670	pCMV-BALF4
p2673 *	CMVpr-GM-CSF im pRK5-Expressionsvektor
p2685 *	SFFpr- GM-CSF im pRK5-Expressionsvektor
p2689*	p2673 in p2088 zur gleichzeitigen Deletion von BZLF1 und Insertion von GM-CSF
p2690*	p2690 in p2088 zur gleichzeitigen Deletion von BZLF1 und Insertion von GM-CSF
p2955*	B95-8-Sequenzen #7315- #56086 (einschliesslich EBNA2-Region) in pST76-Amp
p2959 *	GM-CSF inseriert in p2955 anstelle des EBNA2-Gens
p3004*	pCR2.1-Vektor des TA cloning Kits von Invitrogen mit dem PCR-assemblierten EBNA2pr-GM-CSF-Fragment
pCP15	FRT-flankiertes Kanamycin-Gen mit einer multiplen Klonierungsstelle (Cherepanov et al., 1995)

pCP20	FLIP-Rekombinase
pCR2.1	TA cloning vector (Invitrogen)
pDs-Red2	Expressionsplasmid für einen rot fluoreszierenden Farbstoff
pIRES-GFP	bicistronische Expression des Zielgens und des GFP von der selben mRNA
pRK5	basierend auf dem pUC19-Plasmid wurde das myc-Epitop (MASMEQKLISEEDLGIP) an eine multiple Klonierungsstelle angefügt (Schall et al., 1990)
pST76-Amp	Temperatur-sensitives (30°C) shuttle-Plasmid mit dem Ampicillin-Resistenzgen

Maxi-EBV-Plasmide

p2089	Wildtyp-Maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit *eGFP* Gen und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse et al., 1998)
p2510	Doppelmutante EBNA2, LMP1
p2575	Tripelmutante EBNA2, LMP1, BZLF1;
p2660	Tripelmutante EBNA2, LMP1, BZLF1; GM-CSF-IRES-GFP-Kassette 3' vom F-Faktor; Kanamycin-Resistenzgen
p2698	Tripelmutante EBNA2, LMP1, BZLF1; GM-CSF:BCMGS-Kassette anstatt des BZLF1-Gens; Kanamycin-Resistenzgen
p2699	Tripelmutante EBNA2, LMP1, BZLF1; CMVpr-GM-CSF:pRK5 - Kassette anstatt des BZLF1-Gens; Kanamycin-Resistenzgen
p2700	Tripelmutante EBNA2, LMP1, BZLF1; SFFpr-GM-CSF:pRK5 - Kassette anstatt des BZLF1-Gens; Kanamycin-Resistenzgen
p2965	Tripelmutante EBNA2, LMP1, BZLF1; EBV*w*-Promotor-GM-CSF anstatt des EBNA2-Gens; Kanamycin-Resistenzgen

2.5. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen zum größten Teil aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden von mir im Rahmen dieser Arbeit etabliert (mit * gekennzeichnet). Die T-Zell-Linien sowie LCLs wurden in der Gruppe von Dr. Josef Mautner (Institut für Klinische Molekularbiologie, GSF) hergestellt.

HEK293	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977)
Raji	humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964)
BJAB	EBV-negative B-Lymphomzelllinie
DG75	EBV-negative Burkitt-Lymphomzellinie (Goldblum et al., 1990)
Akata27	EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie (Takada et al., 1991)
TF-1	humane erythroleukämische Zelllinie (Kitamura et al., 1989)

293-Zelllinien, stabil transfiziert mit Maxi-EBV-Plasmiden

HEK293/2089*	p2089, Wildtyp
HEK293/2660*	p2660, ΔLMP1, ΔEBNA2, ΔBZLF1, GM-CSF-IRES-GFP-Expressionskassette
HEK293/2698*	p2698, ΔLMP1, ΔEBNA2, ΔBZLF1, GM-CSF-BCMGS-Expressionskassette
HEK293/2699*	p2699, ΔLMP1, ΔEBNA2, ΔBZLF1, GM-CSF-pRK5-Expressionskassette
HEK293/2700*	p2660, ΔLMP1, ΔEBNA2, ΔBZLF1, GM-CSF-pRK5/SFF-Expressionskassette
HEK293/2965*	p2965, ΔLMP1, ΔEBNA2, ΔBZLF1, EBNA2pr-GM-CSF-Expressionskassette

Humane Lymphoblastoide Zelllinien

LCL1.11	Neomycin, DP3

CD4-positive T-Zelllinien

20-4/A4-T-Zelllinie (Neomycin Phosphotransferase II-spezifisch)

2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in reinster Form pro analysi bezogen.

An der Grub, Salzburg

FIX and PERM Cell Permeabilisation Kit

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Hybond™-ECL-Zellulosemembran, Hybond™-N+-Nylonmembran, α^{32}P-dCTP (3000 Ci/mmol), ECL™-Western blotting analysis System, G50-und G25-Sepharose-Säulen (‚Nick columns')

Beckmann, Heidelberg

Avanti J25 Zentrifuge, L7-55 Ultrazentrifuge

BectonDickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße 15 und 50 ml, Zellkulturflaschen, 96 und 6-Loch-Platten,

Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA

Gene Pulser™

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreithol (DTT), Hygromycin B

Coulter Electronics GmbH, Krefeld

‚Particle Counter', Z Serie

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

Eurogentec, Seraing

Taq Plus PCR Precision System, Stratagene

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel-Elektrophorese-Einheit, SemiPhor, Semidry Blottingsystem

ICN, Eschwege

TPA

Labor Schubert, München

Elisa-Stripwell-Platten

Infors GmbH, Einsbach

Labfors®, Klein-Fermenter-System

Life Technologies, Eggenstein

Amphotericin B (Fungizone), fötales Kälberserum, HBSS-Puffer, HEPES, 1 kb DNA-Leiter, L–Glutamin, Lipofectamin Transfektionsreagenz, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, BenchMark™ Prestained Protein Ladder

Macherey-Nagel, Düren

Nucleobond AX500 Säulen

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme

MEDCO, München

Markierte Objektträger

Merck-Eurolab GmbH

Glyzerin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Essigsäure, Ethidiumbromid, Ethanol, Glucose, Glyzin, Glyzylglyzin, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumbutyrat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natrium-Orthovanadat, Salzsäure, Saccharose, Tetramethylendiamin (TEMED), Triton-X-100,

Nunc GmbH, Wiesbaden

Einfrierröhrchen 3ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 48-und 96-Loch-Platten

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme

Pall Gelman Sciences, Dreieich

Acrodisc Syringe Filter, 0,8μm

Pan Biotech, Aidenbach

Interleukin-1β, Interleukin-4, TNF-α,

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

Reaktionsgefäße, Elektroporationsküvetten (2 mm Plattenabstand), Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

dNTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, DNase I, RNase I, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme, Random primed DNA labeling kit,

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

Qiagen, Mannheim

Polyfect-Zelltransfektionsreagenz

Sandoz, Nürnberg

Leukomax (GM-CSF)

Sigma Chemie, München

Ampicillin, Brefeldin A, Bromphenolblau, γ-Globuline, β-Glyzerophosphat, DMSO, Dithiothreitol (DTT), Glyzin, HEPES, Harnstoff, Lysozym, Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), ProstaglandinE_2, Triton X-100, Monolaurat (Tween-20), Prestained SDS Molecular Weight Marker, Rinderserumalbumin (BSA), Superoxid-Dismutase, Thiazolblau

Serva, Heidelberg

Sucrose

Stratagene, Heidelberg

Taq PCR Precision System, Robocycler

Schleicher & Schuell, Dassel

Filtereinheit 1,2 μm

Tecan, Deutschland

ELISA-Photometer Tecan

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 10-Fluoreszenzmikroskop

3. Methoden

3.1. Bakterienkultur

3.1.1. Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Zur Selektion auf Resistenz gegen ein oder mehrere Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampicillin (100μg/ml), Chloramphenicol (30μg/ml), Kanamycin (30μg/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dicht gewachsene Bakterienkultur mit 50% Glyzerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium:	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
LB-Agar-Platten:	15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium

3.1.2. Transformation und Elektroporation von *E. coli*

Transformation:

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Stämme erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Die kompetenten Bakterien wurden bei –80°C aufbewahrt. Für eine Transformation wurden 200 μl dieser Bakterien zusammen mit ca. 50 ng eines Ligationsansatzes und 7μl DMSO gemischt und anschließend für 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach sofortiger Zugabe von einem Milliliter SOC-Medium und einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Alternativ dazu wurde auch nach einem Transformationsprotokoll von Chung et al. gearbeitet (Chung et al., 1989). Hierbei wurden die zu transformierenden Bakterien in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,4 angezogen. Ein Milliliter dieser Kultur wurde bei 3.000 UpM in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die sedimentierten Bakterien zusammen mit 100 ng Plasmid-DNA in 100μl TSS-Puffer resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend 90 Sekunden bei 42°C. Nach sofortiger Zugabe von einem Milliliter SOC-Medium und

einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

SOC-Medium:	2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$; 0,2% Glukose
TFB-Puffer:	10 mM K-Mes (pH 6,2), 50 mM $CaCl_2$, 45 mM $MnCl_2$, 100 mM RbCl
TSS-Puffer:	LB-Medium, 10% (wt/vol) PEG (Molekulargewicht 3350 oder 8000), 5% (vol/vol) DMSO, 20-50mM Mg^{2+}, pH von 6,5

Elektroporation:

Lineare DNA Fragmente zur homologen Rekombination wurden durch Elektroporation mit einem ‚Gene-Pulser' (Bio-Rad) in DH10B-Bakterien transfiziert, die bereits ein Maxi-EBV und p2650 (RecA, Redγ, Ampicillin) trugen. Die Herstellung elektrokompetenter DH10B-Bakterien erfolgte nach einem Protokoll von Sheng et al (Sheng et al., 1995). 50μl kompetente Bakterien wurden mit bis zu 3 μg Plasmid-DNA 5 min lang auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 μF. Die Bakterien wurden sofort in SOC-Medium überführt und nach einer 120-minütigen phänotypischen Expression bei 30°C (wegen des temperatursensitiven Rekombinationssystems) zur homologen Rekombination auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 42°C, damit nur Kolonien entstehen konnten, die bereits homolog rekombiniert hatten.

3.1.3. Fermentation von *E. coli*

Zur Gewinnung von EBV-Plasmid-DNA wurden DH10B-Bakterien in einem 5 Liter-Tischfermenter (LABFORS) kultiviert. 800 ml einer stationär gewachsenen Vorkultur wurden in den Fermenter überführt und 3,8 l LB-Medium, 300 ml 5M NaCl, 100 ml 87%-iges Glyzerin und die entsprechenden Antibiotika (siehe Endkonzentrationen unter 3.1.1) hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, pH 7,0 und einer Rührerdrehzahl von 400 UpM. Die einzelnen Parameter wurden durch entsprechende Elektroden gemessen und vom digitalen Mess- und Regelsystem der Fermenterkonsole erfasst und reguliert (Handbuch 1.4, LABFORS Klein Fermenter System). Die pH-Regulation erfolgte dabei mit einnormaler Natronlauge, der 50%iges Glyzerin als zusätzliche Kohlenstoffquelle für die Bakterien zugemischt war. Um zu

heftiges Schäumen zu vermeiden, wurde zu Beginn 500µl Speiseöl zugegeben. Die weitere Antischaum-Zugabe wurde durch eine entsprechende Antischaum-Elektrode geregelt. Die Belüftung des Fermenters erfolgte durch ein Begasungsrohr mit einer konstanten Begasungsrate von 1 Vol. Luft/Vol. Kultur x min. Die Kultivierung der DH10B-Bakterien erfolgte bis zu einer OD_{600} von 4 bis 5. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurden die Bakterien für die anschließende DNA-Präparation geerntet (siehe 3.3.4).
Alternativ dazu wurden 6x 800ml LB-Medium mit einer Tageskultur angeimpft, 1% Glyzerol und 250mM NaCl zugesetzt und diese bei 37°C über Nacht kultiviert.

3.2. Eukaryontische Zellkultur

3.2.1. Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO_2 kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10 % Kälberserum (Biochrom®), 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin versetzt. Bei der Kultur von stabilen Maxi-EBV-Zelllinien wurde 100 µg/ml Hygromycin zugesetzt, um das episomale Maxi-EBV-Plasmid in der Zelle aufrecht zu erhalten.

Adhärente Zelllinien

Die adhärente Zelllinie HEK293 wurden in RPMI 1640 mit den angegebenen Zusätzen vermehrt und alle 3-4 Tage 1:7 verdünnt. Zum Ablösen und Verdünnen von adhärenten Zellen wurde den Zellen Trypsin zugesetzt, so dass sie gerade vollständig benetzt waren. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen abgespült und (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt.
Primäre CLL-B-Zellen wurden über Ficoll-Gradienten aus 20 ml Heparin Blut von nicht-therapierten Patienten gewonnen. Da der Anteil der CD5-positiven leukämischen Zellen größer als 90% ist, konnte auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet werden. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum nicht länger als zwei Tage vor den Infektionsversuchen gehalten. Ansonsten wurden die Zellen einen Tag vor der Infektion aufgetaut und in Kultur genommen. Mit primären B-Zellen aus Nasenpolypen (Adenoiden) wurde ebenso verfahren.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde die Zellsuspension mit einem Volumen einer 0,1%-igen Eosin-Lösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind deshalb im Mikroskop an ihrer Rotfärbung im Gegensatz zu vitalen Zellen zu erkennen. Alternativ dazu wurde die Zellzahl mittels eines Partikelzählers der Firma Coulter nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2. Aufbewahrung von Zellen

Zellen können in Gegenwart von DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden etwa 10^7 Zellen abzentrifugiert (1200UpM, 5 min., 20°C) und in 1 ml RPMI-Medium mit 30 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert und in ein 2 ml-Gefäß (NUNC-Cryotube™) pipettiert. Bei primären Zellen wurden der FKS-Anteil auf 90% erhöht. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in einem Einfriergefäß der Firma NUNC© mit Isopropanolmantel auf –80°C abgekühlt. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 30 ml vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

3.2.3. Präparation myelo-monozytärer Vorläuferzellen aus peripherem Blut und Reifung zu dendritischen Zellen

Humane primäre monozytäre Vorläuferzellen wurden aus 120 ml peripheren Bluts freiwilliger Spender im Labor gewonnen. Die peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) wurden über einen 30%-igen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte 1.077) aufgereinigt. Dafür wurden je 15 ml Ficoll mit 35 ml Zellsuspension (Blut:PBS; 1:1) überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 2400 UpM (1200g) für 20 min. bei 20°C. Die Interphase des Gradienten, die neben Monozyten fast ausschließlich B-Lymphozyten enthält, wurde abgenommen und Ficollreste und restliche Thrombozyten durch zweimaliges fraktioniertes Waschen der Zellen (Zentrifugationen: 1400 UpM, 1200 UpM, je 10 min. bei 20°C) mit PBS entfernt. Anschließend wurden die primären PBL in Kulturmedium (VLE RPMI 1640 mit 1% humanem autologem Serum des

Spenders) resuspendiert und auf unbeschichteten Falcon-1005-Plastikschalen ausplattiert. Diese wurden zuvor ca. 30 min. mit 10 ml einer humanen γ-Globulinlösung (Endkonz. 1 μg/ml in PBS gelöst) beschichtet, um eine bessere Haftung der Zellen über ihre Fc-Rezeptoren zu erhalten. Nach ca. 20-minütiger Adhärenz wurden die nicht-haftenden Zellen mit einer Pipette vorsichtig abgewaschen. Vor allem die monozytäre Fraktion bleibt über ihre Fc-Rezeptoren haften.

Die an der Plastikschale haftenden myelo-monozytären Vorläuferzellen wurden nach einem weiteren Waschschritt am nächsten Tag mit IL-4 (500 U/ml; PAN Biotech) und GM-CSF (800 U/ml; Leukomax®) in RPMI 1640-Medium mit 1% Serum des jeweiligen Spenders kultiviert. Alle zwei Tage wurden frische Zytokine zugefügt. Die Menge des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF wurde über ELISA bestimmt und in ausgeglichenen Unit-Mengen zur Reifung eingesetzt. Am Tag 4 oder 5 wurden die abgelösten, unreifen DC abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Sie wurden anschließend in Vollausreifungsmedium (RPMI/ 1% humanes Serum mit TNF-α 2,5 ng/ml, ProstaglandinE_2 0,5 μg/ml, IL-1β 2 ng/ml) überführt und 24 Stunden lang in 6-Loch-Platten inkubiert. Zur Charakterisierung der Zellpopulationen konnten die Zellen dann mit Antikörpern angefärbt und einer durchflusszytometrischen Messung unterzogen werden.

3.2.4. Kultivierung und Stimulierung spezifischer T-Zell-Klone

Die spezifischen CD4-positiven T-Zell-Klone wurden in der Gruppe von Dr. Josef Mautner im Institut für Klinische Molekularbiologie (GSF, München) generiert. Um die Spezifität der Klone zu erhalten, mussten diese alle 10-14 Tage restimuliert werden. Hierzu wurden LCL des selben Spenders mit Protein beladen und der T-Zell-Klon zugegeben. Nach 24 Stunden wurden 10 U/ml IL-2 zugegeben und einen Tag nach jeder weiteren Stimulation nochmals 20 U/ml. Die Reaktivität der T-Zelllinie gegenüber LCL konnte anschließend in einem GM-CSF-Freisetzungstest im ELISA gemessen werden.

Um die Antigenpräsenations- und T-Zell-Aktivierungsfähigkeit der DC zu überprüfen, wurden diese in einer Dichte von 5.000, 10.000, 20.000 Zellen pro Loch in 100 μl

Reifungsmedium (RPMI/ 1% humanes Serum mit TNF-α 2,5 ng/ml, ProstaglandinE_2 0,5 μg/ml, IL-1β 2 ng/ml) in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Im selben Volumen wurde Neomycin-PhosphotransferaseII-Protein zur Beladung des MHCII-Oberflächenmoleküls beigegeben. Die Menge wurde von ca. 200 ng bis 7,4 ng in Dreierschritten titriert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 80 Gray bestrahlt und anschließend vorsichtig das Medium gewechselt. Es folgte die Zugabe des Neomycin-Phosphotransferase II-spezifischen CD4-positiven T-Zell-Klons ($1x10^5$ Zellen pro Loch) in T-Zell-Medium. Nach 24 Stunden konnte die Aktivierung der T-Zellen durch die Messung des freigesetzten GM-CSF bestimmt werden.

T-Zell-Medium: RPMI 1640, 10% hitze-inaktiviertes humanes Serum, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 10mM HEPES-Puffer

3.2.5. Präparation primärer B-Zellen

Normale, humane primäre B-Zellen wurden aus Routineentnahmen von Nasenpolypen (Adenoiden) gewonnen. Aus den Adenoiden wurde durch mechanisches Zerkleinern und Filtrieren durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 100 μm eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese Zellsuspension wurde auf 35 ml aufgefüllt und die T-Zellen durch Zugabe von 0,5 ml Schafserythrozyten für 15 min. bei Raumtemperatur rosettiert. Die B-Lymphozyten wurden anschließend über einen 30%-igen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Dichte 1.077) aufgereinigt (3.2.3).

3.2.6. Stabile Transfektion von Zellen und Selektion der Zellklone mit Hygromycin

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-Loch-Platten bis zu 70 %-iger Konfluenz kultiviert. Die Transfektion mit Lipofectamin™ in serumfreiem Medium (Optimem I, Life Technologies) wurde nach Angaben des Herstellers (Life Technologies) durchgeführt (6 μl Lipofectamin™-Reagenz pro 1 μg transfizierter DNA).

Zur Etablierung EBV-positiver stabiler Zelllinien wurden HEK293-Zellen in 6-Loch-Platten mit 1 μg DNA des entsprechenden Maxi-EBV-Plasmids transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 140 mm) überführt und einige Stunden nach dem Absetzen der Zellen Hygromycin (100 μg/ml Endkonzentration) dem Kulturmedium hinzugegeben. Einige Tage nach Transfektion

wurde das Kulturmedium vorsichtig gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen. Drei bis vier Wochen später wurden auswachsende Zellklone, die sich durch Fluoreszenzmikroskopie als positiv für die GFP-Expression erwiesen, mit einer Trypsin-haltigen gelben Pipettenspitze von der Zellkulturschale abpipettiert und klonal expandiert.

3.2.7. Transiente Transfektion von Zellen mit GM-CSF-Expressionsplasmiden und Blockierung des intrazellulären Transports durch Brefeldin A

HEK293-Zellen wurden in 6-Loch–Platten bis zu 50 %-iger Konfluenz kultiviert. Danach wurden sie mit jeweils 1 μg DNA der GM-CSF-Expressionsplasmide und 100ng Ds-Red-Plasmid pro Loch zur Kontrolle der Transfektionseffizienz (rote Fluoreszenz) mit Lipofectamin™ in serumfreiem Medium (OptimemI, Life Technologies) transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Brefeldin A (5 μg/ml in 100 % Ethanol). Es wurden jeweils Parallelansätze mit und ohne Brefeldin A angesetzt. Dieses inhibiert den anterograden Transport der Proteine vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat durch Zerstörung der Vesikel (Lippincott-Schwartz et al., 1991; Wood et al., 1991). GM-CSF akkumuliert dadurch im Zytoplasma und kann intrazellulär durch Immunoblot nachgewiesen werden.

Auch verschiedene B-Zelllinien wurden nach Elektroporation für 6 Stunden mit 5 μg/ml Brefeldin A oder nach Infektion für 16 Stunden mit 3 μg /ml Brefeldin A behandelt.

3.2.8. Elektroporation eukaryontischer Zellen

Pro Elektroporationsansatz wurden 5 x 10^6 Raji-, BJAB-, DG75- und Akata27-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 250 μl RPMI ohne Serum aufgenommen und mit 5 μg DNA vermischt. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Volt und 1 mF in gekühlten 4mm-Küvetten. Anschließend wurde 500 μl fötales Kälberserum (FKS) in die Küvette gegeben und die Zellsuspension in 3 ml Vollmedium pipettiert. Es wurde wie bei der Transfektion von adhärenten HEK293-Zellen zur Kontrolle der Transfektionseffizienz jeweils 1 μg Ds-Red-Plasmid mittransfiziert.

3.2.9. Produktion infektiöser Viruspartikel und Titerbestimmung

Stabile 293-Maxi-EBV-Zellklone, die lytisch induziert werden sollten, wurden in 6-Loch–Platten bis zu einer 50 %-igen Konfluenz kultiviert. Danach wurden sie mit Expressionsplasmiden für BZLF1 (p509; 0,2 μg/Loch) und BALF4 (p2670; 0,5 μg/Loch) nach Angaben der Hersteller der Transfektionsreagenzien (Lipofectamin™) transfiziert, um den lytischen Zyklus zu induzieren. Die Überstände wurden nach 72h Kultivierung bei 37°C geerntet und filtriert, um Zelltrümmer abzutrennen (Porengröße 0,8 μm). Die Quantifizierung verschiedener Viruspräparationen erfolgte mit Hilfe der GFP-Expression infizierter Raji-Zellen. $3x10^5$ Raji-Zellen wurden mit definierten Volumina an Kulturüberständen für drei Tage bei 37°C in 24-Loch-Platten inkubiert. Am Tag nach der Infektion wurde das Medium gewechselt. Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen in PBS gewaschen, in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und der Prozentsatz GFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Alternativ konnte die Anzahl der infizierten Zellen auch in einen Invers-Fluoreszenzmikroskop gezählt werden. Auf Grund dieser Daten wurden „grüne Raji-Einheiten“ (‚GRU’) pro ml Kulturüberstand als Maß für die absolute Zahl infektiöser Maxi-EBV-Partikel in den einzelnen Kulturüberständen von HEK293-Maxi-EBV-Zelllinien definiert.

3.2.10. Konzentration von Viruspräparationen

Bei Infektionsexperimenten mit Raji-Zellen und primären B-CLL-Zellen wurden die infektiösen Partikel in den Überständen aufkonzentriert. Dies geschah durch fünfstündige Ultrazentrifugation bei ca. 40.000xg (≈17.000 UpM) und 4 °C in einem Ausschwingrotor. Die Virussedimente wurden in 4 % des Ausgangsvolumen HBSS-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4 °C zur vollständigen Resuspendierung inkubiert. Bei der Induktion des lytischen Zyklus der stabilen HEK293-Klone wird von den Zellen bereits das Maxi-EBV-Vektor-kodierte GM-CSF produziert und in den Zellkulturüberstand abgegeben. Um dieses zu minimieren sowie andere Proteinverunreinigungen zu reduzieren, wurden die Überstände vor der Zentrifugation mit einem 25 %igen Saccharosekissen unterlegt. Zellfragmente und größere Proteine bleiben in diesem Kissen hängen und verunreinigen das Virussediment nicht. Die konzentrierten und aliquotierten Viruspräparationen konnten

in HBSS-Puffer einige Monate bei 4 °C gelagert werden, ohne dass eine starke Reduktion des Titers eintrat.

3.2.11. Infektion von Raji-Zellen und primären B-Zellen mit Maxi-EBV-Vektoren zur Bestimmung der GM-CSF-Sekretion

Raji-Zellen wie auch primäre humane B-CLL-Zellen wurden in einer Dichte von 3-4x 10^5 Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Es wurden entsprechende Mengen konzentrierter Viruspräparationen zugegeben, um eine MOI von 0,3 zu erreichen. Die Titer der Viruspräparationen waren vorher über eine Raji-Infektion bestimmt und die GRU-Titer auf vergleichbare Mengen eingestellt worden. 24 Stunden nach Infektion wurden die Ansätze durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge (1200 UpM, 7 min, 20°C) dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wieder in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellkulturüberstände vor dem ersten Waschschritt sowie 2 bis 4 Stunden nach dem gesamten Waschprozedere wurden verwahrt, um den GM-CSF-Anteil in den konzentrierten Viruspräparationen und den Übertrag an GM-CSF in die Infektionszeitreihe zu bestimmen. Die Überstände wurden an verschiedenen Tagen geerntet und das GM-CSF über ein ELISA-Verfahren gemessen. Mittels Durchflusszytometrie war eine Bestimmung der Anzahl der infizierten Zellen möglich.

3.2.12. Messung der MTT-Konversion einer GM-CSF-abhängigen Zelllinie

Die humane promyeloide Zelllinie TF1 proliferiert nur in Abhängigkeit von GM-CSF, die Proliferation dieser Zellen kann durch MTT-Konversion bestimmt werden. Dabei wird das Substrat MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch ein mitochondriales Enzym umgesetzt. Durch die enzymatische Umsetzung entsteht ein farbiges Produkt, das durch die Messung der optischen Dichte bei 690nm quantifiziert wird. Um die Funktionalität des nach Gentranfer in B-Zellen sezernierten GM-CSF durch die Proliferation der TF1-Zelllinie zu bestimmen, wurden in 96-Loch-Platten Verdünnungsreihen der Zellkulturüberstände in Triplikaten angelegt. Anschließend wurden 5x 10^3 TF-1-Zellen hinzugegeben und die Platten bei 37°C und 5% CO_2 vier Tage lang inkubiert. Zur

Messung der MTT-Konversion wurden 20µl MTT-Reagenz (5 mg/ml Thiazolblau in PBS mit 1 mg/ml Superoxid-Dismutase in PBS im Verhältnis 990 µl+ 110 µl) hinzugegeben. Nach vierstündiger Inkubation wurde die Farbreaktion mit 100 µl SDS (10%) abgestoppt und die optische Dichte bei 690 nm bestimmt.

3.3. DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie z.B. Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Behandlung von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase, Ligierung freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse und durch Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989).

3.3.1. Rekombinante Plasmide

Als Voraussetzung für alle GM-CSF-Vektoren diente die Dreifachmutante, bei der EBNA2, LMP1 und BZLF1 (ausgehend vom Wildtyp-Maxi-EBV p2089) deletiert sind. Bei p2698-Maxi-EBV, p2699-Maxi-EBV und p2700-Maxi-EBV wurde ausgehend von p2510-Maxi-EBV, in einem Schritt das BZLF1-Gen deletiert und die GM-CSF-Expressionskassette in den zerstörten Lokus inseriert. Im Gegensatz dazu erfolgte bei p2660-Maxi-EBV und p2965-Maxi-EBV zuerst die Deletion des BZLF1-Gens (= p2575-Maxi-EBV). Anschließend wurde in einem weiteren Schritt die GM-CSF-Expressionskassette in p2575-Maxi-EBV eingefügt. Fast alle GM-CSF-Vektoren sind durch die Einführung eines linearen Fragments in p2510-Maxi-EBV oder p2575-Maxi-EBV entstanden, die bereits das zur Rekombination notwendige p2650 (recA/redγ) enthalten. Nur p2965-Maxi-EBV wurde über ‚chromosomal building' kloniert. Die folgende Auflistung gibt die verschiedenen Klonierungsschritte zur Generierung aller benutzten Maxi-EBV-Mutanten wieder. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Plasmide wurden von mir hergestellt. Alle Plasmide sind in der Datenbank der Abteilung Genvektoren eingetragen.

p2575.9* (Dreifachdeletion in p2089-Wildtyp; Δ LMP1, ΔEBNA2, ΔBZLF1):

Um das p2088*-Plasmid zu generieren, wurde das *HindIII/SmaI*-Fragment von pCP15 in p2084 (*NheI/HindIII*) inseriert. Für die homologe Rekombination in p2510* wurde das lineare *SacI/Spe/*-Fragment von p2088* verwendet. Das Einbringen von pCP20 (Flip-Rekombinase) in p2575.9* führte zum Verlust des FRT-flankierten Kanamycin-Gens. Daraus entstand der Maxi-EBV-Vektor p2575.9.1.

p2698* (GM-CSF/BCMGS-Vektor):

Der offene Leserahmen des GM-CSF-Gens wurde als *XhoI/XhoI*- Fragment aus dem pXM-Vektor p2526* in die *XhoI/NotI*-Schnittstelle des BCMGS-neo-Expressionsvektors p2515* inseriert (Karasuyama et al., 1990) (Labor Dr. Ralph Mocikat.). In dem dabei enstandenen Plasmid p2569* wurde der Rinderpapillomvirus-Anteils über die Schnittstellen *KspA1/Eco47III* entfernt und der Verktor religiert. Das *XbaI/HindII*-Fragment des dadurch generierten Plasmids p2658* wurde in die *SexAI/HindIII*-Schnittstelle des BZLF1-Deletionsplasmids (p2088*) inseriert. Das Klonierungsergebnis heißt p2668*. Das lineare *PvuI*/*StuI*-Fragment von p2668* wurde anschließend für die homologe Rekombination in p2510* eingesetzt. Daraus entstand der Maxi-EBV-Vektor p2698.

p2699* (CMVp-GM-CSF/pRK5-Vektor):

Durch die Insertion des offenen Leserahmens von GM-CSF aus dem Plasmid p2526* (*XhoI/XhoI*) in das pRk5myc-Expressionsplasmid (*EcoRI/HindIII*) entstand p2673*. Das *XmnI*-Fragment von p2673* wurde über die *HindIII*-Schnittstelle in das BZLF1-Deletionsplasmid (p2088*) überführt und damit p2689* kloniert. Für die homologe Rekombination in p2510* wurde das *EcoRV/BspEI*-Fragment von p2689* verwendet. Dabei entstand der Maxi-EBV-Vektor p2699 Maxi-EBV.

p2700* (SFFp-GM-CSF/pRK5-Vektor):

Das *NheI/KpnI*-Fragment des SFFp-Enhancers aus dem retroviralen Klonierungs-Vektor p2466 (Baum et al., 1997) wurde in p2673* (*SacI/BbsI*) inseriert. Aus dem entstandenen p2685*-Plasmid wurde das *XmnI/PvuII*-Fragment umgesetzt in die

HindIII-Schnittstelle des BZLF1-Deletionsplasmids (p2088*). Das dadurch generierte p2690*-Plasmid dient als Donor für das lineare *EcoRV/BspEII*-Fragment, das anschließend für die homologe Rekombination in p2510* verwendet wurde. Dabei entstand der Maxi-EBV-Vektor p2700.

p2660* (GM-CSF-IRES-GFP-Vektor):

Das p1919-Plasmid enthält B95-8-Sequenzen sowie das GFP-Gen und das Hygromycin-Resistenzgen auf der Basis des pMBO131-Rückgrats (Science 244:1307-1312). Durch die Insertion des *XhoI/XhoI*-Fragments aus p2526* in die *XhoI/SalI*-Schnittstelle des IRES-EGFP-Vektors p2465* (Clontech) entstand das p2567-Plasmid. Aus p2567* wurde das *HpaI/NheI*-Fragment in p1919 (*HpaI/NheI*) überführt, um p2598* zu generieren. Darüber hinaus wurde das Kanamycin-Resistenzgen aus pCP15 (*HindIII/SmaI*- Fragment) in die *BstEII*- Schnittsttelle von p2598 eingesetzt. Das dabei entstandene Plasmid p2599* diente als Donor für das lineare *ClaI/PacI*-Fragment, das für die homologe Rekombination in p2575* verwendet wurde. Dabei entstand der Maxi-EBV-Vektor p2660.

p2965* (EBNA2-*W*p-GM-CSF-Vektor):

Das *SnaBI/AflII*-Fragment von p135.16 wurde in die *EclI36II*-Schnittstelle von pST76Amp eingesetzt, um das Plasmid p2955* zu erhalten (EBV B95-8-Sequenzen #7315 bis # 56086). p2955* und p2526* dienten als Matrize für PCR-Reaktionen mit den Primern 1-6. An die drei dabei entstandenen Fragmente wurden über Oligonukleotide jeweils Restriktionsschnittstellen angefügt. Die entstandenen Fragmente #3245 bis #3603 von p2955 (A), #340-816 von p2526 (E) und #5084 bis #5416 von p2955 (C) wurden über die angefügten Restriktionsschnittstellen geschnitten und ligiert. Das Volllängen-Konstrukt nach Ligation der Fragmente wurde als p3004 bezeichnet. Anschließend wurde das *MluI/PmeI*-Fragment von p3004* in diesselben p2955-Schnittstellen inseriert. Dabei entstand p2959*. Dieses Plasmid wurde für die homologe Rekombination über ‚chromosomal building' in p2575* verwendet. Über das Kointegrat p2964* wurde nach Resolvierung der Maxi-EBV-Vektor p2965 generiert.

3.3.2. Extraktion zellulärer DNA aus eukaryontischen Zellen

Ca. $1x10^7$ Zellen wurden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, in 2,1 ml TE aufgenommen und durch Zugabe von 1% SDS lysiert. Das Lysat wurde 2 Stunden lang bei 50°C, alternativ über Nacht bei 37°C, mit Proteinase K (50µg/ml Endkonzentration) verdaut. Nach Zusetzen von 1 ml 5M NaCl wurde die Suspension kräftig geschüttelt und für 30 min. bei 15300UpM in einer SigmaZentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit zweifachem Volumen Ethanol präzipitiert, das Sediment mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen TE (ca. 500 µl) über Nacht resuspendiert.

3.3.3. Schnellaufreinigung von Plasmiden mit einer Größe von bis zu 30kb

Die Plasmidpräparation erfolgte nach der modifizierten ‚Boiling Method' (Holmes et al., 1981). Ein Viertel eines konfluenten Bakterienrasens auf einer Agarplatte wurde abgeschabt und in 200µl Lysispuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 3µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde die Zellwand aufgelöst. Zur Denaturierung der Proteine wurde der Ansatz für 2 min bei 100°C erhitzt und 5 min auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation (10 min, 15000 Upm, RT) wurden Zellreste mit chromosomaler DNA, die mit der Zellwand assoziiert sind, und ribosomale RNA sedimentiert. Der wässrige DNA-Überstand konnte direkt für enzymatische Spaltungen eingesetzt werden, oder die DNA wurde nach Entfernung des Sediments mit 500µl 100 % Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und die luftgetrocknete DNA in 40µl H_2O gelöst.

Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 62,5 mM EDTA, 0,4 % (v/v) Triton X-100, 2,5 M LiCl

3.3.4. Präparative Plasmidreinigung

Die präparative Plasmidreinigung aus einer stationären 400ml Kultur erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen nach Angabe des Herstellers (Genomed). Die eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

3.3.5. Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus *E. coli*

Fünf Liter aus der Fermenterkultur wurden 15 min. lang mit 5000 UpM und Raumtemperatur in einer Heraeus-Seratech-Zentrifuge abzentrifugiert. Die Bakterienlyse und DNA-Präparation erfolgten nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook et al., 1989). Anschließend wurde die gewonnene DNA in insgesamt 100 ml 5xTE Puffer aufgenommen. 110 g CsCl wurden hinzugegeben und aufgelöst. Diese Mischung wurde auf 4 Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall, 35 ml), in denen je 800 µl Ethidiumbromid (1%w/v, Merck) vorgelegt wurde, verteilt. Die UZ-Röhrchen wurden mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte 72 h lang bei 35.000 UpM und 20 °C in einem TFT 70.38-Festwinkelrotor einer Beckmann L-60 Ultrazentrifuge. Danach wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht und die jeweils unteren Banden, die der „supercoiled"-Plasmid-DNA entsprechen, mit einer Einmalkanüle (2,1x38 mm, BOVI•VET) abgezogen. Die Plasmid-DNA-Mischung wurde in zwei neue 11,5 ml UZ-Röhrchen überführt und diese mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation in einem 70 TI-Festwinkelrotor für 48 h bei 35000 UpM wurde wiederum die untere Plasmid-DNA-Bande abgezogen und das restliche Ethidiumbromid durch Ausschütteln mit CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Nach Zugabe von TE-Puffer auf das fünffache Volumen und DNA-Präzipitation mit Isopropanol wurde die EBV-Plasmid-DNA in TE-Puffer aufgenommen.

Alternativ dazu wurde EBV-Plasmid-DNA auch mit Nucleobond-AX500-Säulen der Firma Macherey-Nagel, Düren, nach Angaben des Herstellers gewonnen. Dabei wurde von 400ml einer stationär gewachsenen Kultur ausgegangen. Die Menge und Reinheit der erhaltenen DNA war geringer als nach Fermentation und CsCl-Gradient, aber für mehrere Transfektionen in HEK293-Zellen ausreichend.

3.3.6. Homologe Rekombination in *E. coli* zur Konstruktion von Maxi-EBV-Mutanten

Lineare DNA-Fragmente zur homologen Rekombination mit einem Maxi-EBV-Plasmid wurden in *E. coli* DH10B-Bakterien durch Elektroporation (3.1.2) transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm trug das Rezipienten-Maxi-EBV-Plasmid p2510 bzw p2575 oder ein anderes Derivat sowie das Plasmid p2650 (RecA, Redγ,

Ampicillin). Dieses Rekombinationssystem in *E. coli* DH10B wurde während dieser Arbeit in Anlehnung an das bereits beschriebenen Rekombinationssystem im *rec*A-positiven, *rec*BC-negativen *E. coli* Stamm BJ5183 entwickelt (Neuhierl et al., 2002). Der verwendete *rec*A-negative Stamm *E. coli* DH10B enthält zusätzlich zu einem Maxi-EBV-Plasmid das Plasmid p2650, das unter Kontrolle eines temperatursensitiven Replikationsursprungs für die Rekombinase RecA und den Exonukleaseinhibitor Redγ kodiert. Nach Transformation des linearen DNA-Fragments und zweistündiger phänotypischer Expression bei 30°C wurden doppeltresistente Klone (Chloramphenicolresistenz durch das Maxi-EBV vermittelt, eine weitere Resistenz z.B. Ampicillin durch das rekombinierte Fragment) bei 42°C stabil propagiert. Dabei ging das temperatursensitive und Ampicillinresistenz vermittelnde Plasmid p2650 verloren, was leicht an der Sensitivität der gewachsenen Kolonien gegen Ampicillin nachzuprüfen war.

3.3.7. Southern-Blot-Hybridisierung

15 μg zelluläre DNA wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in einem 0,7%-igen Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde nach der Gelelektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid (40ng/ml in 1 x TAE-Puffer) sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Gel 10 min. lang mit 0,25 M HCl behandelt, um Strangbrüche in den DNA-Fragmenten durch Hydrolyse hervorzurufen. Danach wurde die DNA in 1,5 M NaCl; 1,5 N NaOH denaturiert und durch kapillaren Transfer auf eine Nylon-Membran (Hybond N+) übertragen. Der Transfer wurde nach 2 h beendet (Southern, 1975). Die Membran wurde kurz in 2xSSC geschwenkt und anschließend für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe verwendet. Die Prähybridisierung erfolgte in 15 ml Hybridisierungspuffer 60 min. lang bei 65°C (Church et al., 1984). Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert, die radioaktiv markierte Probe ($3x10^7$ dpm) zugegeben und die Hybridisierung an homologe DNA-Bereiche über Nacht bei 65°C durchgeführt. Die hybridisierten Nylonfilter wurden 3x für je 15 min bei 65°C in 0,1xSSC; 1% SDS gewaschen, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Intensität der Signale.

1xTAE-Puffer:	40 mM Tris-HCl (pH8,0); 5 mM NaAc; 1mM EDTA
2xSSC:	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat

Church-Puffer: 400 mM Na_2HPO_4, 100 mM NaH_2PO_4, 7% SDS, 1 mM EDTA (pH7,2)

3.3.8. Radioaktive Markierung von DNA

Für die radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA-Fragmente wurde eine von Feinberg und Vogelstein entwickelte Methode verwendet, bei der Hexanukleotide von zufälliger Sequenz an hitzedenaturierte, einzelsträngige DNA binden und als Primer für die Elongation mit Hilfe der Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragmentes dienen (Feinberg et al., 1983). Die Markierung von 50ng DNA wurde mit dem "random primed DNA labeling kit" der Firma Roche Diagnostics nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über eine Sephadex-G50-Säule (Nick Column, Amersham Pharmacia). Nach Hitzedenaturierung (5 min. bei 95°C, 5 min. Eis) konnte die markierte Sonde direkt zur Hybridisierungslösung gegeben werden.

3.3.9. PCR-Analysen

Es wurde das PCR-System ‚*Taq Plus® Precision'* der Firma Stratagene verwendet und die PCR-Analysen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die optimalen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden über einen Temperaturgradienten in einer speziellen PCR-Maschine (Robocycler, Stratagene) ermittelt. Für die Extension wurden 90 Sekunden pro 1.000 zu amplifizierenden Basen angenommen. In der Regel wurden 30 Zyklen für die PCR-Amplifikation durchlaufen.

Standardprotokoll für die Amplifikation von plasmidalen DNA Fragmenten:
Reaktionsansatz:
50ng Plasmid-DNA
3 µl MgCl (Promega, 25mM)
4 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
je 2 µl Primer (50µM)
5 µl 10x Taq-Polymerase Puffer
1µl Taq-DNA-Polymerase (5U/ml)
H_2O ad 50 µl

PCR-Programm: 95°C/ 5 min.; 30 Zyklen: 95°C/ 1 min., 48°-53°C/ 1min., 72°C/ 2 min.; 72°C/ 10 min., 4°C

Die Oligonukleotide zur Amplifikation des humanen GM-CSF und der EBNA2-Umgebung enthielten zusätzlich Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Ligation der einzelnen Fragmente und die Klonierung der amplifizierten DNA in einen

Vektor. Als Matrize dienten die Plasmide p2526 (GM-CSF) und p2599 (EBNA2-Region in pStγ76).

3.4. Proteinnachweistechniken

3.4.1. Immunfluoreszenzanalysen

Die Expression des lytisch induzierten EBV-Proteins gp350 in induzierten 293-Zellen wurde durch Immunfärbungen nachgewiesen.
Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, auf markierten Objektträgern der Firma MEDCO, München getrocknet und für 20 min. in Aceton fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern 30 min. lang bei 37°C in einer „feuchten Kammer“ (erhöhte Luftfeuchte durch Wasser auf dem Boden eines geschlossenen Gefäßes) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger mit PBS in einer Glasküvette wurden die Zellen mit einem zweiten, Cy3-konjugierten Sekundärantikörper weitere 30 min. lang bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in einer 1%-igen PBS/Glyzerin-Lösung eingebettet. Zur Analyse wurden die gefärbten Zellen mit Licht der Wellenlänge 546 nm bestrahlt und mit einem Invers-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 10) mit dem geeigneten Filtersatz betrachtet.

3.4.2. Durchflusszytometrie

Einzelzellen einer Zellsuspension können durch Durchflußzytometrie in einem FACS™-Gerät analysiert werden. Nach Färbung von Zellen mit Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kann man in der FACS-Analyse bestimmen, wie viele Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau erreicht wird. Erkennt der verwendete Antikörper ein Antigen, das sich im Zytoplasma oder im Zellkern befindet, müssen die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden.

Nachweis von Oberflächenmolekülen

Für die Detektion der Oberflächenmarker der *in vitro*-gereiften DC wurden ca. $5x10^4$ Zellen in PBS/2%FKS/0,1%Azid gewaschen und mit 1μl eines anti-CD14, anti-CD86 oder anti-CD83-Antikörpers 20 min. lang inkubiert. Alle Antikörper waren bereits

direkt Fluoreszenz-markiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps inkubiert.

Intrazellulärer Nachweis von Proteinen

Für die Detektion des sich im Zellkern befindlichen Proteins EBNA2 mussten die Zellen für die FACS-Analyse fixiert und permeabilisiert werden. Dies geschah mit dem „FIX and PERM permeabilisation kit“ der Firma „An Der Grub“, Österreich. Bis zu $1x10^7$ Zellen wurden in einem Milliliter Waschpuffer (PBS/2%FCS/0,1%Azid) gewaschen und die abzentrifugierten Zellen in 100µl Lösung A für 15 min fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 100µl Lösung B permeabilisiert. Dabei wurden entweder 20 µl des EBNA2-Antikörpers, oder ein irrelevanter Antikörper als Isotypkontrolle zugegeben und 15 min. lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS/2%FKS/0,1%Azid erfolgte die Inkubation mit PE-konjugierten Sekundärantikörpern, wiederum in 100µl Lösung B für 15 min. bei Raumtemperatur im Dunklen. Vor der FACS-Analyse wurden die Zellen ein weiteres Mal in PBS/2%FKS/0,1%Azid gewaschen.

Propidiumiodid (PI)-Färbung

Vergleichbar mit Ethidiumbromid bei der Gelelektrophorese lagert sich Propidiumiodid in doppelsträngige DNA ein und kann durch Licht geeigneter Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt werden. In unbehandelten Zellen dient die Propidiumiodidfärbung zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Der Farbstoff kann nur in tote Zellen eindringen, deren Membran permeabilisiert ist. Tote Zellen können auf diese Weise bei der Messung markiert und ausgeschlossen werden.

3.4.3. Immunoblot-Analyse

Ca. 10^7 Zellen pro Ansatz wurden nach dem Ernten einmal mit PBS gewaschen, in 200µl 1xTBST-Puffer resuspendiert und lysiert. Anschließend wurde das Lysat 5min auf Eis inkubiert. Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (5 min, 15000 Upm, 4°C) abgetrennt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate mit SDS-Probenpuffer versetzt und im Falle des EBNA2-Proteins 10 min lang bei 95°C erhitzt. GM-CSF-haltige Zelllysate wurden nicht erhitzt. Anschließend wurden die Proteine

durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in „mighty small"-Gelapparaturen (Hoefer) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die „BenchMark™ Prestained Protein Ladder" (Life Technologies, Eggenstein) verwendet. Die SDS-PAGE erfolgte bei 35 mA und maximaler Spannung in 12,5%igen SDS-Gelen, die mit Sammelgel überschichtet wurden (Laemmli, 1970). Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des ‚Transphor'-Elektroblotsystems von Hoefer auf eine Hybond-C-Membran (Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 100V innerhalb von 40 min. bei maximalem Strom. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese eine Stunde lang in Blocklösung (PBS + 3%BSA) geschwenkt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper gegen GM-CSF oder EBNA2 in Waschpuffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Vor Zugabe des Zweitantikörpers wurde die Membran fünfmal jeweils 5 min. lang in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in Waschpuffer (anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt bzw. anti-Ratte, HRP-gekoppelt, jeweils Verdünnung 1:10.000) erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h. Der Immunoblot wurde wieder dreimal für 5 min. in Waschpuffer gewaschen. Danach wurde er mit Hilfe von verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

TBST-Puffer:	20mM Tris-HCL (pH 7,5); 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM Phenylmethylsulfonylflourid; 1% TritonX-100
SDS-Probenpuffer (4 fach):	100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 6 % SDS; 20 % Glyzerin; 0,2 % Bromphenolblau
12,5 % SDS-Gel (100 ml):	40,4 ml H_2O; 16,6 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,9); 666 µl 0,5M EDTA; 41,6 ml Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)-Lösung; 700µl Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10%) und 70µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Sammelgel (10 ml):	7,6 ml H_2O; 625 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 100µl 10 % SDS; 1,5 ml Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)-Lösung; 150µl Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10%) und 40µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Transferpuffer:	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,0375% SDS; 20% Methanol
Blocklösung:	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 3 % BSA
Waschlösung:	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1% Tween-20

3.4.4. GM-CSF-ELISA

Der GM-CSF-ELISA wurde zur Bestimmung des von transduzierten B-Zellen sezernierten rekombinanten GM-CSF als auch zur Bestimmung der induzierten

Aktivierung spezifischer CD4-positiver T-Zell-Klone eingesetzt. Die B-Zell-Überstände wurden 1/20 bis 1/160 in Verdünnungsreagenz verdünnt, die T-Zellüberstände dagegen wurden unverdünnt eingesetzt. 96-Loch-Platten der Firma wurden zwei Stunden mit Blocklösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung wurden sie über Nacht mit den Proben in einem Volumen von 100 µl inkubiert. Die Antikörperinkubationen erfolgten nach Angaben des Herstellers in Verdünnungsreagenz (DuoSet ELISA Development System, R&D Systems). Die Substratlösung wurde nach drei weiteren Waschschritten auf die Platten gegeben und die Blaufärbung nach einigen Minuten durch die Stoplösung abgestoppt. Die Farbmessung wurde am ELISA-Photometer TECAN (Tecan, Deutschland) durchgeführt.

PBS:	137mM NaCl, 2,7mM KCL, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,5mM KH_2PO_4, Ph 7,2- 7,4, 0,2µm filtriert
Wasch-Puffer:	0,05% Tween 20 in PBS
Block-Puffer:	1% BSA, 5% Sucrose in PBS mit 0,05% NaAzid
Verdünnungsreagenz:	1%BSA in PBS, 0,2µm filtriert
Substratlösung:	1:1 Mischung ders Color Reagent A (H_2O_2) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidin) (R&D Systems)
Stoplösung:	$2NH_2SO_4$

4. Ergebnisse

Zwei herausragende Eigenschaften machen EBV-Vektoren interessant für eine Anwendung in der Gentherapie. Zum einen können sie B-Lymphozyten spezifisch infizieren und damit therapeutisch wichtige Transgene gezielt in Tumorzellen einbringen. Zum anderen lassen sie sich genetisch in *E. coli* beliebig verändern.

Diese Arbeit besteht aus zwei Teilen. Der erste Teil beschreibt die Entwicklung und Herstellung der rekombinanten EBV-Vektoren, die als Transgen das humane GM-CSF enthalten. Der zweite Teil befasst sich mit der Transduktion von primären humanen B-Lymphozyten und mit der Analyse der biologischen Wirkung des GM-CSF. Für die Entwicklung und Herstellung der GM-CSF-Vektoren musste zunächst ein neuer, universaler EBV-Vektor entwickelt werden, der grundlegende Sicherheitskriterien erfüllt, die eine Anwendung solcher EBV-basierender Genvektoren in der Gentherapie erst ermöglichen dürfte. Um diesen Sicherheitskriterien näher zu kommen, wurden drei EBV-Gene (LMP1, EBNA2 und BZLF1) in den Vektoren deletiert. LMP1 und EBNA2, die beide essenziell für die Immortalisierung von B-Lymphozyten und Tumorentstehung sind, sowie BZLF1, das unabdingbar für die Induktion des lytischen Zyklus von EBV ist und dessen Deletion folglich die Freisetzung von Nachkommenviren aus genetisch transduzierten Zellen wirksam unterbindet. Mit diesen Maßnahmen wurde ein universaler EBV-Vektor generiert, der weder B-Lymphozyten immortalisieren kann - also kein onkogenes Potenzial mehr besitzt - noch sich selber auf andere Zellen übertragen kann. In diesen Grundvektor wurden verschiedene Expressionskassetten für das Zytokin GM-CSF eingebracht. Die Sekretion des Transgens nach Infektion von B-Zelllinien und primären Tumorzellen wurde analysiert, wie auch die Funktionalität des Transgens. Dafür wurde im zweiten Teil der Arbeit ein *in vitro*-Reifungsprotokoll für dendritische Zellen mit nach Gentransfer sezerniertem GM-CSF etabliert und diese ausdifferenzierten Zellen auf ihre immunologische Funktionalität hin in einem neu entwickelten Ansatz getestet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das sezernierte GM-CSF aus Vektor-infizierten B-Lymphozyten biologisch aktiv ist und bei einer GM-CSF-abhängigen Zelllinie Proliferation vermittelt.

4.1. Herstellung der rekombinanten EBV-Vektoren

Durch die Integration eines bakteriellen F-Faktor-Replikons in das Genom des EBV-Stammes B95-8 wurde das gesamte virale Genom des EBV erstmals für jede genetische Manipulation in *E. coli* zugänglich gemacht (Delecluse et al., 1998). Mit diesem Vorgehen wurden in den Bereich der prokaryontischen DNA-Abschnitte zusätzlich die Gene für die Chloramphenicol-Acetyltransferase zur Selektion in *E. coli* sowie für die Hygromycinphosphotransferase zur Selektion in eukaryontischen Zellen eingebracht. Dieses Plasmid mit einer Größe von 180kb ist der Prototyp, der als Maxi-EBV-Plasmid 2089 dem EBV-Wildtyp-Genom entspricht. Dieses Maxi-EBV-Plasmid trägt auch das Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Durch die GFP-vermittelte Fluoreszenz ist eine einfache Identifizierung von erfolgreich transfizierten bzw. infizierten Zellen möglich. Stabil mit p2089 transfizierte HEK293-Zellen ermöglichen die Virusproduktion nach Induktion des lytischen Zyklus von EBV. Die dabei entstehenden Viruspartikel infizieren und immortalisieren effizient primäre humane B-Lymphozyten. Es konnte gezeigt werden, dass das 2089-Virus alle Eigenschaften von Wildtyp-EBV besitzt (Delecluse et al., 1998). Damit eignet sich dieses System sehr gut zur Herstellung von EBV-Vektoren, die noch spezifisch B-Lymphozyten infizieren können.

EBV besitzt zwei Genfamilien, die völlig unabhängig voneinander im latenten oder lytischen Modus des viralen Zyklus exprimiert werden. Die Minorität der Gene im latenten Zyklus - insgesamt werden elf virale Gene detektiert – stellt die latente Infektion sicher, die vor allem in primären humanen B-Lymphozyten zur Immortalisierung dieser Zellen führt. In dieser Phase, in der die Zellen *in vitro* unlimitiert proliferieren, sichert das virale Gen EBNA1 die extrachromosomale DNA-Replikation des EBV-Genoms und die Aufrechterhaltung in den sich teilenden Zellen. Die anderen latenten Gene sind für die Proliferationskontrolle der latent infizierten B-Zellen essenziell. Ganz im Gegensatz zu dieser für EBV charakteristischen latenten Infektion, geht die Induktion des lytischen Zyklus mit der Expression der Mehrzahl aller EBV-Gene (ca. 80) einher. Diese Gene sind unabdingbar für die Virusproduktion und die Herstellung von Nachkommenviren (oder Genvektoren). EBV besitzt damit eine klare Dichotonie. Diese Situation erlaubt es auch, gezielt ‚erwünschte' von ‚potenziell gefährlichen' Genen zu trennen. So sind z.B. alle latenten Gene, die

potenziell onkogene Wirkungen haben bis auf EBNA1 entbehrlich für die Herstellung viraler Genvektoren. Diese Gene können in EBV-abgeleiteten Genvektoren deletiert werden. Der lytische Zyklus wiederum ist temporal strukturiert, d.h. es kommt zu einer kaskadenartigen Expression von Genfamilien, die als ‚immediate early', ‚early' und ‚late' bezeichnet werden. Der lytische Zyklus von EBV unterscheidet sich nur in Einzelheiten von dem anderer Herpesviren, so dass es konzeptionell sehr nahe lag, ein Schlüsselgen aus der Familie der ‚immediate early'-Gene als weiteres Sicherheitskriterium für meine EBV-abgeleiteten Genvektoren auszuschalten. So ein Schlüsselgen bei EBV stellt das BZLF1-Gen dar, das als molekularer Schalter den Übergang von der latenten zur lytischen Phase kontrolliert und zum anderen absolut essenziell für die DNA-Replikation ist.

Ziel meiner Arbeit war es deshalb, die Gene zu entfernen, die essenziell für Immortalisierung und Tumorentwicklung und für die Induktion des lytischen Zyklus sind. p2089 diente als Ausgangsplasmid für die später beschriebene Dreifachdeletionsmutante (ΔEBNA2, ΔLMP1, ΔBZLF1), die durch homologe Rekombination in *E. coli* entstanden ist. Drei GM-CSF-Vektoren sind durch die gleichzeitige Deletion von BZLF1 und der Insertion von GM-CSF entstanden (p2698, p2699, p2700). Sie tragen das Transgen anstelle des BZLF1-Gens. Bei zwei weiteren GM-CSF–Vektoren wurden die GM-CSF-Expressionskassetten erst in die Dreifachmutante inseriert. Hier befindet sich das GM-CSF entweder anstelle des offenen Leserahmens für EBNA2 (p2965) oder in der Nähe des bakteriellen F-Faktors (p2660). Die EBV-Vektoren wurden abhängig von den Vorkonstrukten über drei verschiedene Klonierungstechniken hergestellt, die aber alle auf homologer Rekombination in *E. coli* beruhen.

4.1.1. Homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183

Der *E. coli*-Stamm BJ5183 eignet sich aufgrund seines *rec*A-positiven, *rec*BC-negativen Genotyps zur homologen Rekombination eines linearen DNA-Fragments. Die relative Stabilität linearer DNA wird durch das Fehlen einer funktionellen ExonukleaseV (*rec* BCD) gewährleistet. Als konventionelles Ausgangsplasmid für die Mutation von BZLF1 im Maxi-EBV p2510 diente p2088, das für die BZLF1-Deletion und das Kanamycin-Gen kodiert. Nach Transformation des linearen Fragments von

p2088 in den p2510/Maxi-EBV tragenden *E. coli*-Stamm BJ5183 (Abb.4.1) wurden doppelresistente (Chloramphenicol/Kanamycin) Kolonien selektioniert. Die Plasmid-DNA konnte durch Restriktionsenzymanalysen anschließend überprüft werden (siehe Anhang Abb.A). Um das rekombinante Maxi-EBV genetisch zu stabilisieren, musste die Plasmid-DNA in den *rec*A-negativen *E. coli*-Stamm DH10B überführt und dessen Integrität erneut überprüft werden. Auf diese Art und Weise wurde die Dreifachdeletionsmutante p2575 hergestellt, der die EBV-Gene EBNA2, LMP1 und BZLF1 fehlen und die als Ausgangskonstrukt für drei GM-CSF-Vektoren diente.

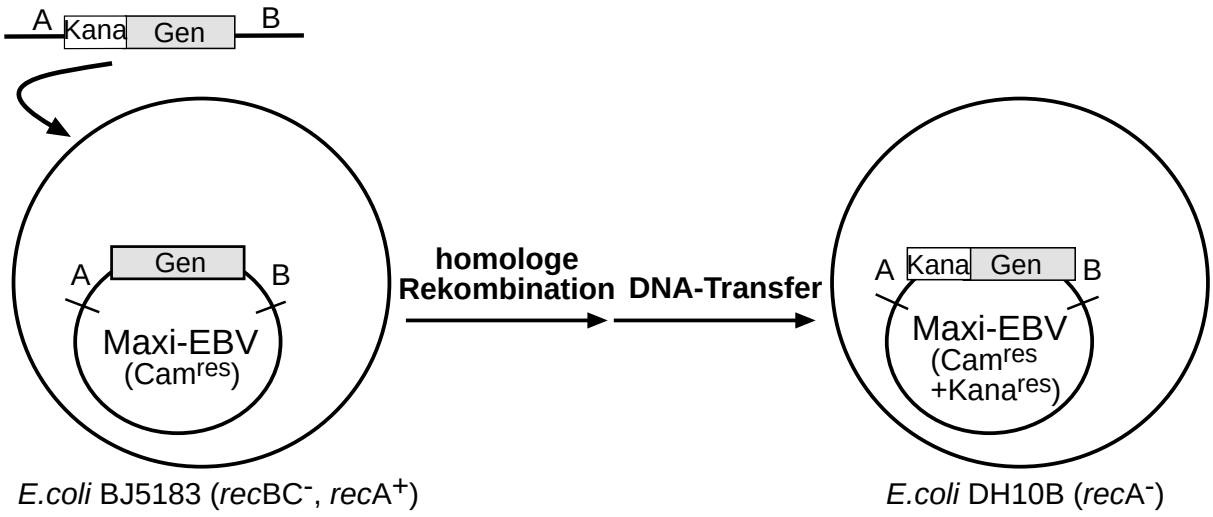


Abb.4.1: Manipulation des Maxi-EBV Genoms durch homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183

Die Abbildung zeigt schematisch ein Maxi-EBV-Plasmid im *E. coli*-Stamm BJ5183. Das lineare Fragment, das über konventionelle Klonierung hergestellt wird, ist von zwei jeweils mindestens 200bp langen homologen Sequenzen (A/B) flankiert und trägt das durch eine Antibiotikaresistenz (Kanamycin, Kana) unterbrochene Zielgen. Nach Selektion von doppelresistenten (Cam/Kana) Kolonien wird die veränderte Maxi-EBV-DNA in den *rec*A-negativen Stamm *E. coli* DH10B transferiert, um die DNA in einem *rec*A-minus Hintergrund genetisch zu stabilisieren.

4.1.2. Homologe Rekombination in *E. coli* DH10B

Als alternative Strategie wurde während dieser Arbeit ein temperatursensitives (ts) Rekombinationssystem entwickelt (B.Neuhierl, Abt. Genvektoren, GSF). Dadurch wird der zusätzliche Arbeitsschritt des DNA-Transfers in einen *rec*A-negativen *E. coli*-Stamm obsolet (Abb.4.2). Der *E. coli*-Stamm DH10B enthält neben dem Maxi-EBV p2510 (Doppelmutante, ΔEBNA2, ΔLMP1) das temperatursensitive Plasmid p2650, das für die Rekombinase RecA und den ExonukleaseV-Inhibitor Redγ

(Muyrers et al., 2000) kodiert. Die Replikation des ts-ori-Plasmids erfolgt bei der permissiven Temperatur von 30°C. Dieses Plasmid vermittelt zusätzlich die Resistenz gegen Ampicillin. Nach Transformation des linearen DNA-Fragments und phänotypischer Expression bei 30°C, während der die homologe Rekombination stattfinden kann, wurden doppelresistente Kolonien bei 42°C stabil in *E. coli* DH10B propagiert (Chloramphenicol für das Maxi-EBV/ Kanamycin für die eingeführte Mutation). Da bei 42°C, der nicht-permissiven Temperatur das ts-ori-Plasmid p2650 spontan verloren geht, konnte der erwartete Phänotyp (Cam^{res}, $Kana^{res}$, Amp^{sens}) leicht überprüft werden. Die meisten der GM-CSF-Vektoren sind durch diese Methode entstanden. Dazu gehören p2698 (GM-CSF/BCMGS-Vektor), p2699 (CMVp/GM-CSF/pRK5-Vektor), p2700 (SFFp/GM-CSF/pRK5-Vektor) und p2660 (GM-CSF/IRES/GFP-Vektor).

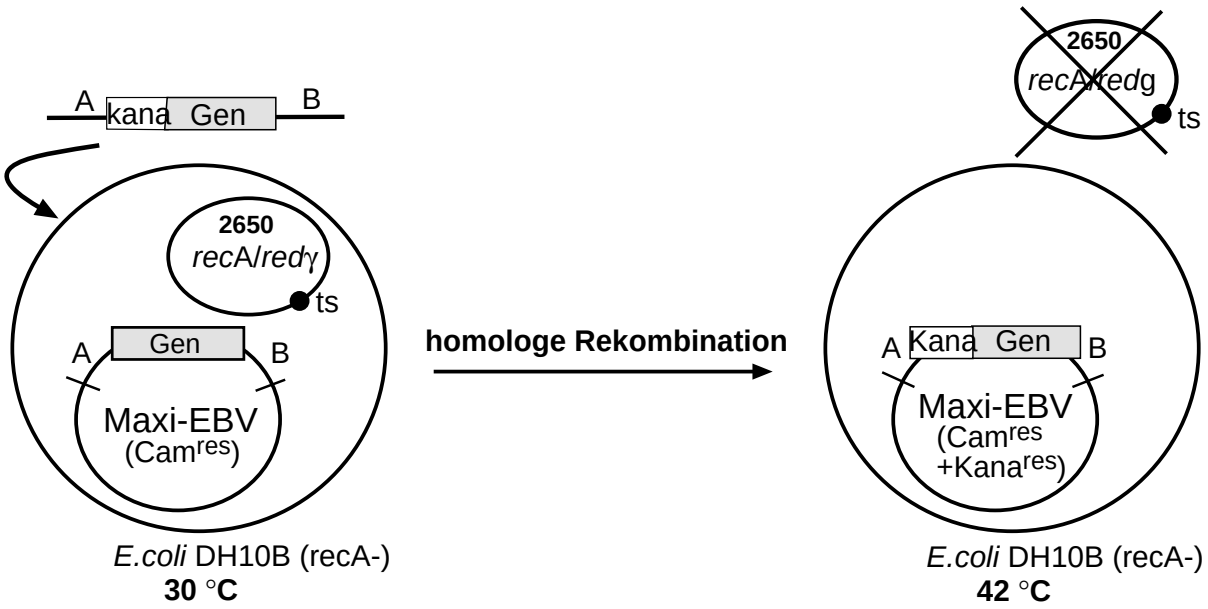


Abb.4.2: ‚One-Step'-Mutation des Maxi-EBV-Genoms durch homologe Rekombination in *E. coli* DH10B

Die Abbildung zeigt schematisch ein Maxi-EBV-Plasmid und das Plasmid p2650 im *E. coli*-Stamm DH10B. Das temperatursensitive (ts) Plasmid p2650 repliziert nur autonom bei der permissiven Temperatur von 30°C und kodiert für das *E. coli* Protein recA und das Phagen-Protein redγ. Redγ blockiert die zelluläre ExonukleaseV in *E. coli* und sorgt damit für eine längere Halbwertszeit des linearen DNA-Fragments. Das *rec*A-Protein hingegen sorgt für die effiziente homologe Rekombination im *rec*A-defizienten *E. coli*-Stamm DH10B. Durch den Einsatz eines temperatursensitiven Rekombinationssystems, das recA über ein weiteres Plasmid einführen kann, wird der zusätzliche Arbeitsschritt des DNA-Transfers in einen *rec*A-negativen Bakterienstamm wie bei Abb.4.2. obsolet. Eine stabile Replikation des ts-ori-Plasmids erfolgt nur bei 30°C, bei 42°C geht es spontan verloren. Nach Transformation des linearen DNA-Fragments und entsprechend langer phänotypischer Expression bei 30°C können Kolonien direkt unter Doppelselektion (Cam/Kana) bei 42°C selektioniert und stabil in *E. coli* DH10B propagiert werden.

4.1.3. ‚chromosomal building'

Die Technik des ‚chromosomal building' (Muyrers et al., 2000) beruht ebenfalls auf homologer, ortsspezifischer Rekombination in *E. coli* (Abb.4.3). Hierbei wird ein ‚shuttle-Plasmid' benötigt, das das mutierte Gen im Kontext flankierender EBV-Sequenzen trägt. Die flankierenden Sequenzen sind homologe Regionen (A, B) mit einer Länge von 3-4kb, die zur homologen Rekombination im maxi-EBV-Genom dienen. Darüber hinaus kodiert das ‚shuttle-Plasmid' für die Resistenz gegen Ampicillin (Amp^{res}) und hat einen temperatursensitiven Replikationsursprung (ts-ori). Die Rekombination wird vermittelt durch ein weiteres Plasmid, p2581, das neben einer Kanamycin-Resistenz ($Kana^{res}$) und einem ts-ori das *rec*A-Gen trägt. Nach einer phänotypischen Expression bei 30°C, bei der die homologe Rekombination stattfinden kann, erfolgt eine Temperaturerhöhung auf 42°C, bei der das entstandene Kointegrat stabil in *E. coli* vorliegt. Die beiden tempertursensitiven Plasmide gehen dabei verloren. Das doppelresistente (Chloramphenicol/Ampicillin) Kointegrat kann durch Restriktionsenzymanalysen auf seine genetische Integrität und die Aufnahme des ‚shuttle-Plasmids' untersucht werden. Es entstehen zwei Varianten des Kointegrats, je nachdem ob die homologe Rekombination zuerst über den Homologiebereich A oder B stattfindet. Im Idealfall sollte die Verteilung jeweils 50% betragen. Das Kointegrat wird durch die Expression des *rec*A, also durch nochmaliges Einführen von p2581 aufgelöst, und der Verlust des im Kointegrat integriert-vorliegenden ‚shuttle-Plasmids' durch den Verlust der Resistenz gegen Ampicillin phänotypisch sichtbar (Cam^{res}, $Kana^{ses}$, Amp^{sens}). Über Restriktionsenzymanalysen kann wiederum der Einbau der Mutation und der Verlust des shuttle-Plasmids überprüft werden. Der Vorteil des Systems liegt darin, dass außer des modifizierten Gens keine zusätzlichen überflüssigen Strukturen wie z.B. Resistenzgene im EBV-Vektor enthalten bleiben. Dieser Ansatz eignet sich daher insbesondere für konsekutive Mehrfachdeletionen. Allerdings ist er zeitaufwendiger als die Rekombination in *E. coli* DH10B über lineare Fragmente, da es sich um eine Prozedur von mehreren Schritten handelt. Hergestellt wurden mit dieser Technik die EBNA2-Deletion (p2491), die Doppelmutante (ΔEBNA2, ΔLMP1= p2510) und der *Wp*-GM-CSF-Vektor (p2965).

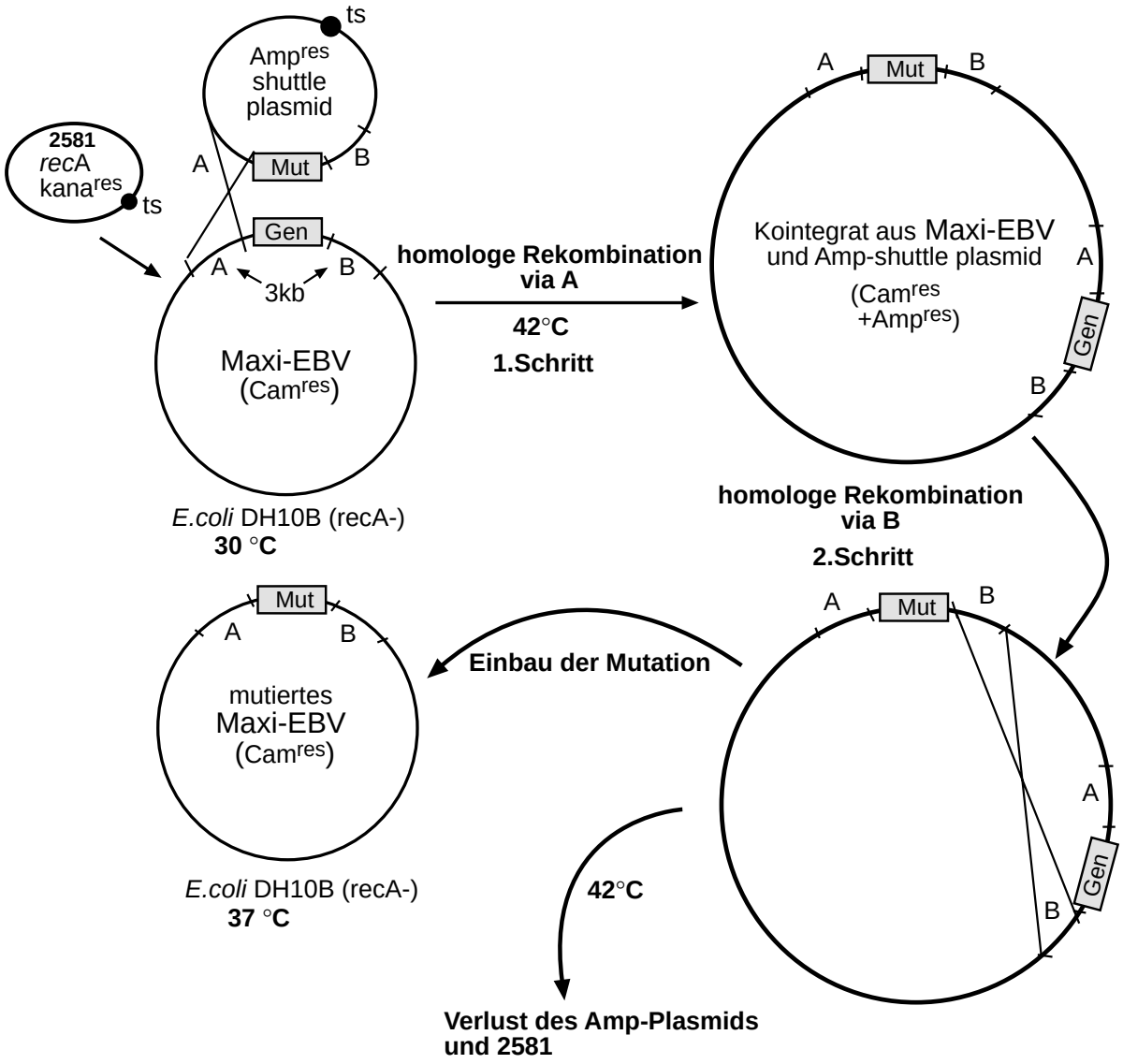


Abb. 4.3: Genetische Modifikation des Maxi-EBV Genoms durch homologe Rekombination über ‚chromosomal building'

Die Abbildung zeigt schematisch das Chloramphenicol–resistente Maxi-EBV-Plasmid im *E. coli*-Stamm DH10B. Das zu modifizierende Gen wird von den ca. 3kb langen homologen Bereichen **A**/**B** flankiert. Das Ampicillin (Amp)-resistente und temperatursensitive (ts) ‚shuttle-Plasmid' trägt die Mutation bzw. Deletion mit den selben flankierenden Bereichen. Zusätzlich wird ein weiteres Kanamycin (kana)-Resistenz-Plasmid eingeführt, das für recA kodiert und das ebenfalls temperatursensitiv (ts) ist. Im ersten Schritt kann nach Elektroporation des ‚shuttle-Pasmids' über eine Doppelresistenz (Cam/Amp) auf das Kointegrat aus Maxi-EBV und ‚shuttle-Plasmid' selektioniert werden, das durch homologe Rekombination zwischen den ‚**A**'-Sequenzen beider Plasmide entstanden ist. In einem zweiten Schritt, der Resolvierung, wird das Kointegrat durch homologe Rekombination über **B** wieder aufgelöst. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 42°C geht das temperatursensitive, *rec*A-kodierende Plasmid verloren und das genetisch modifizierte Maxi-EBV liegt stabil in *E. coli* DH10B vor.

4.1.4. Etablierung der Dreifachdeletionsmutante als sicheren EBV-Genvektor

Drei wesentliche Gene des Epstein-Barr Virus wurden deletiert, um die nötigen Sicherheitsaspekte für eine spätere Anwendung in der Gentherapie zu erfüllen. LMP1 als latentes EBV-Gen wird als essenziell für die EBV-vermittelte Immortalisierung von B-Lymphozyten betrachtet (Kieff et al., 2001) (Kilger et al., 1998) und wirkt *in vivo* als potenzielles Onkogen (Kulwichit et al., 1998) (Wang et al., 1985; Wilson et al., 1990). Es ist als einziges EBV-Protein in der Lage, auch in nicht lymphoiden Zelllinien Zelltransformation zu vermitteln (Baichwal et al., 1988). EBNA2 spielt ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten. Es wird sehr früh in der Infektion exprimiert und wirkt als Koaktivator bei der Transkription von zellulären und viralen Genen wie LMP1, 2A und 2B und des viralen C-Promotors (Cp). Kürzlich wurde erst gezeigt, dass das Onkogen c-myc wahrscheinlich das wichtigste Zielgen von EBNA2 ist. Dieser Effekt dürfte eine entscheidende Rolle bei der EBV-vermittelten B-Zellproliferation spielen (Jayachandra et al., 1999; Jochner et al., 1996; Kaiser et al., 1999). BZLF1 gehört zu den *immediate-early*-Proteinen und spielt die Rolle des Transaktivators der produktiven Virusvermehrung von EBV in permissiven Zellen. Es bindet spezifisch an den lytischen Replikationsursprung von EBV (oriLyt) und induziert so die Initiation der lytischen Genomreplikation (Hammerschmidt et al., 1988; Schepers et al., 1996). Darüber hinaus stellt es den essenziellen molekularen Schalter dar, der für die Initiation der lytischen Phase und die Expression der Produkte der lytischen Genfunktion unabdingbar ist. Diese drei Gene (LMP1, EBNA2 und BZLF1) wurden nacheinander auf dem Maxi-EBV-Plasmid deletiert. Das rekombinante Virus der Doppelmutante (ΔEBNA2, ΔLMP1= p2510) kann B-Lymphozyten zwar infizieren, aber es wachsen *in vitro* keine immortalisierten B-Lymphozyten aus. Wird desweiteren BZLF1 deletiert, so ist keine spontane Induktion des lytischen Zyklus in den infizierten B-Lymphozyten möglich.

Die Doppelmutante p2510 lag als Ausgangskonstrukt für diese Arbeit vor. Die Deletion von BZLF1 wurde über homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183 in die Doppelmutante p2510 eingeführt. Im Ausgangsplasmid für die homologe Rekombination wurde der offene Leserahmen von BZLF1 dafür durch das

Kanamycin-Resistenzgen unterbrochen. Dieses ist von zwei FRT-Rekombinationssequenzen flankiert, die das Entfernen der Resistenz nach Rekombination ermöglichen, indem die FLIP-Rekombinase aus dem Hefeplasmid ‚two-micron-circle' in *E. coli* exprimiert wird. Dies hat den klonierungsstrategischen Gesichtspunkt, dass kein unnötiges Resistenzgen auf dem Plasmid erhalten bleibt. Außerdem kann dasselbe Resistenzgen, das bereits einmal verwendet wurde, für ein weiteres Rekombinationsereignis, das heißt eine weitere Deletion oder Insertion, eingesetzt werden. Zu beiden Seiten des Resistenzgens befinden sich EBV-Sequenzen, über die die homologe Rekombination stattfindet (Abb.4.1). Die Insertion des mutierten Fragments an der richtigen Stelle bzw. die Deletion des Gens wurde durch Restriktionsenzymanalyse und Southern-Blot-Hybridisierung überprüft (siehe Anhang I, Abb.A). Die Doppel- wie auch die Dreifachmutante dienten als Ausgangsvektor für die Einführung von GM-CSF-Expressionskassetten in die EBV-Vektoren.

4.2. Einführung des Transgens GM-CSF in die EBV-Vektoren

4.2.1. Klonierung der Expressionskassetten mit GM-CSF unter der Kontrolle verschiedener Promotoren

Die fünf von mir in dieser Arbeit hergestellten GM-CSF-Vektoren unterscheiden sich prinzipiell in zwei Punkten. Zum einen wurde der Ort der Insertion im EBV-Genom variiert. Zum anderen ist der offene Leserahmen für das humane GM-CSF in unterschiedlichen Expressionskassetten integriert, die von verschiedenen Promotoren angetrieben werden. In drei Fällen wurde der Cytomegalievirus-Promoter/Enhancer (CMVp) verwendet, der bei der Mehrzahl der klassischen Expressionsplasmide die Expression des Transgens sichert. Darüber hinaus habe ich zur Expression des GM-CSF-Gens den retroviralen LTR-Promotor des Spleen-Focus-Forming-Virus (SFFp) und den *Wp*-Promotor von EBV eingesetzt. Die Expressionskassetten wurde an der Stelle des deletierten BZLF1-Gens integriert, an der Stelle des EBNA2-Gens oder des F-Faktor-Replikons eingebaut. Das 5,3 kb grosse **pIRES-EGFP-**Plasmid (Firma Clontech) besitzt die ‚internal ribosomal entry site' (IRES) des Encephalomyocarditisvirus. Die Expressionskassette enthält einen

einzigen Promotor, der über die IRES-Region die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA erlaubt (bicistronische Expression). Das humane GM-CSF und das GFP-Protein werden somit von der gleichen Boten-RNA exprimiert. In der Praxis zeigte sich allerdings, dass das zweite Protein - in diesem Fall GFP- schwächer exprimiert wird und daher die Zellen mit geringerer Intensität grün leuchten als bei einer direkten Expression über den CMV-Promotor. Der **BCMGS**-Vektor (Karasuyama et al., 1990) ist komplexer aufgebaut. Er enthält neben dem CMV-Promotor ein Intron aus dem Kaninchen-β-Globingen sowie Sequenzen des humanen β-Globingens. Dieses ist wahrscheinlich verantwortlich für eine erhöhte Stabilität der mRNA und damit einer höheren Expressionsrate des Proteins. Expressionsstudien in Tumorzellen mit dem BCMGS-Vektor haben gezeigt, dass dieser bis zu 10ng/10^6 Zellen/24 Stunden *in vitro* sezernieren kann (Strehl et al., 1999). Die in diesem Vektor enthaltenen Sequenzen des Bovinen Papillomavirus wurden deletiert, um keine Interferenzen mit regulatorischen Elementen von EBV hervorzurufen. Ein weiterer verwendeter Expressionsvektor ist der **pRK5**-Vektor. Die Expression des inserierten GM-CSF wird hier ebenfalls vom CMV-Promotor angetrieben. Vor der Insertionsstelle befindet sich eine nicht-translatierte Region von ca. 300 Basenpaaren, die verantwortlich sein dürfte für eine höhere Transkriptionseffizienz oder einen verbesserten mRNA-Export. In diesem Expressionsvektor wurde der CMV-Promotor als weitere Option ausgetauscht gegen den LTR-Promotor des ‚Spleen-Focus-Forming-Virus', der einen retroviralen Enhancer enthält, der sich besonders gut für die Genexpression in myeloiden hämatopoetischen Zellen eignen sollte (Baum et al., 1997). In Abbildung 4.4 sind die verschiedenen Expressionskassetten graphisch dargestellt.

Um die Integrität der Expressionskassetten auf plasmidaler Basis zu überprüfen, wurden die Plasmide transient in HEK293-Zellen transfiziert und die Expression des GM-CSF-Proteins im Immunoblot nachgewiesen (siehe Methoden 3.2.5 und 3.4.3). Da das Protein normalerweise an die Oberfläche transportiert und sezerniert wird, musste der Transport inhibiert werden. Dies wurde mit Brefeldin A durchgeführt, das reversibel den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat inhibiert, indem es die Vesikelbildung stört (Klausner et al., 1992)

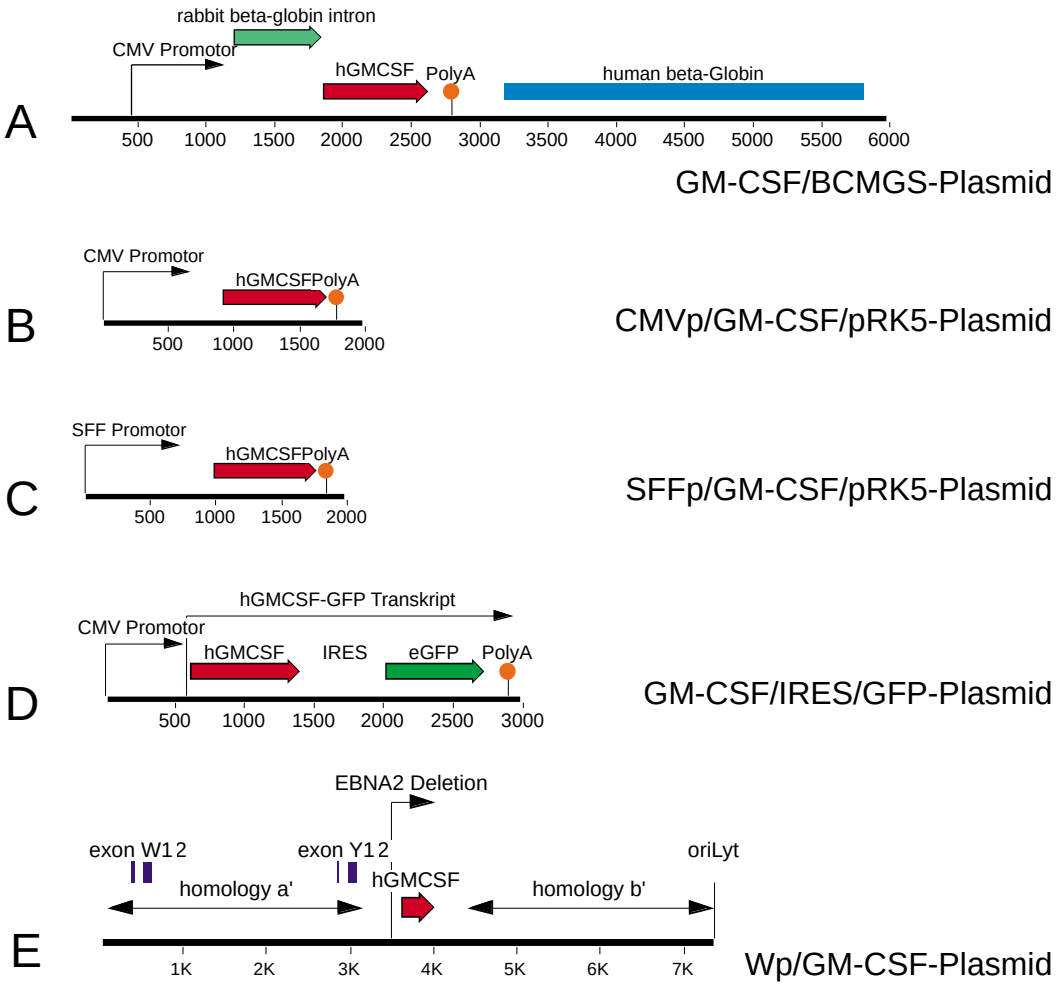


Abb.4.4: Verschiedene Expressionsvektoren für humanes GM-CSF

Dargestellt ist der offene Leserahmen von GM-CSF unter der Kontrolle verschiedener heterologer Promotoren und anderer cis-aktiver Elemente. (**A**) Das BCMGS-Plasmid enthält Kaninchen-β-Globin-Sequenzen und Teile des humanen β-Globingens. Die Expression des GM-CSF erfolgt vom CMV-Promotor. In (**B**) und (**C**) sind Derivate des pRK5-Expressionsvektors dargestellt. Im ersten Fall wird GM-CSF vom CMV-Promotor aus exprimiert, im zweiten von einem retroviralen LTR (Long Terminal Repeat)–Promotor (SFFp) des ‚*Spleen-Forming-Focus-Virus'*. In (**D**) handelt es sich um den IRES-GFP-Vektor der Firma Clontech, der die beiden offenen Leserahmen des Zielgens und des GFP von einer bicistronischen mRNA transkribiert. Der Promotor stammt vom humanen Cytomegalovirus CMV. In (**E**) steht das GM-CSF-Gen unter der Kontrolle des authentischen EBV-*W*-Promotors, der neben anderen EBV-Genen EBNA2 exprimiert. Das humane GM-CSF wurde exakt hinter das Startkodon des EBNA2-Gens kloniert, EBNA2 damit deletiert. Diese Plasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert bzw. über Elektroporation in DG75-B-Zellen eingebracht, um die Expression von GM-CSF zu überprüfen (siehe Abb.4.5). Für die homologe Rekombination wurden diese Expressionskassetten dann mit Hilfe von Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in die Vorläuferkonstrukte mit den notwendigen homologen Bereichen bzw. Resistenzen transferiert (siehe Methoden 3.3.1).

(Hartmann et al., 1999). Damit konnte GM-CSF in der Zelle nachgewiesen werden. Als weitere Zelllinie wurde DG75 verwendet, eine EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zellline. Da diese Zelllinie mit Reagenzien wie z.B. Lipofectamin schlecht transfizierbar ist, wurden die Plasmide über Elektroporation (siehe Methoden 3.2.6) in die Zellen eingebracht. Als Transfektionskontrolle wurde jeweils das Ds-Red2-

Plasmid verwendet, das für einen rot-fluoreszierenden Farbstoff kodiert. In Abbildung 4.5 ist die Expression von GM-CSF ausgehend von den Expressionsplasmiden im Immunoblot nachgewiesen. Um intrazelluläres GM-CSF in der Zelle darzustellen, wurden diese mit Brefeldin A behandelt. Um dagegen das Protein im Überstand nachzuweisen, wurden die Zellen ohne Brefeldin A inkubiert. Bis auf das SFFp/pRK5-Konstrukt waren alle Expressionskassetten funktionell und zeigten eine deutliche Produktion von GM-CSF. Das SFFp/pRK5-Konstrukt war weder in der HEK293-Zelllinie noch in der B-Zelllinie funktionell. Da der Grund nicht ersichtlich war und primäre B-Lymphozyten oftmals andere Promotoren bedienen, wurde das Konstrukt dennoch in den EBV-Vektor eingesetzt. Die höchsten Expressionsraten erzielte das CMVp/pRK5-Konstrukt in HEK293-Zellen. In der DG75-B-Zelllinie exprimierten das CMVp/pRK5-Konstrukt, das BCMGS-Konstrukt und das IRES-Konstrukt ähnlich gut GM-CSF.

Bei der Infektion von B-Lymphozyten mit Epstein-Barr Virus ist EBNA2 als eines der ersten viralen Genprodukte bereits wenige Tage nach der Infektion deutlich exprimiert. EBNA2 besitzt einen starken, in primären B-Lymphozyten aktiven Promotor (Yoo et al., 1997) und wirkt als Transaktivator für viele virale und zelluläre Proteine. Infektionsversuche von B-CLL-Zellen mit B95-8 (Teramoto et al., 2000) (Maeda et al., 2001) haben gezeigt, dass diese zwar EBNA2 neben anderen EBV-Genen exprimieren, aber *in vitro* keine Immortalisierung stattfindet, da das virale LMP1 und die zellulären Gene p53 und c-myc nicht exprimiert werden und kein Eintritt in den Zellzyklus erfolgt. Der EBNA2-Promotor ist aber aktiv und das Protein 24 Stunden nach Infektion nachweisbar. Dies konnte ebenfalls nach Infektion von verschiedenen B-CLL-Zellproben mit Wildtyp-Maxi-EBV (2089) in dieser Arbeit gezeigt werden. In Abbildung 4.6 ist der Nachweis von EBNA2 nach einer zweitägigen Infektion von drei verschiedenen B-CLL-Zellproben mit 2089 im Immunoblot und nach einer dreitägigen Infektion in der Durchflusszytometrie dargestellt. Im Immunoblot ergibt sich bei ca. 75 kDa eine spezifische Bande für EBNA2, die durch die Positivkontrollen der per se EBV-positiven Raji-Zelllinie und einer mit 2089 immortalisierten LCL-Linie bestätigt werden konnte.

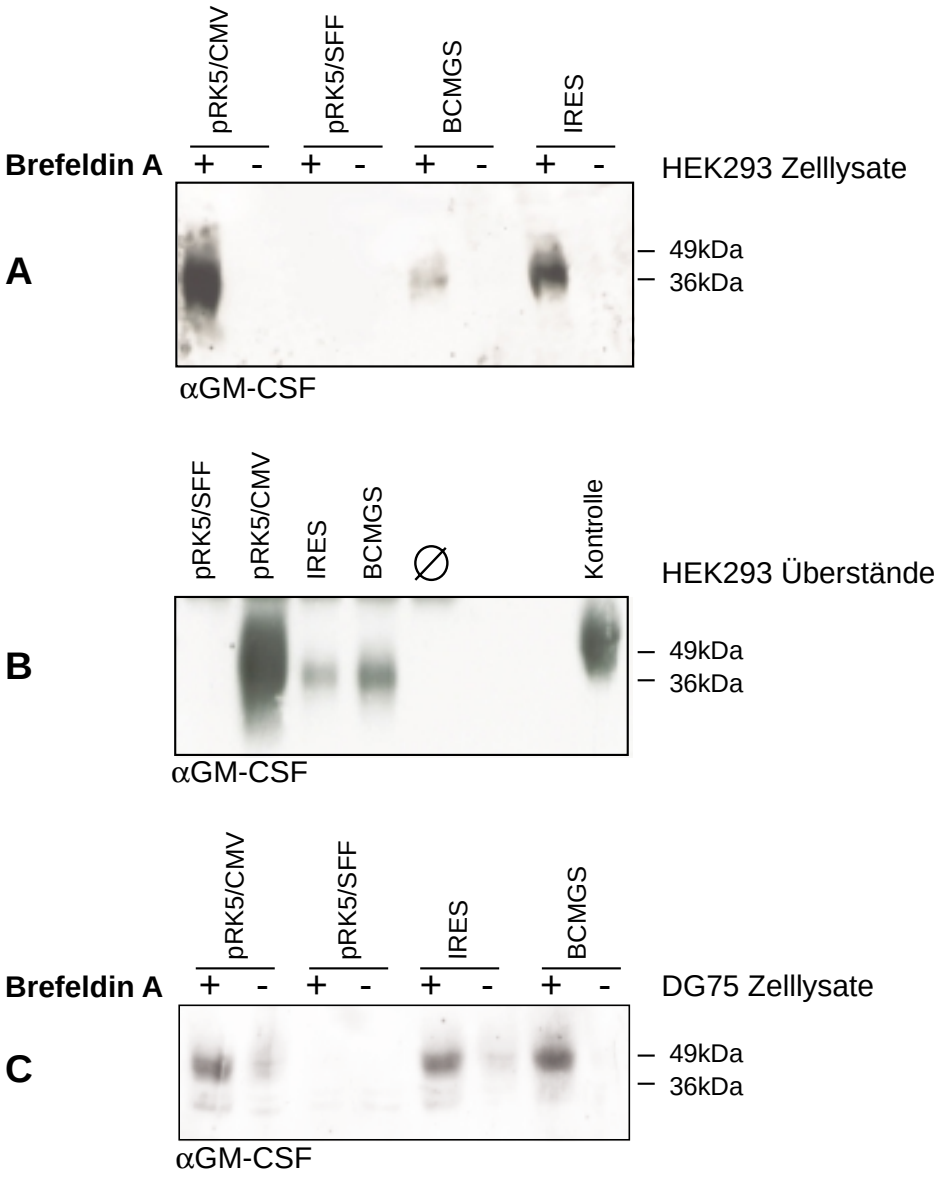


Abb.4.5: Überprüfung der GM-CSF-Expressionsplasmide in HEK293-Zellen und DG75-B-Zellen

Die Funktionalität der GM-CSF-Expressionskassetten sollte mit Hilfe transienter Transfektionen mit den konventionellen Expressionsplasmiden in einer Nierenepithelzelllinie (HEK293) und einer B-Zelllinie (DG75) überprüft werden. HEK293-Zellen wurden mit 1 μg des jeweiligen Plasmids transient transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Zugabe von 5 μg/ml Brefeldin A für 5 Stunden. Es wurden parallel Transfektionen mit und ohne Brefeldin A angesetzt. Die Zelllysate mit und ohne Brefeldin A (**A**) sowie die Zellkulturüberstände ohne Brefeldin A (**B**) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, und GM-CSF im Immunoblot mit Hilfe gereinigter polyklonaler Antikörper nachgewiesen. Als Transfektionskontrolle wurden jeweils 100ng des Ds-Red2–Plasmids mittransfiziert. Durchschnittlich wurde eine Transfektionseffizienz von ca. 50-70 % erreicht. In (**C**) sind Parallelansätze der Elektroporation von DG75-B-Zellen mit und ohne 5μg/ml Brefeldin A für 16 Stunden gezeigt. Die Elektroporation erfolgte bei 200V, 1mF und 100Ω. Die B-Zellen wurden insgesamt 48 Stunden inkubiert. Auch hier wurde das Ds-Red2-Plasmid zur Kontrolle der Transfektionseffizienz verwendet.

Alle Plasmide bis auf das pRK5-Konstrukt mit SFF-Promotor exprimieren das rekombinante GM-CSF und sezernieren es in den Zellkulturüberstand. Der Transport des sezernierten Proteins an die Zelloberfläche kann mit Hilfe von Brefeldin A gehemmt werden. Der SFF-Promotor scheint sowohl in den HEK293-Zellen als auch der DG75-B-Zelllinie nicht funktionell zu sein, dagegen zeigt das

Expressionsplasmid pRK5/CMV in HEK293-Zellen die höchste Expression. In der DG75-B-Zelllinie hingegen scheinen alle drei Expressionsplasmide (pRK5/CMV, BCMGS und IRES) ähnlich gut GM-CSF zu exprimieren. Da es sich bei den mit den GM-CSF-Vektoren transduzierten Zellen um eine B-Zelllinie handelt, sind ähnliche Ergebnisse in anderen, auch primären B-Lymphozyten zu erwarten.

In der Durchflusszytometrie ist der Anteil der infizierten Zellen anhand der GFP-Expression des Wildtyp-Maxi-EBV (2089) gegen die intrazelluläre Färbung von EBNA2 aufgetragen. Warum dabei eine relativ geringe doppelt-positive Population entsteht, jedoch zwei deutliche GFP-bzw. EBNA2-positive Populationen, ist nicht ganz klar, aber möglicherweise auf die zwei unterschiedlichen Promotoren (CMVp für GFP und *W*pr für EBNA2) zurückzuführen. Es könnte sein, dass diese beiden Promotoren in unterschiedlichen B-Zell-Populationen aktiv sind. Mit diesem Befund entstand die Idee, in der Dreifachdeletionsmutante den EBNA2-Promotor (*W*-Promotor) für die Expression des Transgens GM-CSF zu nützen. In einer solchen Konstellation wird das Transgen von dem autologen EBV-Promotor exprimiert. Dazu wurde wie im Methodenteil 3.3.1 kurz erklärt, der offene Leserahmen des GM-CSF über PCR in den Kontext der EBNA2-Deletion des Maxi-EBV Genoms gesetzt (p2959). Gleichzeitig wurde vor dem Startcodon eine Kozak-Sequenz eingefügt, um das Expressionsniveau des Transgens noch weiter zu erhöhen. Rechts und links des GM-CSF-Gens befinden sich zum EBV-Genom homologe Bereiche, die für die homologe Rekombination beim ‚chromosomal building' notwendig sind. Die Integrität der Expressionskassette konnte anhand von diesem Plasmid (p2959) nicht in HEK293-Zellen überprüft werden, da der EBV-Promotor dort nicht aktiv ist (Abbildung 4.4 zeigt die Expressionskassette). Nach Umklonieren in den pRK5-Vektor konnte aber gezeigt werden, dass das GM-CSF mit der Kozak-Sequenz in HEK293-Zellen exprimiert und sezerniert wird (nicht gezeigte Daten). Ob der *W*-Promotor das GM-CSF im Kontext der Dreifachdeletionsmutante exprimiert, kann erst nach Infektion von B-Lymphozyten mit dieser Maxi-EBV-Mutante vollständig beurteilt werden.

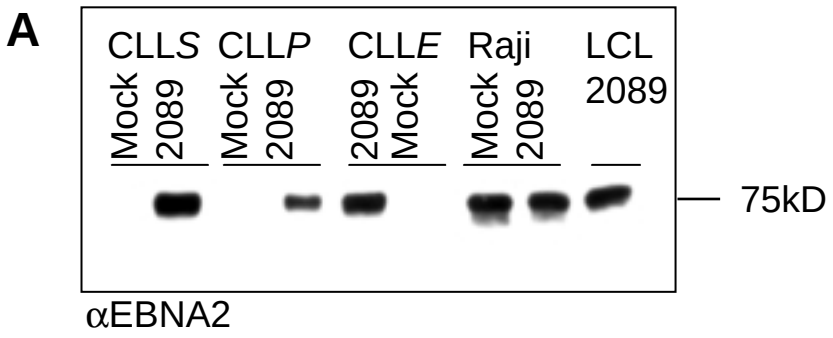


Abb.4.6.A: Nachweis der EBNA2-Expression in B-CLL-Zellen nach EBV-Wildtyp-Infektion

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Expression von EBNA2 nach Infektion von B-CLL-Zellen mit Wildtyp-EBV zu untersuchen. EBNA2 ist das erste Genprodukt, das nach Infektion primärer Zellen mit EBV exprimiert wird, die Expression in B-CLL-Zellen würde die Eignung des EBNA2-Promotors für die Expression von GM-CSF in diesen Zellen unterstreichen. In der Abbildung ist die Expression von EBNA2 in verschiedenen Präparationen von B-CLL-Zellen (Patient S, P und E) nach EBV-Wildtyp-Infektion dargestellt. (**A**) 2,5x10^6 Zellen wurden drei Tage mit 2089 (WT-EBV, MOI ≈0,3) infiziert und die Zelllysate im SDS-PAGE aufgetrennt. Der αEBNA2-Antikörper zeigt im Immunoblot eine spezifische Bande bei ca. 75 kDa. Als Kontrolle dient sowohl die EBV-positive B-Zelllinie Raji, die konstitutiv EBNA2 exprimiert, als auch eine LCL-Linie, die durch Immortalisierung von primären B-Lymphozyten mit 2089 entstanden ist.

4.2.2. Transfer der Expressionskassetten in die Dreifachdeletionsmutante

Im Verlauf dieser Arbeit wurden fünf unterschiedliche GM-CSF-Vektoren hergestellt, die alle auf der Dreifachdeletionsmutante (ΔEBNA2, ΔLMP1, ΔBZLF1) beruhen. Da aber die Insertionsstelle des Transgens im EBV-Genom variiert, wurden als Ausgangsvektor für die GM-CSF-Insertion unterschiedliche Deletionsmutanten verwendet. Bei den GM-CSF-Vektoren p2698, p2699 und p2700, wurde ausgehend von der Doppeldeletionsmutante p2510, gleichzeitig das BZLF1-Gen deletiert und an derselben Stelle die GM-CSF-Expressionskassette eingefügt. Es handelt sich hierbei um die Expressionskassetten GM-CSF/BCMGS, CMVp/GM-CSF/pRK5 und SFFp/GM-CSF/pRK5. Die Expressionskassette GM-CSF/IRES/GFP wurde hingegen direkt in die Dreifachdeletionsmutante an die Stelle des GFP-Gens in der Nähe des F-Faktors integriert. Ähnlich wurde auch der *W*pr/GM-CSF-Vektor kloniert. Wie schon in 4.2.1 näher beschrieben, erfolgte die Insertion der GM-CSF-Kassette in die EBNA2-Deletion der Dreifachdeletionsmutante. Hierbei wurde die Technik des ‚chromosomal building' angewandt (Abb.4.3). Alle GM-CSF-Vektoren sind graphisch in Abbildung 4.7 dargestellt und in Tabelle 4.1 zusammengefaßt.

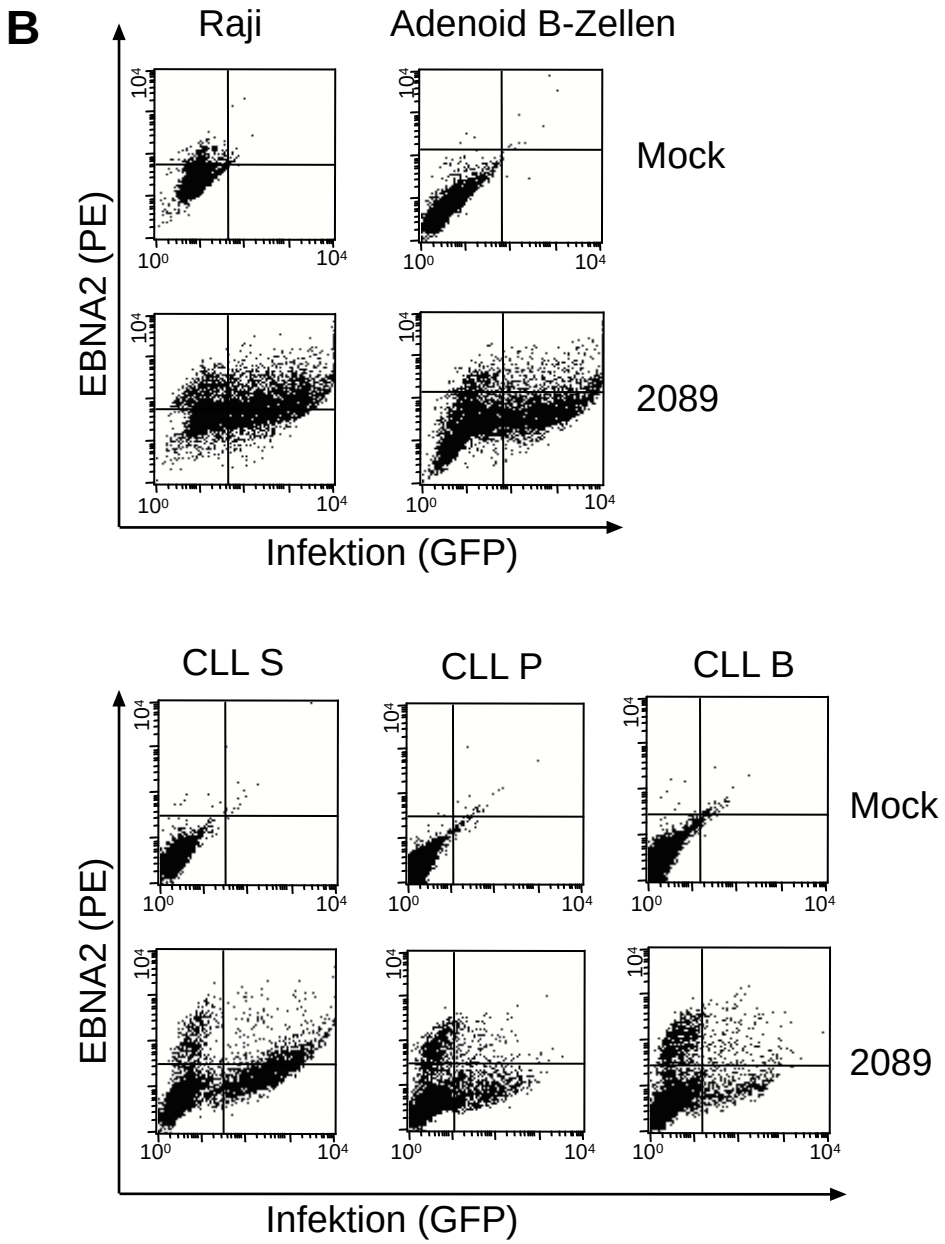


Abb.4.6.B: Nachweis der EBNA2-Expression in B-CLL-Zellen nach EBV-Wildtyp-Infektion

(**B**) Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden Raji-Zellen, primäre B-Lymphozyten aus Adenoiden sowie verschiedene B-CLL-Zellen (Patient S, P und B) ebenfalls 3 Tage mit 2089 (WT-EBV) infiziert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und permeabilisiert und EBNA2 im Kern immunhistologisch detektiert. Mit einem PE-gekoppelten Sekundärantikörper konnte EBNA2 für die Durchflusszytometrie markiert werden. Da das EBV-Genom für das GFP (Green Fluorescent Protein) kodiert, konnten gleichzeitig die EBV-infizierten Zellen im Vergleich zu den uninfizierten Zellen ermittelt werden. Eine schwache konstitutive EBNA2-Expression ist bereits in uninfizierten Raji-Zellen zu sehen (siehe **A**). Alle B-CLL-Zellproben zeigen eine deutliche EBNA2-Expression. Die primären B-Lymphozyten lassen sich etwas besser infizieren als B-CLL-Zellen. Erstaunlich ist, dass zwei große separate Populationen entstehen, die jeweils EBNA2 oder GFP exprimieren, jedoch nur eine recht kleine Population, die doppelt-positiv ist. Dies könnte jedoch an den zwei unterschiedlichen Promotoren liegen. Deutlich ist, dass in allen verschiedenen CLL-Patientenmaterialien der *W*-Promotor aktiv ist.

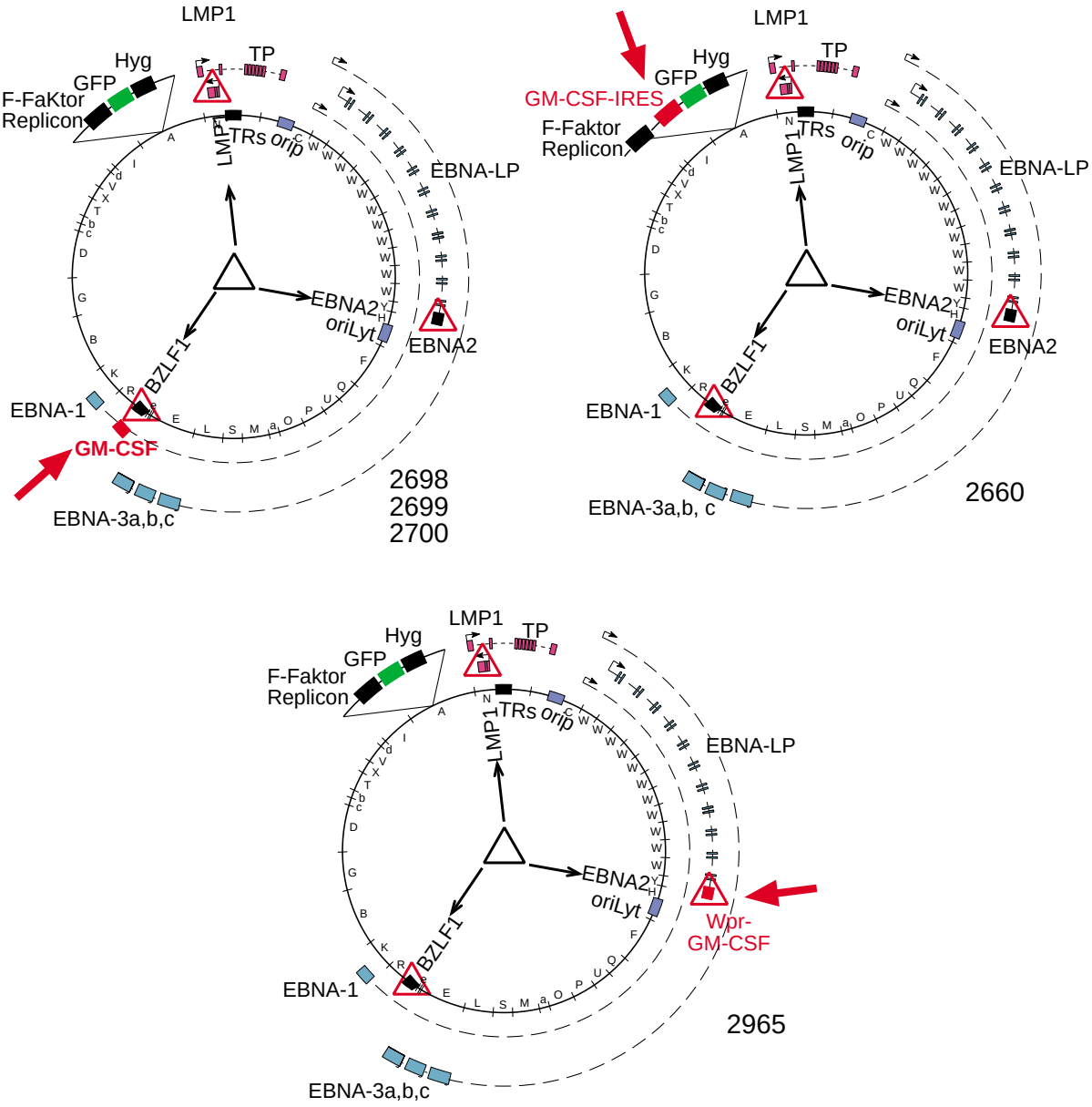


Abb.4.7: EBV-Vektoren mit inserierten GM-CSF-Expressionskassetten

Schematisch dargestellt ist das Genom der Maxi-EBV-Dreifachmutante, bei der die Gene EBNA2, LMP1 und BZLF1 im Gegensatz zu Wildtyp-EBV deletiert sind. Die GM-CSF-Expressionskassetten wurden an drei verschiedenen Stellen im Genom inseriert. Bei den EBV-Genvektoren p2698, p2699 und p2700 ist GM-CSF anstelle des BZLF1-Gens eingefügt. p2660 trägt GM-CSF im Kontext eines IRES-Konstrukts 3`des F-Faktor-Replikons, innerhalb des prokaryonten Plasmidrückrats. In p2965 wird GM-CSF vom *W*-Promotor des EBV-Genoms exprimiert und ist anstelle des offenen Leserahmens von EBNA2 inseriert.

Zur genetischen Modifikation des EBV-Genoms wurden intermediäre konventionelle Plasmide etabliert, die die GM-CSF-Expressionskassette im Kontext von flankierenden EBV-Abschnitten tragen. Die Herstellung eines intermediären Plasmids zur Insertion des Transgens ist beispielhaft in Abbildung 4.8 dargestellt. Die Insertion an anderen Genloci erfolgte prinzipiell in gleicher Weise. Die Mutation von BZLF1

musste zunächst in einem konventionellen Plasmid hergestellt werden (p2088). p2088 enthält die EBV-Wildtyp-Sequenz mit den Nukleotid-Koordinaten #98398 bis #105301 des B95-8-Genoms (Baer et al., 1984). Durch die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens aus einem weiteren Plasmid (pCP15; Cherepanov et al., 1995) wurde der offene Leserahmen für BZLF1 unterbrochen. Im nächsten Klonierungsschritt wurde das *Xba*I/*Hind*III-Fragment aus dem GM-CSF/BCMGS-Expressionsplasmid p2658 in das BZLF1-Deletionsplasmid inseriert. Nach Restriktionsverdau mit *Pvu*I/*Stu*I enstand ein lineares Fragment, in dem das Kanamycinresistenzgen und die GM-CSF-Kassette von EBV-Sequenzen flankiert sind. Diese vermitteln die homologe Rekombination mit den entsprechenden Sequenzen der Maxi-EBV-Doppeldeletionsmutante p2510 (Abb.4.2). Die homologe Rekombination in *E. coli* wurde wie in 4.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Insertion des mutierten Fragments an der vorbestimmten Stelle wurde durch Restriktionsenzymanalyse und Southern-Blot-Hybridisierung überprüft (siehe Anhang I).

Tab.4.1: EBV-Vektoren

EBV-Vektoren	Mutationstechnik	deletierte EBV-Gene	GM-CSF-Expressions-kassette	Vorläuferkonstrukt für GM-CSF-Insertion
2491*	‚chromosomal building'	EBNA2	-	-
2510*	‚chromosomal building'	EBNA2 LMP1	-	-
2575	homologe Rekombination in BJ5183	EBNA2 LMP1 BZLF1	-	-
2660	homologe Rekombination in DH10B	EBNA2 LMP1 BZLF1	GM-CSF/IRES/GFP-Plasmid	2575
2698	homologe Rekombination in DH10B	EBNA2 LMP1 BZLF1	GM-CSF/BCMGS-Plasmid	2510
2699	homologe Rekombination in DH10B	EBNA2 LMP1 BZLF1	CMVp/GM-CSF/pRK5-Plasmid	2510
2700	homologe Rekombination in DH10B	EBNA2 LMP1 BZLF1	SFFp/GM-CSF/pRK5-Plasmid	2510
2965	‚chromosomal building'	EBNA2 LMP1 BZLF1	EBV-*W*p/GM-CSF	2575

Übersicht der GM-CSF-Genvekoren und ihrer Vorläuferkonstrukte, die in meiner Arbeit hergestellt und analysiert wurden. Die mit * gekennzeichneten Vorläuferkonstrukte wurden von Wolfgang Hammerschmidt kloniert und standen mir zur Verfügung.

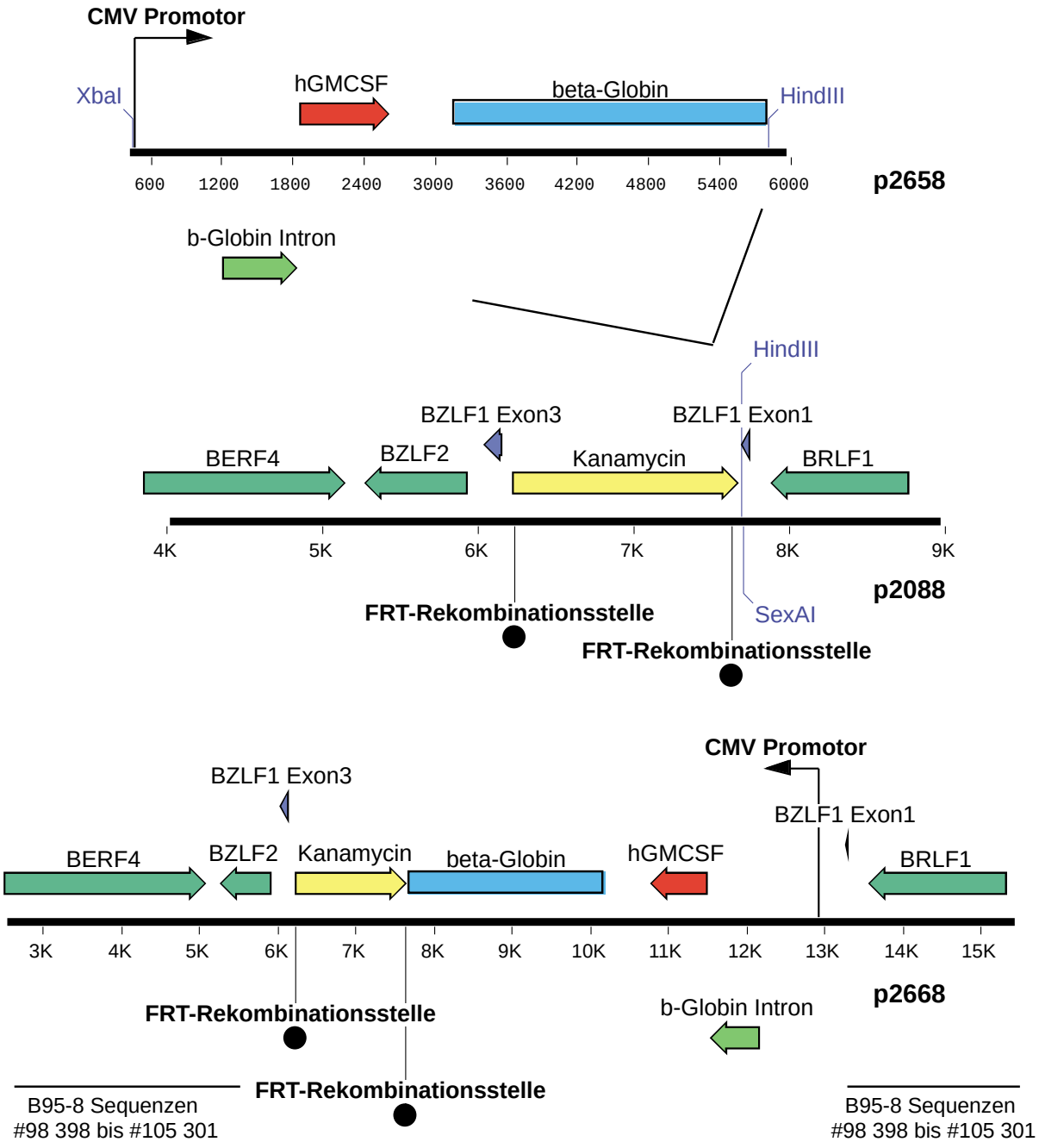


Abb.4.8: Konstruktion des GM-CSF-Vektors p2698 durch homologe Rekombination in *E. coli*

Schematische Darstellung der intermediären Plasmide zur homologen Rekombination mit dem Maxi-EBV. Das Plasmid p2088 trägt die EBV-Sequenzabschnitte mit den EBV-Nukleotid-Koordinaten #98398 bis #105301 (veröffentliche B95-8-Sequenz: Baer et al., 1984). Der kodierende Bereich für das BZLF1-Gen wurde durch die Insertion des Kanamycin-Gens aus pCP15 unterbrochen. Zusätzlich wurde in die SexAI/HindII-Restriktionsschnittstelle von p2088 das XbaI/HindII-Fragment aus p2658 eingefügt, das die GM-CSF/BCMGS-Expressionskassette für GM-CSF enthält. Somit kann gleichzeitig das BZLF1-Gen deletiert und die GM-CSF-Expressionskassette eingeführt werden. Rechts und links von den FRT-Rekombinationsstellen sind die homologen EBV-Bereiche (BERF4, BZLF2, BRLF1) dargestellt, die notwendig sind für die homologe Rekombination. Diese vermitteln die Rekombination mit den entsprechenden Sequenzen des Maxi-EBV.

4.3. Herstellung von rekombinanten Viren

4.3.1. Etablierung stabiler Maxi-EBV-produzierender HEK293-Zelllinien

Im Abschnitt 4.2 wurde die Herstellung der GM-CSF-Vektoren auf der Basis von Maxi-EBV-Plasmiden beschrieben. Die Deletion der EBV-Gene und die Einführung des Transgens in das Wildtyp-EBV-Genom erfolgte in *E. coli* durch homologe Rekombination mit linearen Fragmenten (Abschnitt 4.1 und 4.2) oder durch ‚chromosomal building' (Abschnitt 4.3). Nach erfolgter homologer Rekombination in *E. coli* und anschließender Überprüfung des Genotyps durch Southern-Blot-Hybridisierung (siehe Anhang I) wurden die Bakterien in einem Fünf-Liter-Ansatz fermentiert, die Maxi-EBV-Plasmid-DNA daraus isoliert und über zwei CsCl-Ethidiumbromid-Gradienten aufgereinigt. Alternativ wurde die Aufreinigung der DNA auch über Nucleobond-AX500-Säulen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im oberen Drittel der Abbildung 4.9 sind alle diese Vorgänge in *E. coli* wie auch dem Zellkultursystem dargestellt.

Die aufgereinigte EBV-Vektor-DNA der Plasmide aus Tabelle 4.1 wurde, wie im Methodenteil 3.2.6 erläutert, in HEK293-Zellen transfiziert. Nach 3 bis 4 Wochen Selektion unter Hygromycin (100 μg/ml Endkonzentration) konnten GFP-positive Einzelzellklone etabliert werden. Ungefähr 40 Einzelzellklone, die zuvor aus jeder stabilen Transfektion expandiert worden waren, wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den lytischen Zyklus von EBV zu unterstützen. Darüber hinaus wurde die Identität und Integrität des EBV-Genoms in den HEK293-Zellen mittels geeigneter DNA-Sonden über Southern-Blot-Hybridisierung untersucht (siehe Anhang I).

4.3.2. Induktion des lytischen Zyklus und Bestimmung des Virustiters

In stabil transfizierten HEK293-Zellen replizieren Maxi-EBV-Plasmide extrachromosomal und etablieren einen der latenten EBV-Infektion entsprechenden Zustand. Um den Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus einzuleiten, muss

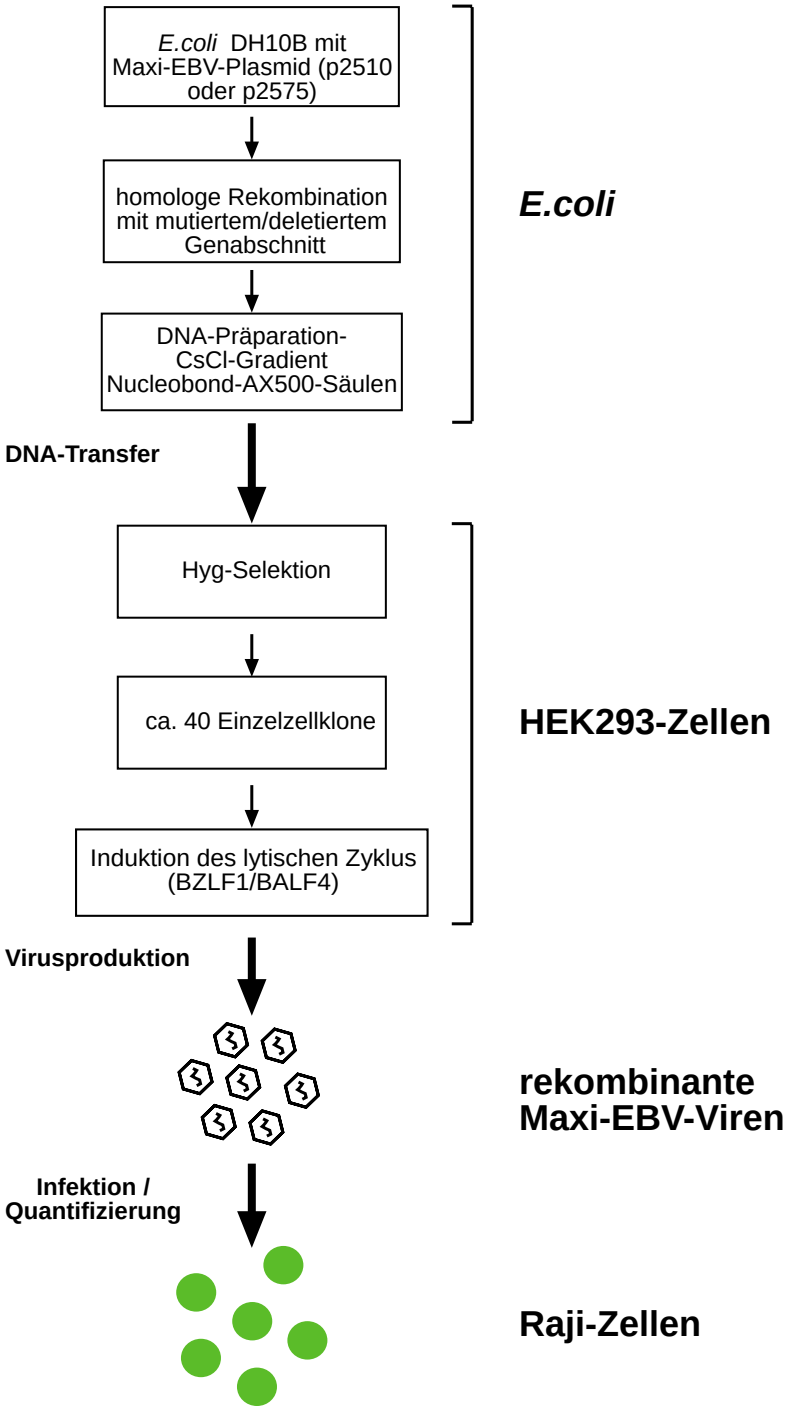


Abb.4.9: Prozessschritte zur Herstellung rekombinanter EBV-Genvektoren und mutanter Viruspartikel
Dargestellt ist die Übersicht zur Herstellung rekombinanter Maxi-EBVs von der homologen Rekombination in *E. coli* über die Selektion stabiler HEK293-Zelllinien als Virusproduzenten bis zum Nachweis und der Quantifizierung infektiöser Partikel in Raji-Zellen.

das virale Gen BZLF1 als Transaktivator in diesen Zellen exprimiert werden (Methoden 3.2.9) (Hammerschmidt et al., 1988). Die Menge der produzierten infektiösen Partikel kann durch zusätzliche transiente Transfektion von BALF4 noch

deutlich gesteigert werden (Neuhierl et al., 2002). Drei Tage nach der Kotransfektion von BZLF1 und BALF4 konnte die Induktion des lytischen Zyklus anhand der gp350-Expression in den HEK293-Zellen mittels Immunfärbung nachgewiesen werden (Abb.4.10 A/B). gp350 ist der virale Ligand des zellulären CD21-Rezeptors bei der Infektion von primären B-Lymphozyten mit EBV (Janz et al., 2000). gp350 ist ein Leitprotein für die späte lytische Phase von EBV. Der Kulturüberstand dieser induzierten Zellen wurde dann für die Infektion von Raji-Zellen, einer humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie eingesetzt. Es wurden jeweils $3x10^5$ Raji-Zellen mit definierten Mengen des Zellkulturüberstands drei Tage lang bei 37°C inkubiert. Das Zellmedium wurde nach 24 Stunden gewechselt. Die GFP-Expression von infizierten

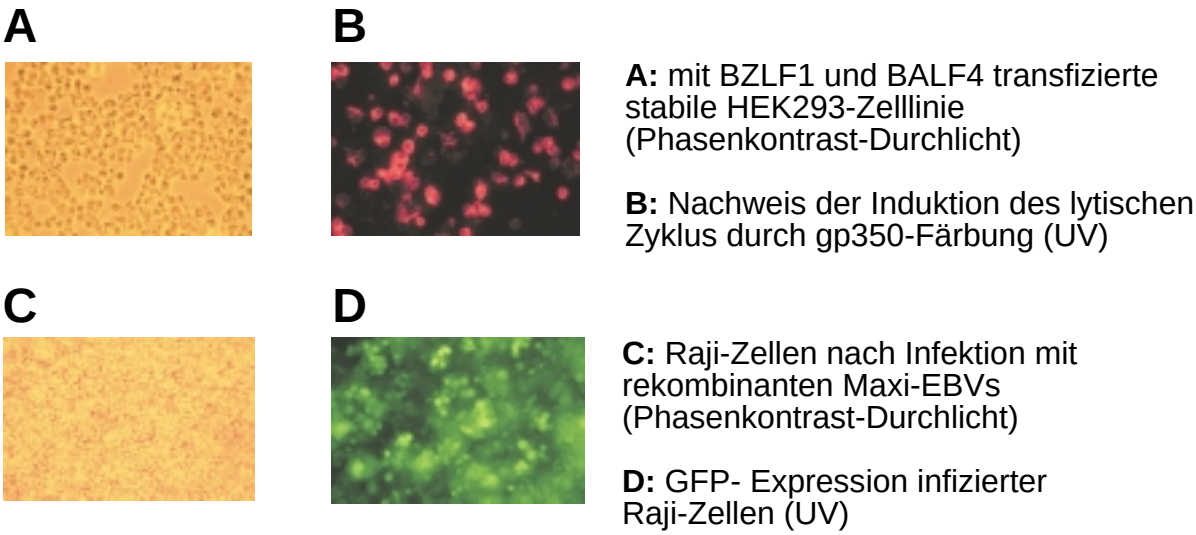


Abb.4.10: Induktion des lytischen Zyklus eines stabil mit einem EBV-Vektor-Plasmid transfizierten HEK293-Einzelzellklons und GFP-Expression infizierter Raji-Zellen

(**A**/**B**) In einem stabil mit einem Maxi-EBV-Plasmid transfizierten HEK293-Einzelzell-Klon wurde der lytische Zyklus durch transiente Kotransfektion von Expressionsplasmiden für die Aktivatoren BZLF1 und BALF4 induziert. Die Kulturüberstände wurden drei Tage nach transienter Transfektion geerntet, die Zellen auf Objektträgern getrocknet und in Aceton permeabilisiert. Als Nachweis der erfolgreichen Induktion des lytischen Zyklus von EBV wurde eine Immunfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen gp350/220 (virales Glykoprotein) durchgeführt, das ein Leitprotein für die späte lytische Phase von EBV ist. Die Detektion erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper in einem Invers-Fluoreszenzmikroskop. Der Kulturüberstand der induzierten HEK293-Zellen wurde nach 3 Tagen geerntet. $3x10^5$ Raji-Zellen wurden für 72 h mit einem ml dieses Kulturüberstands bei 37 °C inkubiert (**C**/**D**). Anhand der GFP-Expression der Raji-Zellen, die in einem Invers-Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurde, konnte auf eine erfolgreiche Infektion geschlossen und die Anzahl der infektiösen Partikel im Kulturüberstand durch Durchflusszytometrie der GFP-positiven Raji-Zellen bestimmt werden. Eine grüne Raji-Zelle pro ml Kulturüberstand wurde dabei als eine grüne Raji-Einheit (GRU) definiert. Dadurch können unterschiedliche Kulturüberstände verschiedener Maxi-EBV-Mutanten miteinander verglichen und angepasst werden.

Raji-Zellen konnte in einem Invers-Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (Abb.4.10 C/D) oder über Durchflusszytometrie bestimmt werden (Methoden 3.2.9).

Die Induktion des lytischen Zyklus in HEK293-Zellen und die Quantifizierung der Virusüberstände entspricht in Abbildung 4.9 dem unteren Drittel des Fliessschemas.

4.3.3. Herstellung konzentrierter Maxi-EBV-Präparationen

Um höhere Virustiter und damit eine bessere Infektionsrate von primären B-Lymphozyten zu erhalten, wurden die Virusüberstände durch Ultrazentrifugation aufkonzentiert. Gleichzeitig wurden die Zellkulturüberstände über ein 25 %iges Saccharosekissen aufgereinigt, da bei der Induktion des lytischen Zyklus auch GM-CSF exprimiert und in den Überstand sezerniert wird. Dies wird bei der Infektion übertragen und kann das Ergebnis verfälschen. Die Ultrazentrifugation wurde bei 40.000 g und 4 °C in einer Beckman-Ultrazentrifuge im Ausschwingrotor durchgeführt (Methoden 3.2.10). Der Anteil des löslichen GM-CSF in den Zellkulturüberständen konnte damit verringert werden und gleichzeitig der Titer auf ca. $5x10^5$-$2x10^6$ erhöht werden. Das Virussediment wurde in HBSS-Puffer nach einer Volumenreduktion von 1:25 aufgenommen und konnte dort über mehrere Monate gelagert werden, ohne dass sich der Titer erheblich veränderte. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte über die Infektion von 3-$4x10^5$ Raji-Zellen, die nach drei Tagen in der Durchflusszytometrie auf ihre GFP-Expression hin untersucht werden konnten. Aus dem Prozentanteil der infizierten Raji-Zellen wurde der Titer der Viruspräparation berechnet. Es wurde davon ausgegangen, dass ein Viruspartikel jeweils eine Raji-Zelle infiziert. In den Versuchsbeschreibungen wird größtenteils die ‚*Multiplicity of Infection*'= MOI angegeben. Alle Infektionsversuche in den folgenden Abschnitten wurden mit diesen konzentrierten Viruspräparationen durchgeführt.

4.4. Transduktion verschiedener B-Lymphozyten mit den GM-CSF-Vektoren

4.4.1. Einfluss der (EBNA2, LMP1, BZLF1-) Deletionen auf die Infizierbarkeit von B-Lymphozyten

LMP1 und EBNA2 sind involviert in der Immortalisierung von B-Lymphozyten. BZLF1 dagegen ist der wichtigste Transaktivator des lytischen Zyklus. Alle drei Gene sind also nicht essenziell für die Prozesse, die initial notwenig sind bei der Infektion von B-Lymphozyten. Die Dreifachdeletionsmutante, die als Ausgangsvektor für die Insertion der GM-CSF-Expressionskassetten diente, ist über mehrere Klonierungsschritte entstanden. Es war also notwendig zu untersuchen, ob die sukzessive Deletion der drei EBV-Gene zu einer Abnahme der Infektiosität führt. Dafür wurden Raji-Zellen, primäre B-Lymphozyten aus Adenoiden und B-CLL-Zellen mit einer definierten Menge aufkonzentrierter Viruspräparation infiziert (Methoden 3.2.5). Verglichen mit Wildtyp-EBV (2089) wurden die Einzelmutanten ΔEBNA2 und ΔLMP1, die Doppelmutante ΔEBNA2&ΔLMP1 und die Dreifachdeletionsmutante ΔEBNA2 &ΔLMP1&ΔBZLF1. Der Anteil der infizierten Zellen wurde anhand der GFP-Expression in der Durchflusszytometrie ermittelt. Um die einzelnen Mutanten miteinander vergleichen zu können, wurde der Prozentsatz der infizierten primären Zellen jeweils auf den der Raji-Zellen bezogen und somit standarisiert. Dargestellt ist in Abbildung 4.11 jeweils das Verhältnis des Infektionstiters der primären Zellen zu dem der Raji-Zellen. Auf den Raji-Zellen erzielten die EBV-Vektoren durchschnittlich Infektionstiter von ca. $1x10^6$ GRU/ml. Primäre B-Lymphozyten waren ungefähr um ein Zehntel schlechter infizierbar. Die effizientere Infizierbarkeit der Raji-Zelllinie lässt sich dadurch erklären, dass die EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie vermutlich *in vitro* vitaler ist und stärker proliferiert. B-CLL-Zellen sind geringfügig schlechter infizierbar als primäre B-Lymphozyten von gesunden Spendern. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass die Tumorzellen eine verlängerte Überlebenszeit haben und sich in der Zellkultur kaum mehr teilen. Grundsätzlich lässt sich aus diesem Experiment schließen, dass die Deletionen zu keinen wesentlichen Einbrüchen in der Infektiosität führen.

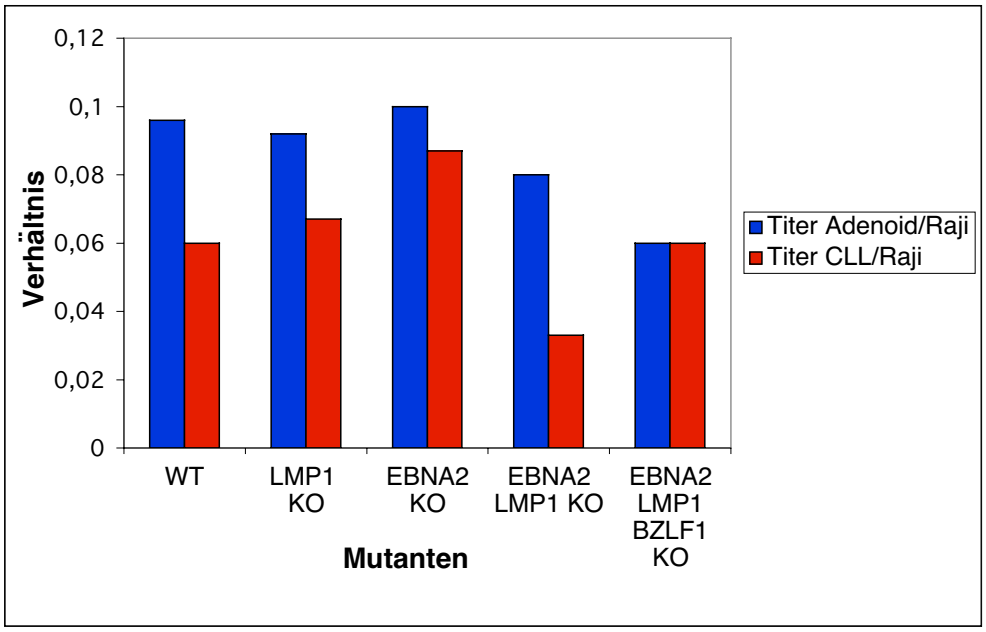


Abb.4.11: Vergleich der Infektiosität von Wildtyp-Maxi-EBV mit verschiedenen, genetisch veränderten Maxi-EBV-Vektoren

Ziel dieses Experiments war es zu untersuchen, ob die Infektiosität der Maxi-EBV-Vektoren durch die sukzessive Deletion von EBNA2, LMP1 und BZLF1 beeinflusst wird. Dafür wurden die Maxi-EBVs mit den Einfachdeletionen von EBNA2 und LMP1, die Zweifachdeletionsmutante ΔEBNA2&LMP1 und die Dreifachdeletionsmutante ΔEBNA2&LMP1&BZLF1 bezüglich ihrer Infektiosität mit Wildtyp-Maxi-EBV (2089) verglichen. Dies geschah mit durchflusszytometrischen Messungen der GFP-Expression nach dreitägiger Infektion von Raji-Zellen, primären B-Lymphozyten aus Adenoiden und B-CLL-Zellen. Es wurden jeweils $1x10^5$ Zellen mit 100 µl des konzentrierten Virusüberstands infiziert und nach drei Tagen die GFP-Expression mit 20 ng/ml TPA und 3 mM Natriumbutyrat angeregt. Der Titer bei der Infektion von Raji-Zellen diente als Standard und Bezugswert für die Infektionsraten von primären B-Lymphozyten aus Adenoiden und B-CLL-Zellen. Dargestellt ist auf der y-Achse das Verhältnis der infizierten Adenoid-B-Zellen und B-CLL-Zellen zu der Anzahl infizierter Raji-Zellen. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Maxi-EBV-Vektoren zu sehen. Der Titer der Maxi-EBV-Vektoren auf Raji-Zellen betrug durchgehend ungefähr $1x10^6$ GRU/ml. Adenoid-B-Zellen zeigen im Schnitt 1/10 der Infizierbarkeit von Raji-Zellen, wohingegen B-CLL-Zellen nur geringfügig schlechter sind. Die unterschiedlichen Maxi-EBV-Vektoren zeigen keine wesentlich verschiedenen Infektionsraten. Dies verdeutlicht, dass die sukzessive Deletion der drei Gene für EBNA2, LMP1 und BZLF1 keinen Einfluss auf die Infektiosität der Maxi-EBV-Vektoren hat. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, dass Tumor-B-Zellen ähnlich gut infizierbar sind wie primäre B-Lymphozyten von gesunden Spendern.

4.4.2. Transduktion von B-Zelllinien

Um die Expression von GM-CSF nach Transduktion von B-Lymphozyten mit verschiedenen GM-CSF-Vektoren zu überprüfen, wurden die Infektionsversuche zuerst anhand der Raji-Zelllinie etabliert. Diese Zellen lassen sich mit hoher Effizienz infizieren und damit gut als Modellsystem für B-Zellinfektionen verwenden. Trotz der Aufreinigung der Virusüberstände über ein Saccharosekissen verblieb ein geringer

Rest des GM-CSF-Proteins in den Viruspräparationen. Dieses wurde in den folgenden Infektionsexperimenten durch mehrmaliges Waschen der Zellen 24 Stunden nach Infektion mittels Zentrifugation (Methoden 3.2.11) fast vollständig beseitigt. Die Spuren, die trotz dieser Maßnahmen im ELISA nachweisbar waren, wurden als Übertrag bezeichnet. Es galt zu zeigen, dass das GM-CSF nach Infektion der Raji-Zellen mit den GM-CSF-Vektoren in der Zelle erfolgreich exprimiert und anschließend sezerniert wird. Dazu wurden $4x10^5$ Raji-Zellen drei Tage lang mit Virusüberstand infiziert (‚*Multiplicity of Infection'* = MOI ≈0,3). In Parallelansätzen wurden die Zellen einmal mit und einmal ohne Brefeldin A inkubiert (16 Stunden; 3μg/ml), um den Transport des Proteins an die Oberfläche und die Akkumulation in den Zellkulturüberständen zu inhibieren (Klausner et al., 1992) (Hartmann et al., 1999). Zelllysate und Überstände wurden in einem Proteingel aufgetrennt und GM-CSF-Polypeptid im Immunoblot detektiert (Abb.4.12.A). Es ist exemplarisch die Infektion mit dem GM-CSF/IRES/GFP-Vektor (2660) gezeigt. Die CMVp/GM-CSF/pRK5-(2699) und GM-CSF/BCMGS-Vektoren (2698) zeigten gleichwertige Ergebnisse. Der SFFp/GM-CSF/pRK5-Vektor (2700), bei dem das Transgen durch den retroviralen LTR-Promotor des ‚Spleen-Focus-Forming-Virus' angetrieben wird, zeigte in Raji-Zellen keine Expression von GM-CSF. Dies war zwar auf Grund der Vorergebnisse aus den Transfektionen von HEK293-Zellen und der Elektroporation von DG75-B-Zellen zu erwarten, erstaunte aber wegen der publizierten Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe dennoch (Baum et al., 1997). Eine mögliche Erklärung wäre, dass es im EBV-Kontext zu Interferenzen mit dem SFF-Promotor kommt.

Auch andere B-Zellinien wie Akata27, BJAB und DG75 wurden mit den GM-CSF-Vektoren infiziert. Sie zeigten sich alle permissiv für eine Infektion und sezernierten GM-CSF in den Zellkulturüberstand (Abb.4.12.B). Ihre Infizierbarkeit wie auch das Expressionsniveau des Transgens fielen allerdings schwächer aus als bei Raji-Zellen.

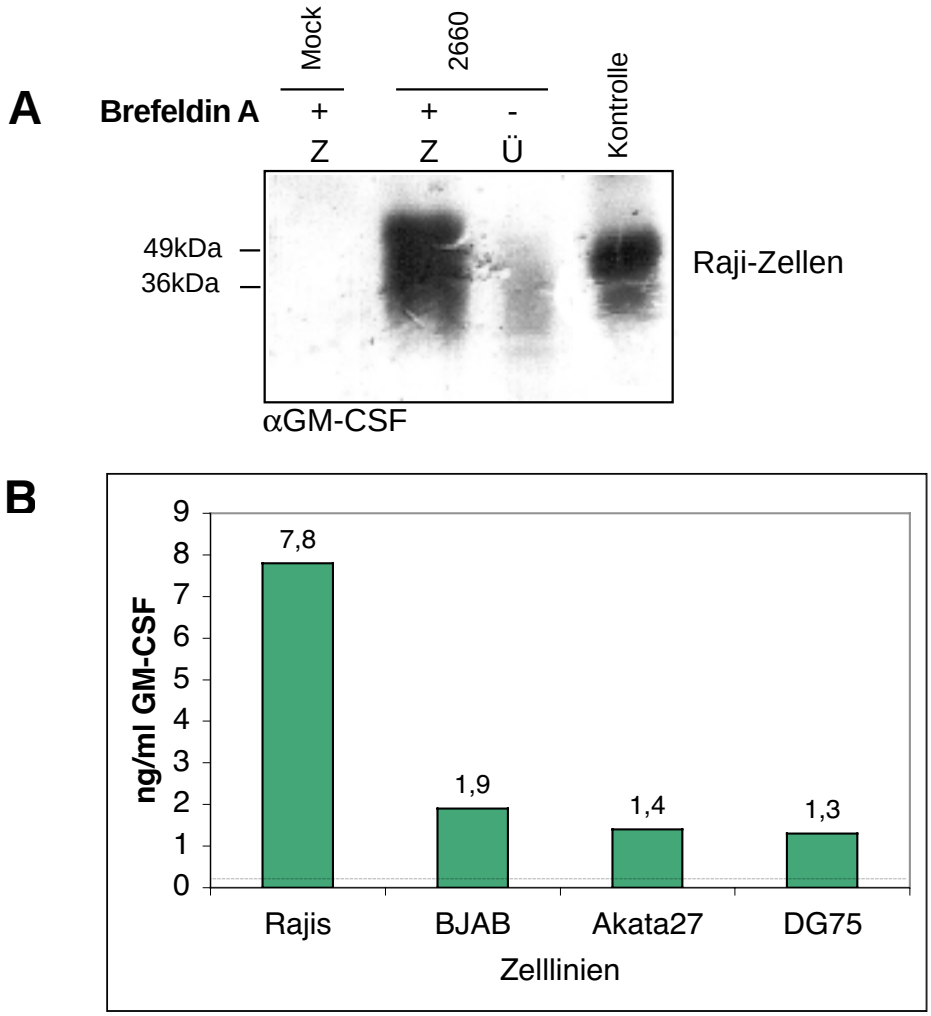


Abb.4.12: Nachweis von GM-CSF nach Infektion mit einem GM-CSF-Vektor in Raji-Zellen und in den Zellkulturüberständen

Um nachzuweisen, dass die EBV-Vektoren GM-CSF nach Transduktion von Raji-Zellen exprimieren, wurden die Zellen mit 2660 (GM-CSF-IRES-GFP-Vektor) mit einer MOI von 0,6 infiziert und die Expression des GM-CSF-Proteins nach drei Tagen im Immunoblot dargestellt (**A**). 17 Stunden vor dem Ernten der Zellen wurden 3 μg/ml Brefeldin A ins Medium zugegeben. Zur Kontrolle wurden Parallelansätze mit und ohne Brefeldin A und eine uninfizierte Kontrolle (Mock) sowie eine Positivkontrolle (GM-CSF/pRK5 in HEK293-Zellen mit Brefeldin A) mitgeführt. Bei diesem GM-CSF-Nachweis im Immunoblot sind Zelllysate von uninfizierten (Mock) und mit 2660 infizierten Raji-Zellen in Gegenwart von Brefeldin A aufgetragen, ebenso wie das Kulturmedium ohne Brefeldin A. Exemplarisch ist hier nur der GM-CSF-IRES-GFP-Vektor (2660) gezeigt. Zu sehen ist, dass uninfizierte Raji-Zellen von sich aus kein GM-CSF exprimieren, nach Vektor-Transduktion dieses aber in der Zelle gebildet und in den Überstand sezerniert wird. Der Transport an die Oberfläche konnte durch Brefeldin A gehemmt werden (Z= Zelllysate, Ü= Überstände).

In Abbildung (**B**) ist der Nachweis der Sekretion von GM-CSF ins Kulturmedium aus dem in (A) beschriebenen Infektionsversuch gezeigt. Der Nachweis erfolgte quantitativ in einem ELISA-Verfahren. Neben Raji-Zellen wurden auch BJAB-, Akata27- und DG75-Zellen ($2x10^5$ Zellen) unter gleichen Bedingungen infiziert. Gleich Virusmengen führten dort aber zu einer geringeren Infektionsrate und damit zu einer geringeren Sekretion von GM-CSF in das Kulturmedium. Während BJAB-, Akata27- und DG75-Zellen nur ein bis zwei ng/ml sezernierten, waren dies bei Raji-Zellen um den Faktor vier bis fünf mehr. Diese geringen Mengen konnten im Immunoblot nicht nachgewiesen werden. Die gestrichelte Linie gibt die Detektionsgrenze des Messverfahrens an.

Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Infektionsrate und die Expression des Transgens wurden mit 2660 und 2698 erzielt. Daher habe ich mich in den folgenden Versuchsreihen auf diese beiden Vektoren beschränkt und die Ergebnisse des 2699-Vektors nicht mehr gezeigt. Es wurden Infektionszeitreihen mit Raji-Zellen etabliert, um die Akkumulation von GM-CSF im Überstand zu zeigen. $3x10^5$ Zellen wurden in einem Volumen von einem Milliliter mit 2660 und 2698 (MOI O,3) infiziert. 24 Stunden später wurde die Zellen durch Zentrifugation zweimal gewaschen und weitere vier Stunden später ein Aliquot aus dem Überstand entnommen, um den Übertrag an GM-CSF aus der Viruspräparation zu ermitteln. An Tag zwei, vier und sechs wurden die Kulturüberstände geerntet, gesammelt und zusammen in einem ELISA analysiert (Abb.4.13). Nach sechs Tagen waren zwischen 4 bzw. 6,5 ng/ml GM-CSF im Überstand zu detektieren. Die Zahl der infizierten Zellen betrug dabei zwischen 20 und 40 % und war immer noch zunehmend. Daraus ist zu schliessen, dass der GM-CSF/IRES/GFP-Vektor 2660 und der GM-CSF/BCMGS-Vektor 2698 in der B-Zelllinie Raji funktionell sind und über einen Zeitraum von einer Woche stabil GM-CSF sezernieren. Die Raji-Zelllinie eignet sich daher auch zur Produktion von hochkonzentrierten GM-CSF-haltigen Kulturüberständen.

4.4.3. Transduktion von B-CLL-Zellen

Zellen der Chronisch-lymphatischen Leukämie der B-Zell-Reihe (B-CLL-Zellen) exprimieren den EBV-Rezeptor CD21 und können *in vitro* mit dem Epstein-Barr Virus infiziert werden (Wendtner et al., 2003) (Maeda et al., 2001). Nur in seltenen Fällen scheint es allerdings möglich zu sein, lymphoblastoide Zelllinien nach EBV-Infektion von B-CLL-Zellen zu etablieren (Karande et al., 1980). B-CLL-Zellen sind lang lebende, ruhende B-Lymphozyten, die in der G_0-Phase verharren und CD19- und CD5-positiv sind. Die in dieser Arbeit verwendeten B-CLL-Zellen stammen von Patienten mit hohen Leukozytenzahlen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch nicht-therapiert waren oder nach einer längeren therapielosen Zeit ein Rezidiv entwickelten. Da die EBV-Infektion spezifisch über den CD21-Rezeptor abläuft, kann im Gegensatz zu anderen Virusvektoren (z.B. AAV und Adenovektoren MOI 100-500

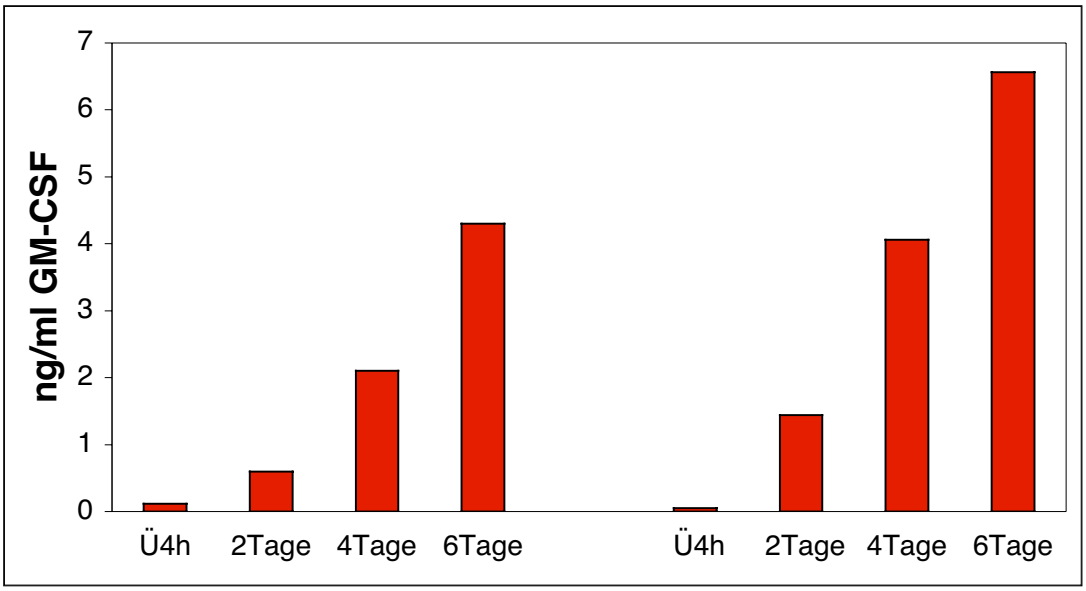


Abb.4.13: Infektionszeitreihen von Raji-Zellen mit den Genvektoren 2660 und 2698

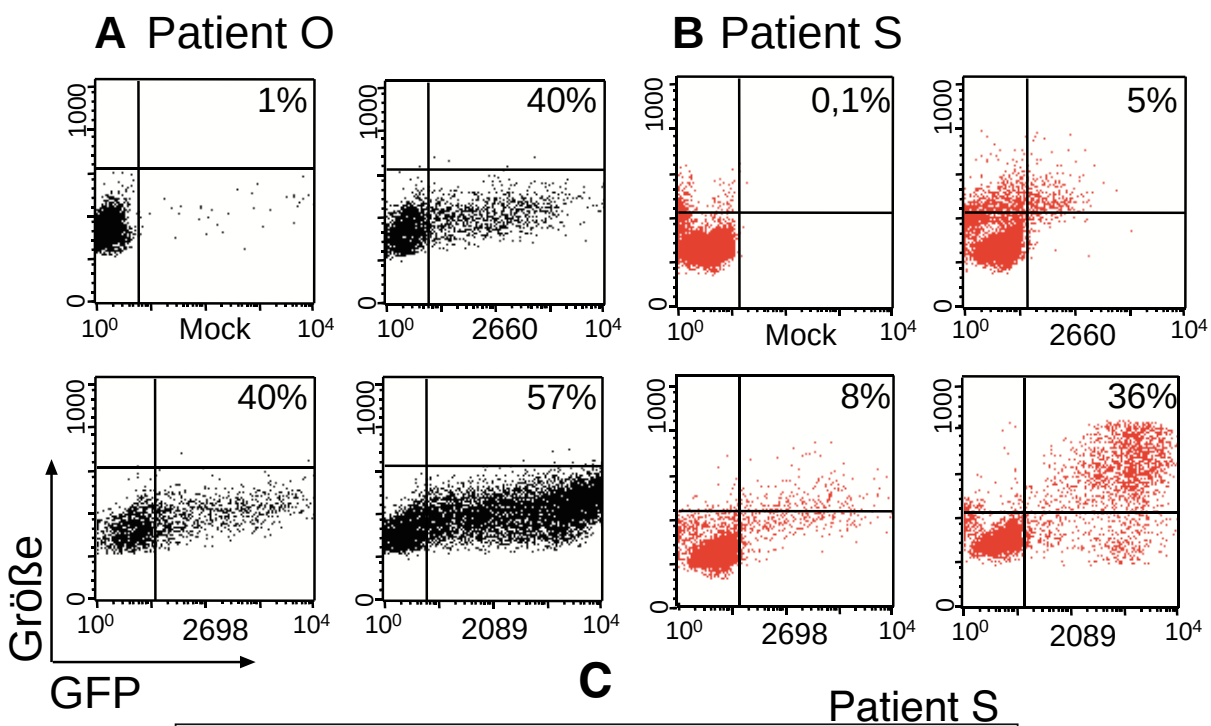
Ziel war es zu zeigen, dass GM-CSF nach Transduktion von Raji-Zellen mit den Genvektoren 2660 und 2698 im Kulturmedium akkumuliert und eine stabile Sekretion über mindestens eine Woche erreicht wird. Dargestellt ist die Akkumulation von GM-CSF im Kulturüberstand von Raji-Zellen zwei, vier und sechs Tage nach Infektion von $3x10^5$ Zellen mit einer MOI von ca. 0,3. Einen Tag nach Infektion wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und anschließend in einem Milliliter Kulturmedium inkubiert. Vier Stunden nach dem Waschen wurde ein Aliquot entnommen, um den Übertrag an GM-CSF aus dem Virusstock in die Infektion zu ermitteln (Ü4h). Der Gehalt an GM-CSF im Kulturmedium sowie in der Ü4h-Probe wurde mittels ELISA bestimmt. Die Nachweisgrenze von GM-CSF im ELISA lag bei ungefähr 100 pg/ml. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der GM-CSF Bestimmung abgebildet, auf der y-Achse der GM-CSF-Gehalt. An Tag vier waren 13% der 2660-infizierten Raji-Zellen GFP positiv sowie 32 % der 2698-infizierten (nicht gezeigte durchflusszytometrische Messung). Abgebildet sind die mehrfach reproduzierten Ergebnisse der beiden GM-CSF-Vektoren 2660 und 2698 mit dem höchsten Expressionsniveau, 2699 zeigt eine geringere Expression und ist in der Abbildung nicht dargestellt.

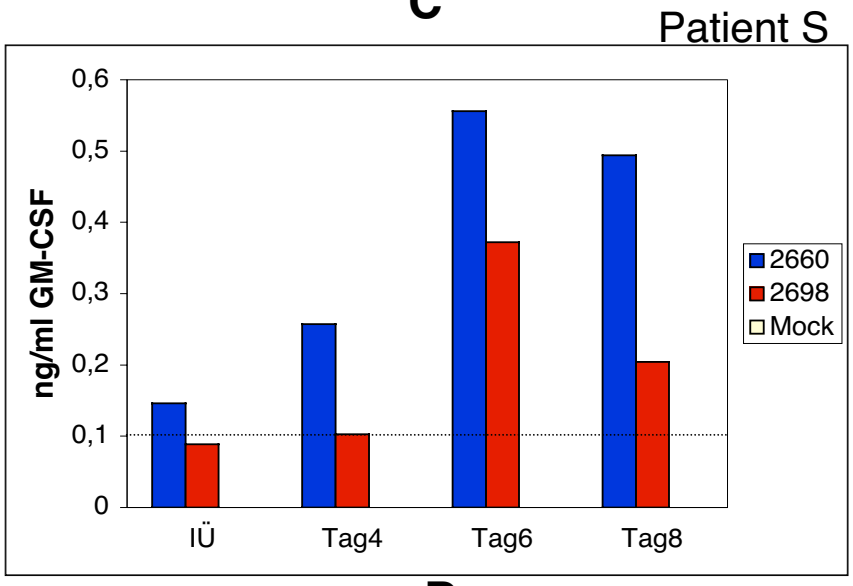
(Wendtner et al., 2002)) mit einer viel geringen Virusmenge gearbeitet werden. Die MOI betrug nur 0,3 bis 1 bezogen auf die in Raji-Infektionen ermittelten Virustiter. Zwanzig Milliliter Heparinblut verschiedener Patienten wurde über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt (Methoden 3.2.6) und in RPMI-Medium mit 10 % FKS kultiviert. Um die restlichen T-Zellen zu eliminieren und eine möglichst reine B-CLL-Zellkultur zu erhalten, kann Cyclosporin A zugesetzt werden. Damit die empfindlichen B-CLL-Zellen geschont blieben und da der Anteil an anderen Zellpopulationen fast immer unter 5% lag, wurde darauf jedoch verzichtet.

Es galt zuerst, die Infizierbarkeit der B-CLL-Zellen mit den beiden GM-CSF-Vektoren 2660 und 2698 zu überprüfen, die sich bereits in Infektionsexperimenten mit etablierten B-Zelllinien bewährt hatten. Wie im Methodenteil 3.2.11 beschrieben, wurden $4x10^5$ B-CLL-Zellen mit definierten Virusmengen und einer MOI von ungefähr 0,3 inkubiert. Exemplarisch ist die Infektion von B-CLL-Zellen zweier verschiedener

Patienten (vier bzw. acht Tage lang) gezeigt (Abb.4.14.A und B). Als Positivkontrolle wurde immer ein Infektionsansatz mit Wildtyp-EBV (2089) mitgeführt. Die Infektionsansätze von Patient O wurden vor der Ernte über Nacht mit TPA/Butyrat stimuliert, um die ansonsten oft schwache GFP-Expression in B-CLL-Zellen zu erhöhen. In der Darstellung sind nur die 60 % lebenden Zellen berücksichtigt, die nicht vitalen Zellen wurden durch Propidiumiodidfärbung (3.4.2) aus der FACS-Analyse ausgeschlossen. Bei Patient S wurden die B-CLL-Zellen acht Tage lang ohne TPA/Butyrat-Behandlung infiziert. Es ergaben sich bei Patient O Infektionsraten zwischen 30 und 40 %, bei Patient S 10 %. Dies zeigte, dass die GM-CSF-Vektoren geeignet sind, B-CLL-Zellen effizient *in vitro* zu infizieren. Ebenfalls wurde die Heterogenität in der Vitalität der *In vitro* kultivierten B-CLL-Zellen und ihre sehr unterschiedliche Infizierbarkeit deutlich.

Von besonderem Interesse war neben der Expression von GFP die des Transgens nach Transduktion der B-CLL-Zellen mit den GM-CSF-Vektoren. Hierfür wurden in einer Infektionszeitreihe an Tag vier, sechs und acht oder Tag drei, fünf und sieben Zellkulturüberstände geerntet und im GM-CSF-ELISA gemessen. In Abbildung 4.14 C sind die ELISA-Ergebnisse aus der im vorangehenden Abschnitt (Abb.4.14.B) gezeigten Infektion von Patient S dargestellt. Es kommt nach sechs Tagen Infektion zu einer Akkumulation von 350 bis 550 pg/ml GM-CSF pro $4x10^5$ B-CLL-Zellen in einem Milliliter Medium, wobei der 2698-Vektor durchweg bessere Expressionen erzielte. Ab Tag sieben scheint die Expression einzubrechen und die Zytokinmenge im Überstand nimmt etwas ab. Weitere B-CLL-Zellproben wurden auf die Sekretion von GM-CSF nach Transduktion untersucht. Der Zusammenhang zwischen Infizierbarkeit und Transgenexpression zeigte sich deutlich. Einige Patientenproben verhielten sich refraktär gegenüber einer Infektion (Abb.14.D). So waren bei Patient L im Invers-Fluoreszenzmikroskop keine GM-CSF-Vektor infizierten, GFP-positiven B-CLL-Zellen zu sehen. Der leichte Hintergrund im ELISA kam durch den Übertrag an GM-CSF aus der Viruspräparation zustande. Bei Patient G hingegen konnte eine Akkumulation von bis zu 300 pg/ml GM-CSF pro $4x10^5$ B-CLL-Zellen in einem Milliliter Medium nach fünf bis sieben Tagen festgestellt werden (Abb.4.14.D).


A Patient O
B Patient S
1%
40%
0,1%
5%
40%
57%
8%
36%
Mock
2660
2698
2089
Größe
GFP


C
Patient S
ng/ml GM-CSF
2660
2698
Mock
IÜ
Tag4
Tag6
Tag8

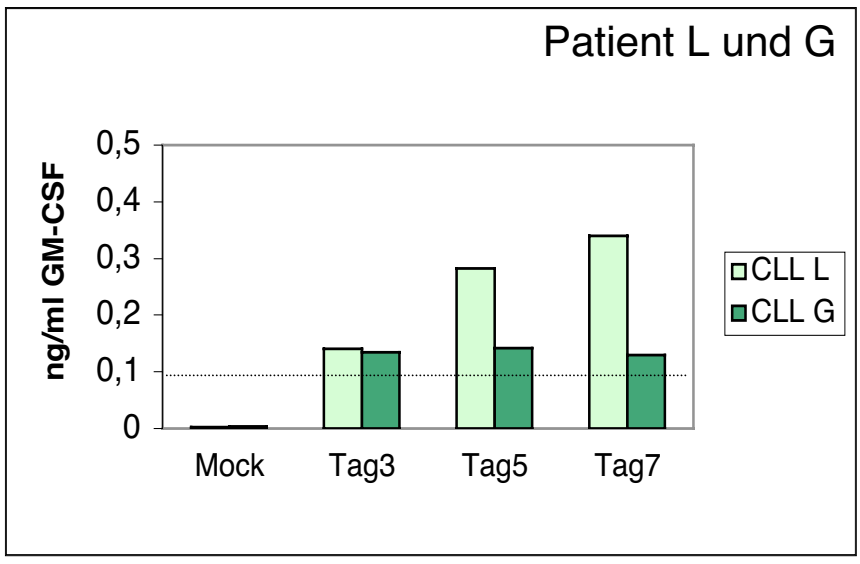

D
Patient L und G
ng/ml GM-CSF
CLL L
CLL G
Mock
Tag3
Tag5
Tag7

Abb.4.14: Infektion von B-CLL-Zellen mit den GM-CSF-Vektoren 2660 und 2698 und EBV-Wildtyp (2089)

Ziel war, die Infizierbarkeit von B-CLL-Zellen verschiedener Patienten mit den GM-CSF-Vektoren (2660 oder 2698) und die Expression von GM-CSF nach Transduktion dieser Zellen nachzuweisen. In (**A**) und (**B**) ist die Infizierbarkeit der B-CLL-Zellen (Patient O und S) anhand der GFP-Expression in der Durchflusszytometrie dargestellt, in (**C**) und (**D**) die GM-CSF-Sekretion von transduzierten Zellen (Patient S und L&G) gemessen im ELISA-Verfahren. Abbildung (**A**) zeigt eine viertägige Infektion von $4x10^5$ B-CLL-Zellen (Patient O) mit den GM-CSF-Vektoren 2660 und 2698 sowie Wildtyp-EBV (2089) mit einer MOI von 0,5. Einen Tag nach Infektion wurden die Zellen zweimal gewaschen und dann in einem ml Medium weiter inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen über Nacht mit TPA/Butyrat behandelt. In der Abbildung sind nur die lebenden Zellen berücksichtigt (ungefähr 60 %), die toten wurden durch eine Propidiumiodidfärbung ausgeschlossen. Der Anteil der durch die GM-CSF-Vektoren infizierten B-CLL-Zellen betrug 30-40 %, bei Wildtyp-EBV ca. 70 %. Abbildung (**B**) zeigt eine achttägige Infektion von $4x10^5$ B-CLL-Zellen mit einer MOI von 0,5 ohne TPA/Butyrat (Patient S) Behandlung. Der Anteil der infizierten Zellen wurde wiederum anhand der GFP-Expression durchflusszytometrisch gemessen. Durch eine CD19-Oberflächenfärbung konnte der Anteil der Nicht-B-Zellen (T-Lymphozyten und Monozytenabkömmlinge; insgesamt ca. 4 %) in der Probe ermittelt werden. Die Infektionsraten betrugen 10 % bei den GM-CSF-Vektoren, 30 % bei Wildtyp-EBV.

In (**C**) ist die Akkumulation von GM-CSF im Kulturmedium von transduizerten (2660 und 2698) B-CLL-Zellen dargestellt. Es handelt sich um einen gleichartigen Infekionsversuch wie in (B) beschrieben. Die x-Achse beschreibt die Zeitachse des Experiments, die y-Achse den GM-CSF-Gehalt in den Kulturüberständen. Vier Stunden nach dem Waschen wurde ein Aliquot entnommen, um den Übertrag an GM-CSF aus dem Virusstock in die Infektion zu ermitteln (Ü4h). Der GM-CSF-Gehalt in den Proben betrug zwischen 300 und 500 pg/ml. Nach Tag acht nimmt die konstitutive Sekretion ab und es kommt sogar zu einer leichten Abnahme des Zytokins im Überstand (nicht gezeigt). Weitere ELISA-Daten zur GM-CSF-Sekretion nach Transduktion der B-CLL-Zellen (von Patient L und G) sind in (**D**) zu sehen. $3x10^5$ Zellen wurden mit einer MOI von ca. 0,8 drei, fünf und sieben Tage lang infiziert. Die Infektion fand wiederum in einem Volumen von einem ml statt. Die B-CLL-Zellen von Patient G waren nicht infizierbar und damit kein GM-CSF in den Kulturüberständen detektierbar. Restspuren von GM-CSF, die über die Nachweisgrenze von ungefähr 100 pg/ml hinausgehen, stammen aus dem Viruskonzentrat. Bei Patient L konnte in den Überständen ein GM-CSF-Gehalt von ca. 300pg/ml festgestellt werden. Das sehr heterogene Verhalten nach Infektion von B-CLL-Zellen verschiedener Patienten in Bezug auf Infizierbarkeit und GM-CSF-Sekretion wurde hier deutlich. Die gestrichelte Linie gibt die Detektionsgrenze des Messverfahrens an.

Im Rahmen der Infektionsstudien von B-CLL-Zellen mit den GM-CSF-Vektoren 2660 und 2698 konnte ich zeigen, dass sich die B-CLL-Zellen effizient mit den EBV-Vektoren infizieren lassen und GM-CSF in den Überstand sezernieren. Das Expressionsniveau lag im Schnitt bei ungefähr 500pg pro $4x10^5$ B-CLL-Zellen nach sechs Tagen. Dies ist ungefähr ein Drittel dessen, was andere primäre B-Zellen produzieren (nicht gezeigte Daten) und ein Zehntel bis Zwanzigstel dessen, was EBV-negative B-Zelllinien sezernieren. Demonstriert wurde auch, dass die GM-CSF-Expressionskassetten des GM-CSF/IRES/GFP-Vektors (2660) und GM-CSF/BCMGS-Vektors (2698) die besten Ergebnisse erzielten und auch in Tumor-B-Zellen funktionell sind. Ein Problem stellt die unterschiedliche Vitalität der Zellen dar. Die Kultur von B-CLL-Zellen über einen Zeitraum von mehr als fünf bis sieben Tage

scheint *in vitro* nicht möglich zu sein, da die nicht-proliferierenden B-CLL-Zellen absterben.

4.5. Biologische Wirkung des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF

Ziel dieser Arbeit war auch zu zeigen, dass das nach Gentransfer in B-Lymphozyten sezernierte GM-CSF *in vitro* einen Effekt auf Zellen hat, die die Immunantwort gegen Tumoren bewirken. Dafür wurde zuerst untersucht, ob das von B-CLL-Zellen oder Raji-Zellen sezernierte GM-CSF biologisch aktiv ist.

4.5.1. Proliferation einer GM-CSF-abhängigen Zelllinie

Die promyeloide Zelllinie TF-1 ist in ihrer Proliferation abhängig von GM-CSF und reagiert auf geringste Mengen der Zytokine. Die Empfindlichkeit liegt ungefähr bei 50 pg/ml. Dies macht die Zelllinie interessant zum Nachweis der biologischen Funktionalität von GM-CSF. Es wurden Verdünnungsreihen der Raji- und B-CLL-Infektionsüberstände, die nach Gentransfer sezerniertes GM-CSF enthalten, mit $5x10^3$ TF-1 Zellen vier Tage lang inkubiert. Die Proliferationsrate wurde anschließend anhand der MTT-Konversion bestimmt (siehe Methoden 3.2.12). Es wurden wiederum nur die beiden GM-CSF-Vektoren 2660 und 2698 mit den besten GM-CSF-Expressionsraten verwendet (Abb.4.13 und Abb.4.15). Als Negativkontrolle dienten Kulturüberstände aus uninfizierten (Mock) Raji-Zellen sowie mit EBV-Wildtyp (2089)-infizierte B-CLL-Zellen, die jeweils kein GM-CSF enthielten. Die Kulturüberstände von transduzierten Raji-Zellen enthielten eine Konzentration von bis zu 30 ng/ml an GM-CSF, die Überstände aus B-CLL-Zellen ungefähr ein Zehntel weniger. Damit liegen die Ergebnisse ungefähr um den Faktor drei höher als die im ELISA gemessene GM-CSF Expression von Raji-Zellen und B-CLL-Zellen nach Vektor-Transduktion. Dies könnte an der höheren Sensitivität des Tests liegen. Aus diesem Proliferations-Test konnte geschlossen werden, dass das von Raji-Zellen und B-CLL-Zellen sezernierte GM-CSF gleichermassen biologisch aktiv ist. In den weiteren Experimenten zur Untersuchung der immunologischen Funktion wurden nur Raji-Zellkulturüberstände verwendet, da diese größere Mengen des Zytokins enthielten.

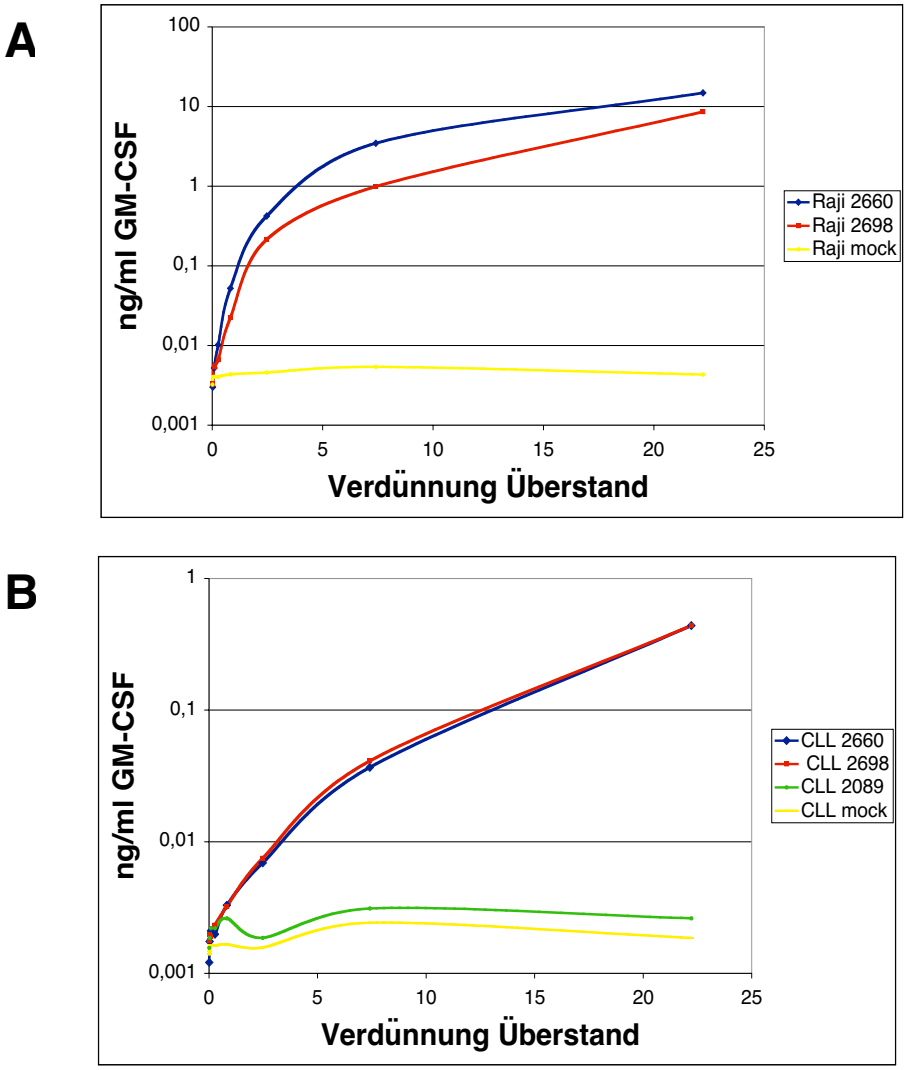


Abb.4.15: Proliferation von TF1-Zellen mit GM-CSF-haltigen Überständen aus Raji- und B-CLL-Zell-Infektionen mit GMC-CSF-EBV-Vektoren

Um die biologische Funktionalität des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF zu bestätigen, wurden Kulturüberstände aus der Transduktion von Raji-Zellen und B-CLL-Zellen mit den GM-CSF-Vektoren in Proliferationsexperimente mit TF1-Zellen (humane promyeloide Zelllinie) eingesetzt. Diese Zellen sind in ihrer Proliferation abhängig von GM-CSF. $5x10^3$ TF-1 Zellen wurden vier Tage lang mit Verdünnungsreihen (Volumenprozent % Kulturüberstand) der Kulturüberstände inkubiert. Die Proliferationsrate konnte anhand der MTT-Konversion photometrisch bei 690 nm bestimmt werden. Dargestellt sind auf der x-Achse die Verdünnungsreihe sowie auf der y-Achse der GM-CSF Gehalt in den eingesetzten Kulturüberständen. Die Überstände aus den Infektionen von Raji-Zellen (**A**) mit 2660 und 2698 (geerntet an Tag sechs) zeigten im Vergleich zu uninfizierten Raji-Zellen (Mock) ein deutliches Wachstum bis zur stationären Phase. Der GM-CSF-Gehalt beträgt dabei ungefähr 30 ng/ml. Die Kulturüberstände aus B-CLL-Zell-Infektionen (**B**) mit 2660 und 2698 (geerntet an Tag acht) induzierten ebenfalls Wachstum, aufgrund der geringeren Konzentration (ca. 700 pg/ml) wurde die stationäre Phase allerdings nicht erreicht. Sowohl das nach Gentransfer sezernierte GM-CSF aus den Überständen der GM-CSF-Vektor-Infektionen von Raji-Zellen und B-CLL-Zellen sind daher biologisch aktiv. Die ermittelten GM-CSF-Gehalte in den Kulturüberständen stimmen in der Größenordnung mit den Ergebnissen aus ELISA-Messungen überein (nicht gezeigt). Es ist exemplarisch einer von drei Versuchen gezeigt.

4.5.2. Etablierung eines Reifungsprotokolls für DC aus monozytären Vorläufern mittels GM-CSF und IL-4

Die effizientesten Antigen-präsentierenden Zellen sind reife, immunkompetente dendritische Zellen (DC) (Banchereau et al., 2000; Banchereau et al., 1998; Steinman, 1991). Sie können Antigene in Immunogene umwandeln und über ihre Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC I und II) naiven und spezifischen T-Zellen präsentieren. GM-CSF ist kritisch für das Überleben und die Differenzierung der DC *in vitro*. Sie können unterschiedlicher Herkunft sein und zum Beispiel entweder von CD34-positiven Stammzellen aus dem Knochenmark oder CD14-positiven, monozytären Vorläufern aus dem peripheren Blut abstammen. Die Population der dendritischen Zellen ist sehr heterogen und variiert *in vitro* und *in vivo*. In dieser Arbeit wurde der am weitesten verbreitete Ansatz zur DC-Reifung mit einer Kombination aus GM-CSF, Interleukin-4 (IL-4) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) aufgegriffen und adaptiert (Bender et al., 1996; Romani et al., 1996). Es sollte demonstriert werden, dass mit nach Gentransfer sezerniertem GM-CSF eine funktionelle Reifung von DC *in vitro* erreicht werden kann.

Myelo-monozytäre Vorläuferzellen für die Reifung von dendritischen Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender (mit bekanntem HLA-Typ) über einen Ficoll-Gradienten isoliert (siehe Methoden 3.2.3). Es wurden verschiedene Methoden ausgetestet, um eine möglichst saubere CD14-positive Population aus den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) zu isolieren. Dabei war zu beachten, dass ‚manueller Stress' (Koppelung an Beats, häufige Waschschritte) bereits einen Reifungsstimulus auslöst, der dazu führt, dass der Effekt des GM-CSF nicht mehr klar herausgestellt werden kann, da die charakteristischen Oberflächenmarker (wie z.B. CD83) auf einigen Zellen schon exprimiert sind. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn unbeschichtete Plastikschalen (Greiner) mit humanen γ-Globulinen (1μg/ml Endkonzentration in PBS) zwanzig Minuten lang beschichtet und zur Zellaufreinigung verwendet wurden. Hauptsächlich monozytäre Zellen, die den Fc-Rezeptor exprimieren, bleiben dadurch an der Oberfläche haften. Andere Zellen können vorsichtig abgewaschen werden. Die Zellen wurden vier bis fünf Tage mit GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) inkubiert, bis sich große, unreife DC von der Unterlage ablösten. Diese wurden überführt in Vollausreifungsmedium, das

Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), Interleukin-1β (IL-1β) und ProstaglandinE_2 (PGE_2) enthielt, und in diesem Medium bei 37°C weitere 24 Stunden inkubiert (Abb.4.16.A). IL1-β und TNF-α sind involviert in den Reifungsprozeß und sollen die T-Zell-Stimulationsfähigkeit verbessern (Romani et al., 1994; Sallusto et al., 1994). Der Reifungszustand der DC konnte anhand der Färbung von Oberflächenmarkern wie CD14, CD83 und CD86 in der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Der Monozyten-Makrophagen-Marker CD14 sollte dabei niedrig exprimiert sein, der DC-typische Oberflächenmarker CD83 und das kostimulatorische Molekül CD86 hoch. In Abbildung 4.16.B sind reife DC nach sechs Tagen mit IL-4 und GM-CSF sowie dem Vollausreifungsmedium im Mikroskop dargestellt. Sie zeigen den typischen polymorphen Phänotyp mit vielen tentakel-ähnlichen Ausläufern. Ebenfalls charakteristisch ist die durch die Reifung bedingte Größenänderung der DC (Abb4.16.C). Im ‚Vorwärts und Seitwärts-Streulicht' ist eine deutliche Verschiebung der distinkten Population (einmal mit und einmal ohne GM-CSF gereift) zu sehen. Bereits diese makroskopischen Änderungen lassen sich grösstenteils auf den Effekt des GM-CSF zurückführen.

4.5.3. Gewinnung von GM-CSF-haltigen Überständen aus Raji-Infektionen

Da die Raji-Zellen in den Transduktionsexperimenten eine deutlich höhere GM-CSF-Expression erzielten, wurden diese zuerst einmal als Produzenten des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF verwendet. In einem optimierten Infektionsprotokoll wurden 1,5 $x10^5$ Raji-Zellen in kleinem Volumen (500 µl) mit einer MOI von 0,3 drei Tage lang infiziert. Die 40 % transduzierten Raji-Zellen sezernierten in dieser Zeit 12 ng/ml GM-CSF. Auf diese Weise konnte hochkonzentrierter, GM-CSF-haltiger Kulturüberstand in größeren Mengen gewonnen werden. Es wurde eine Standardkurve angelegt, um die Aktivität (U/ml) des rekombinanten GM-CSF (Leukomax®, Sandoz), das in meinen Experimenten zur Reifung von DC verwendet wurde, zur Deckung zu bringen mit der Menge (ng/ml) des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF in den Kulturüberständen. Berechnet wurde, dass ungefähr 5,6 ng des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF 800 Einheiten des rekombinaten GM-CSF

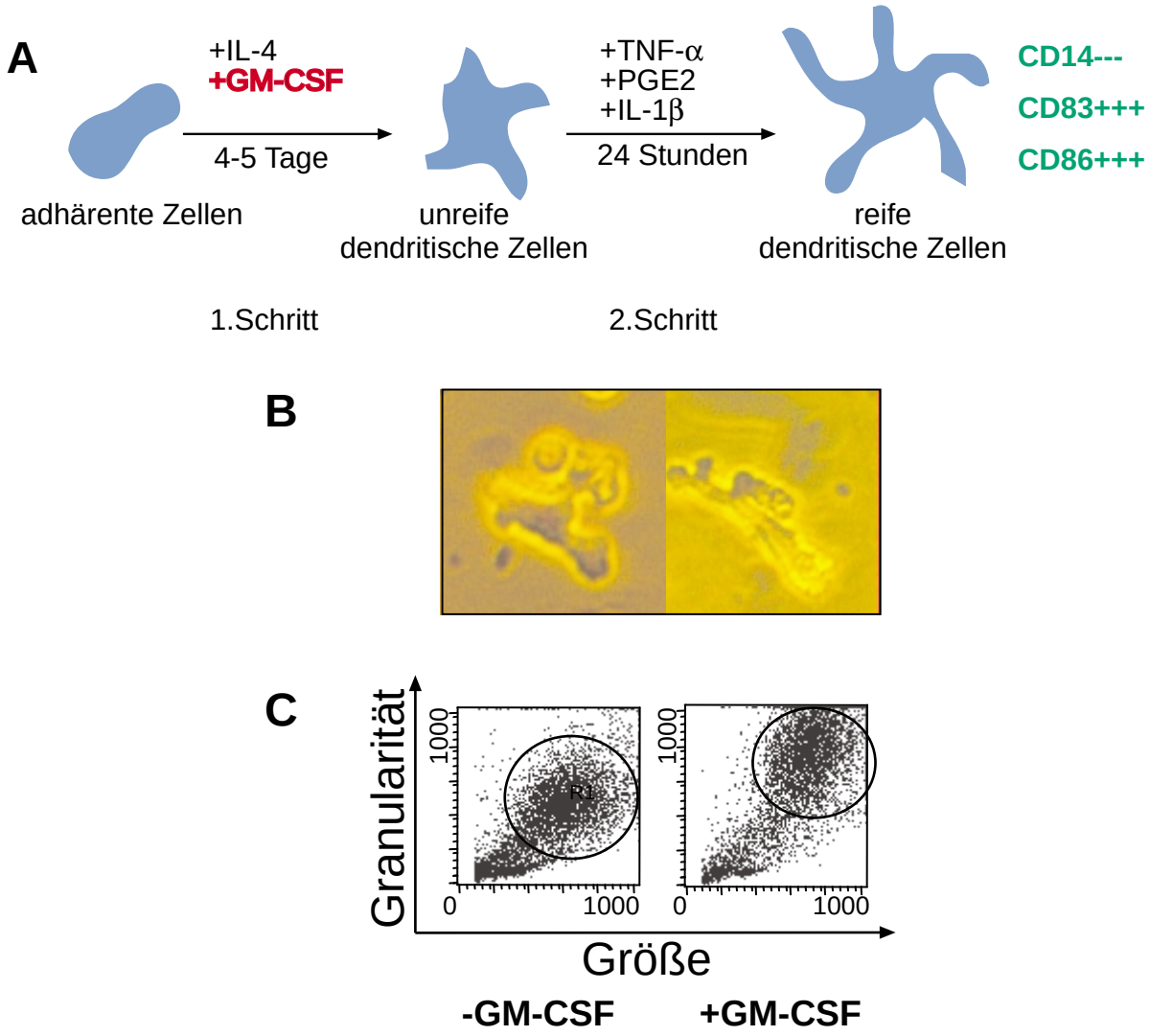


Abb.4.16: Schematische Darstellung des Reifungsprotokolls für dendritische Zellen (DC) aus myelo-monozytären Vorläuferzellen des peripheren Bluts und makroskopische Darstellung des Phänotyps

(**A**) Peripheres Blut von gesunden Spendern wurde über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und die Zellen in der Interphase auf IgG-beschichteten Plastikschalen ausgesät. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurden die nicht-adhärierten Zellen entfernt. Nach einem zweiten Waschschritt am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von IL-4 (500 U/ml) und humanem GM-CSF (800 U/ml rekombinant oder ≈ 18ng Raji-sezerniert). Alle zwei Tage wurde frisches Medium mit Zytokinen dazugegeben. Nach ca. vier Tagen erfolgte die Zugabe von TNF-α (2,5 ng/ml), PGE_2 (0,5 μg/ml) und IL-1β (2 ng/ml) für 24 Stunden. Die Zellen lösen sich von der Platte und reifen zu DC heran. Als Reifemarker wurden die DC in der Durchflusszytometrie auf CD14 (negativ), CD86 (stark positiv) und CD83 (stark positiv) untersucht. (**B**) In der Durchlichtmikroskopie zeigen die reifen DC einen typischen, polymorphen Phänotyp. Sie sind sehr groß und haben lange Ausläufer. In Abbildung (**C**) sind Reifungsansätze mit und ohne GM-CSF dargestellt. ‚Vorwärts- und Seitwärts-Streuleicht' einer Durchflusszytometrie zeigen, dass die Granularität und Größe der Zellen mit GM-CSF stark zunimmt. Dies bestätigt den Beitrag von GM-CSF bei der Reifung von DC.

entsprechen. Diese Berechnungen dienten als Grundlage für die Konzentrationsberechnung zum Einsatz der GM-CSF-haltigen Raji-Überstände in den folgenden Experimenten zur DC-Reifung. Es wurde darauf geachtet, dass gleiche Mengen des Zytokins unterschiedlicher Herkunft eingesetzt wurden.

4.5.4. Reifung von DC aus monozytären Vorläufern des peripheren Bluts mit Hilfe des nach Gentransfer in B-Zellen sezernierten GM-CSF

4.5.3.1. Nachweis der DC-typischen Oberflächenmarker

Wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben, wurde aus den Blutproben verschiedener gesunder Spender die monozytäre Fraktion über Adhärenz an γ-Globulin-beschichteten Polystyrol-Plastikschalen isoliert (Methoden 3.2.3). Es wurden fünf verschiedene Reifungsansätze parallel inkubiert. Sie unterscheiden sich jeweils nur durch die Herkunft des eingesetzten GM-CSF, wurden sonst aber mit dem exakt gleichen Vollausreifungscocktail (24 Stunden; TNF-α, PGE_2, IL-1β) angesetzt. Ziel war es, den Effekt des GM-CSF bei der DC-Reifung anhand der charakteristischen Oberflächenmoleküle darzustellen. Außerdem sollte demonstriert werden, dass das nach Gentransfer sezernierte GM-CSF die selbe Funktionalität zeigt wie das rekombinante. Zur Kontrolle erfolgte in zwei Zellkulturansätzen die DC-Reifung ohne GM-CSF, entweder nur mit IL-4 (a) oder IL-4 und Zellkulturüberstand aus uninfizierten Raji-Zellen (b). Drei weitere Ansätze zeichneten sich durch den Zusatz von GM-CSF verschiedener Herkunft aus. Entweder rekombinantes GM-CSF (Leukomax®) (c) oder die Kombination aus uninfiziertem Zellkulturüberstand (Mock) wie in (b) und rekombinantem GM-CSF (=d) wurden eingesetzt. Als fünfter Ansatz wurde eine Teilmenge der Zellen mit Überständen aus 2698-infizierten Raji-Zellen (e) inkubiert. Die Menge des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF war dabei wie in Abschnitt 4.5.2 erklärt an die Konzentration des rekombinanten angeglichen worden. Das mehrfach reproduzierte Ergebnis eines Spenders ist exemplarisch in Abbildung 4.17 dargestellt. Zu sehen sind die Abnahme der CD14-Oberflächenexpression und die Zunahme der CD83-Oberflächenexpression. Die Moleküle CD86 und HLA-A,B,C (nicht gezeigt) wurden ebenfalls angefärbt, waren aber ähnlich hoch exprimiert in

allen Ansätzen. Deutlich wurde aus diesen Versuchen, dass GM-CSF verantwortlich ist für die erhöhte Expression von CD83 auf der Zelloberfläche und damit der Ausbildung eines DC-typischen Phänotyps. Das sezernierte GM-CSF verhält sich dabei ebenso funktionell wie das rekombinante. Allerdings ist auch ersichtlich, dass in den Raji-Zellkulturüberständen bereits Zytokine enthalten sind, die die Reifung begünstigen (gemessen im Multiplexgerät der Firma Biorad: IL-8, TNF-α etc.; nicht gezeigte Daten). Trotzdem bleibt der Beitrag des nach Gentransfer sezernierten GM-CSF klar sichtbar, wenn man den Ansatz (b) mit Raji-Zellkulturüberstand mit den An-

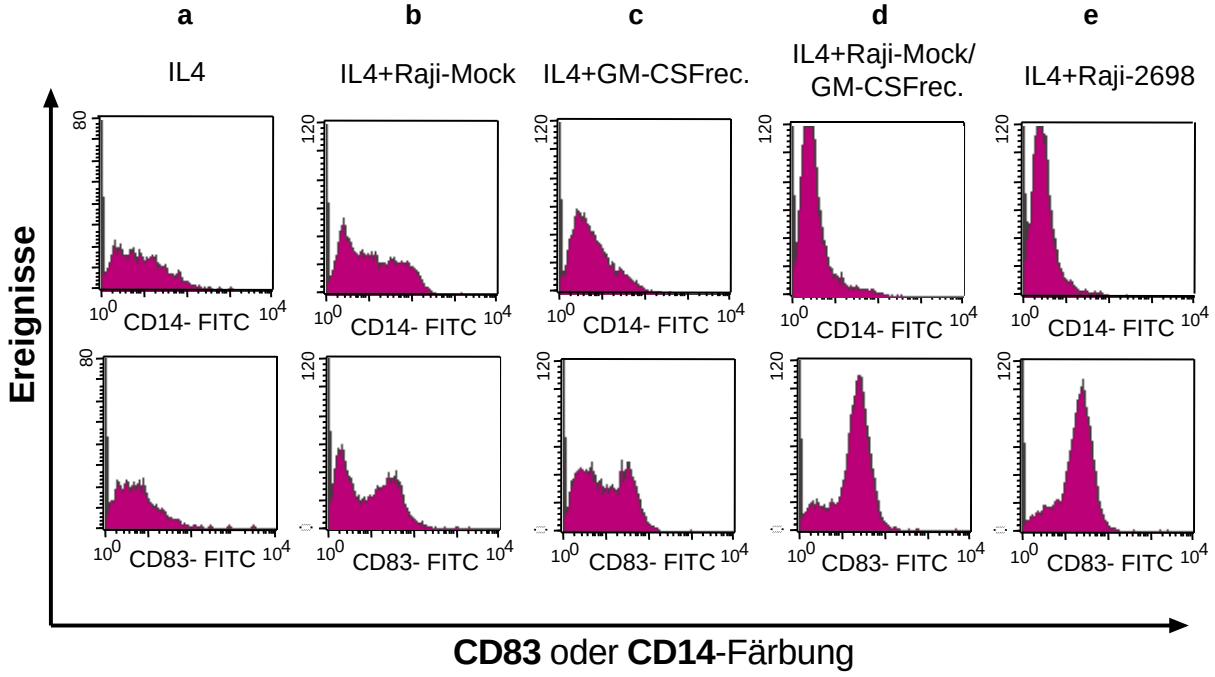


Abb.4.17: Charakterisierung der mit nach Gentransfer sezerniertem GM-CSF *in vitro*-gereiften DC im Durchflusszytometer

Ziel war anhand der Reifung von DC aus myelo-monozytären Vorläuferzellen des peripheren Bluts den Beitrag von GM-CSF in diesem Prozess zu zeigen. Ebenso sollte das rekombinante mit dem nach Gentransfer sezernierten GM-CSF verglichen werden. Die phänotypische Charakterisierung der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer. Dargestellt sind nach dem allgemeinen Prozedere von Abb.4.16 in unterschiedlichen Ansätzen gereifte DC. Es ist exemplarisch einer von mehreren Versuchen und Spendern gezeigt. In der CD14 und CD83-Färbung gezeigt sind folgende Reifungsansätze: mit IL-4 allein (a), IL-4/GM-CSF rekombinant (c), IL-4/Raji-Mock (= Zellkulturüberstand) (b), IL-4/Raji-Mock/GM-CSF rekombinant (d) und IL4/Raji-2698 (GM-CSF-haltige Überstände aus 2698-transduzierten Raji-Zellen) (e). Die Ansätze unterscheiden sich im ersten Schritt der Reifung zu unreifen DC, der Vollausreifungscocktail im zweiten Schritt ist bei allen gleich (Abb.4.16). Zu sehen ist der Verlust von CD14 auf der Oberfläche der mit GM-CSF gereiften Zellen und gleichzeitig die ansteigende CD83-Expression. Die mit IL-4/Raji-Mock/GM-CSF rekombinant oder IL-4/Raji-2698 inkubierten Ansätze zeigen den selben Phänotyp. Rekombinantes wie auch nach Gentransfer sezerniertes GM-CSF führen somit zum selben Phänotyp. In den Raji-Zellkulturüberständen (Mock) sind weitere Zytokine zu finden (IL-8, IL10, IL6 und TNFα, Multiplexmessung), die scheinbar zum Teil die Reifung unterstützen und daher bereits zu einer gewissen Induktion von CD83 führen.

sätzen, die zusätzlich GM-CSF enthalten, vergleicht (d = Raji-Mock mit GM-CSF rekombinant und e= Raji-2698).

4.5.3.2. Aktivierung spezifischer CD4-positiver T-Zell-Klone durch exogen beladene DC, die mit -nach Gentransfer sezerniertem- GM-CSF kultiviert wurden

Im vorangehenden Abschnitt konnte ich zeigen, dass die mit nach Gentransfer sezerniertem GM-CSF gereiften DC den spezifischen DC-Phänotyp zeigen. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, dass diese DC funktionell sind, Antigen präsentieren und T-Zellen Antigen-spezifisch aktivieren können. Um dies nachzuweisen, wurden CD4-positive T-Zell-Klone verwendet, die von Josef Mautner (Institut für klinische Molekularbiologie, GSF München) etabliert worden waren (Methoden 3.2.4). Voraussetzung war eine HLA-Kompartibilität zwischen dem DC-Blutspender und dem etablierten CD4-T-Zell-Klon, damit ein spezifisches Proteinepitop in Kombination mit dem passenden HLA-Molekül präsentiert werden konnte. Die Reifung der DC erfolgte wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben. Die unreifen DC wurden in 96-Loch-Platten in Vollausreifungsmedium in Gegenwart von Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), Interleukin-1β (IL-1β) und Prostaglandin E_2 (PGE_2) ausgesät und gleichzeitig mit Neomycin-Phosphotransferase als Modellantigen in verschiedenen Konzentrationen beladen. 5.000 bis 10.000 DC sind ausreichend, um eine deutliche T-Zell-Aktivierung herbeizuführen. Es wurden unreife DC zur Proteinbeladung eingesetzt, da diese über Phagozytose und Makropinozytose Antigene effizienter aufnehmen und prozessieren können (Sallusto et al., 1995). Durch die Reifung erwerben die DC die Fähigkeit, Peptid-beladene MHC II-Komplexe zu bilden und an die Oberfläche zu transportieren (Cella et al., 1997). Der Spender des peripheren Bluts zur DC-Reifung und der CD4-positive T-Zell-Klon wurden auf HLA-Kompatibilität überprüft (Labor Klein, Martinsried; J.Mautner, Institut für Klinische Molekularbiologie, GSF) und mehrere verschiedene MHC-identische oder ähnliche Pärchen von DC-Spendern und T-Zell-Klonen zusammengestellt. Der in Abbildung 4.19.B verwendete, CD4-positive T-Zell-Klon (20 4^A4) ist DP3-restringiert und reagiert gegen ein Epitop (Aminosäure 216-229 DRYQDIALATRDIA), das aus der Neomycin-Phosphotransferase II (Neomycin-Resistenzgen neo) gebildet wird (Nimmerjahn F., 2003). Es wurden pro Loch $1x10^5$ T-Zellen zugegeben und die

Aktivierung derselben 24 Stunden später ermittelt. Hierfür wurden die Überstände in einem ELISA-Verfahren auf GM-CSF als Aktivierungsmarker untersucht (Markus et al., 1995). Ebenso relevante Aktivierungsmarker sind TNF-α und IFN-γ. Die Prozedur der gesamten DC-Reifung, der Proteinbeladung und der anschließenden T-Zell-Aktivierung ist im Schema der Abbildung 4.18 dargestellt.

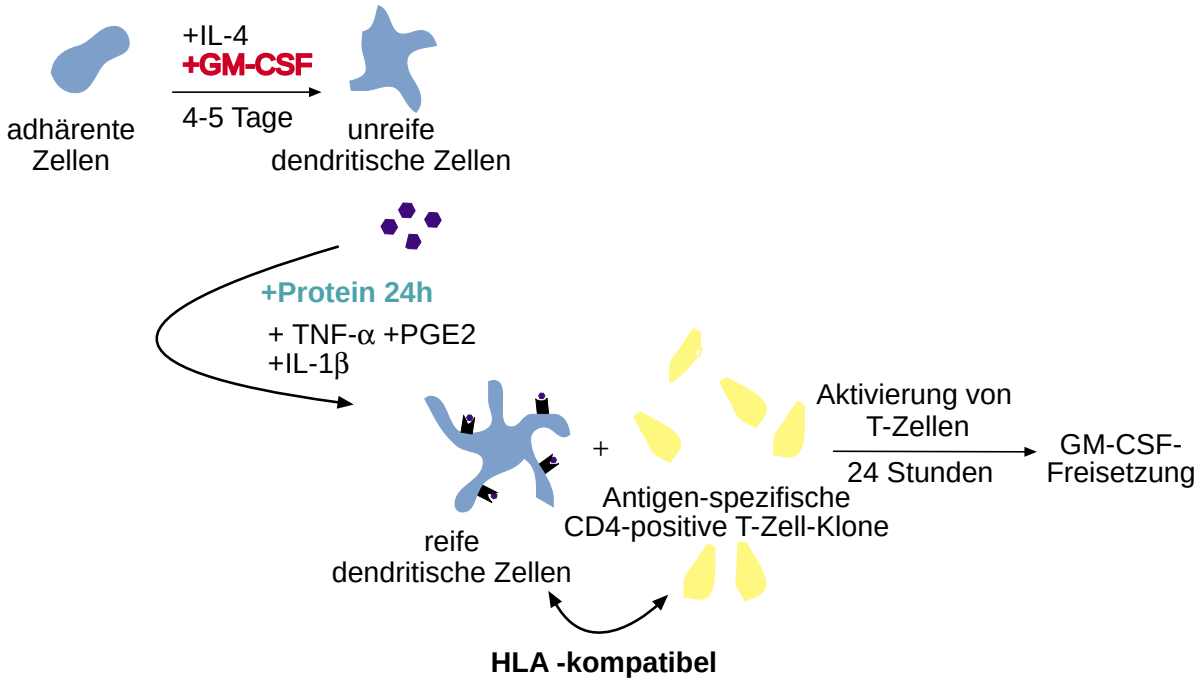


Abb.4.18: Aktivierung von spezifischen T-Zell-Klonen durch *in vitro* mit GM-CSF gereifte dendritische Zellen

Die Antigenpräsentationsfähigkeit der *in vitro* mit GM-CSF gereiften DC sollte anhand ihrer Aktivierung von spezifischen, HLA-getesteten T-Zell-Klonen charakterisiert werden. Dazu wurden unreife DC in 96-Loch-Platten in Reifungsmedium (TNF-α (2,5ng/ml), PGE_2 (0,5ng/ml) und IL-1β (2ng/ml)) ausgesät und exogen mit Protein beladen (ca. 24 Stunden). Voraussetzung ist die HLA-Kompatibilität des Spenders der DC und des T-Zell-Klons. Während der Endausreifung wird das Protein internalisiert und den T-Zellen auf MHCII-Molekülen präsentiert. Bevor die T-Zellen ($1x10^5$ pro Loch) zu den DC hinzugegeben werden, müssen letztere in der γ-Bestrahlungsanlage bestrahlt werden (50 Gray). Nach weiteren 24 Stunden können die Überstände aus der T-Zellaktivierung im ELISA auf GM-CSF-Freisetzung (oder auch andere Zytokine wie TNF-α oder IFN-γ) überprüft werden.

Ein Aliquot der unreifen DC wurde jeweils vor der Proteinbeladung entnommen und separat in Vollausreifungsmedium inkubiert, um sie anschließend durch die Färbung der Oberflächenmoleküle CD14, CD83 und CD86 sowie MHCII phänotypisch zu charakterisieren. Fünf verschiedene Differenzierungsansätze wurden parallel untersucht. Sie enthielten jeweils IL-4 (500U/ml) und unterschieden sich nur durch den Zusatz oder das Fehlen von GM-CSF. Zwei Ansätze wurden komplett ohne GM-CSF, nur mit Zellkulturüberständen aus Wildtyp-EBV-(2089) infizierten (a) oder

uninfizierten (b) Raji-Zellen gehalten. Die anderen drei Ansätze enthielten entweder rekombinantes GM-CSF alleine (c) oder in Kombination mit Zellkulturüberständen aus uninfizierten (Mock) Raji-Zellen (d) oder Überstände aus 2698-infizierten Raji-Zellen (e), die das nach Gentransfer sezernierte GM-CSF enthalten. Die Zellen wurden mit CD14-PE, CD83-FITC und CD86-APC Antikörpern gefärbt (siehe Methoden 3.4.2). Es sind jeweils Doppelfärbungen CD14-PE/CD83-FITC und CD86-APC/CD83-FITC in Abbildung 4.19.A gezeigt, die in der Durchflusszytometrie gemessen wurden. Eine Zellzählung nach der ersten Reifungsrunde ergab ungefähr die doppelte Zellzahl bei den mit GM-CSF gereiften Ansätzen im Vergleich zu unreifen, ohne GM-CSF gereiften Vorläufern. Dies ist sicherlich auf den Überlebens- bzw. Proliferationsstimulus des GM-CSF zurückzuführen. Durch die Inkubation mit GM-CSF bildet sich eine CD14-negative, sehr stark CD83-positive Population aus, die noch dazu CD86 sehr stark exprimiert. Diese Population stellt die DC dar. Da hier vor allem der prinzipielle Effekt des Zytokins im Mittelpunkt stand und nicht die Charakterisierung der Zellpopulationen, wurde auf weitere Färbungen mit DC-spezifischen Markern (wie CD11c, CD205, CD11a etc.) verzichtet. Wie schon in Kapitel 4.5.3.1 erwähnt, sezernieren Raji-Zellen Zytokine, die die Reifung von DC zusätzlich fördern, so dass eine Population mit einem ähnlichen Phänotyp entstand. Da die *in vitro*-Reifungsprozesse einer Zellpopulation selten vollständig einheitlich ablaufen und immer noch ein geringer Anteil an verunreinigenden B- oder T-Lymphozyten vorhanden ist, bleibt eine Zellpopulation, die nicht den gewünschten Phänotyp zeigt. Da das Zellgemisch, das anfangs zur Reifung eingesetzt wird, sehr empfindlich auf jeden Reifungsstimulus reagiert, wurde auf weitere Aufreinigungen im Vorfeld verzichtet. Zum Beispiel führten Inkubationen mit magnetischen Partikeln bereits zu einer gewissen Vorstimulation aller Zellen (d.h. CD83-Expression ohne GM-CSF-Reifung), so dass der Beitrag des GM-CSF nicht mehr ermittelt werden konnte.

A

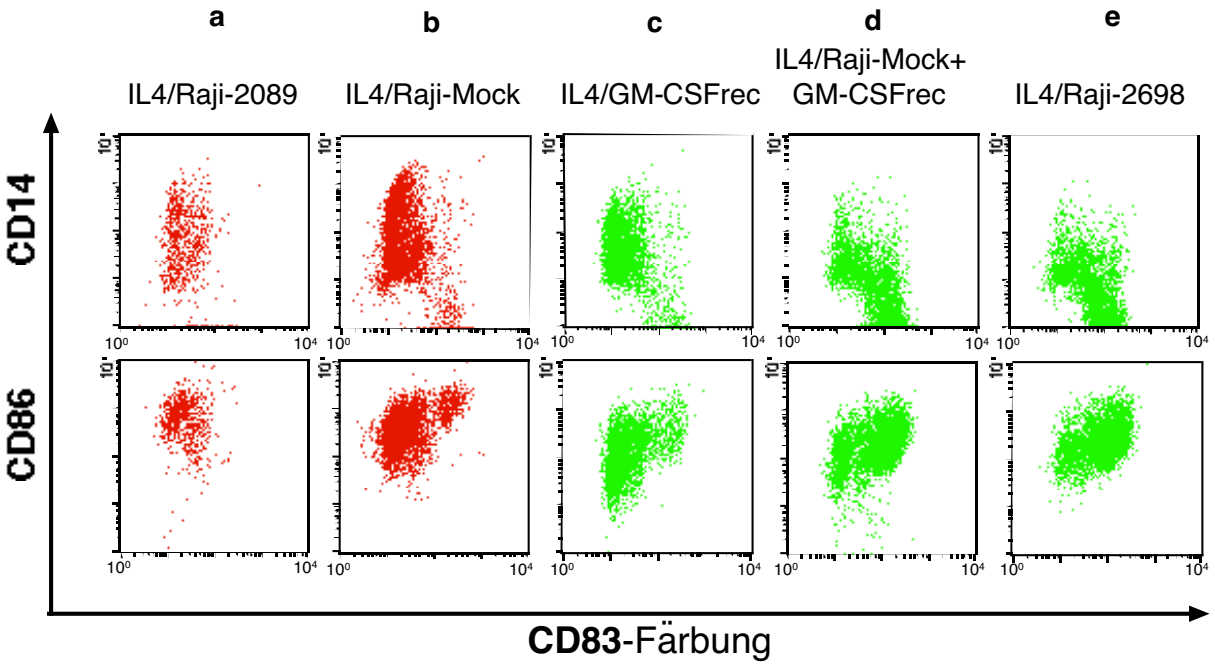
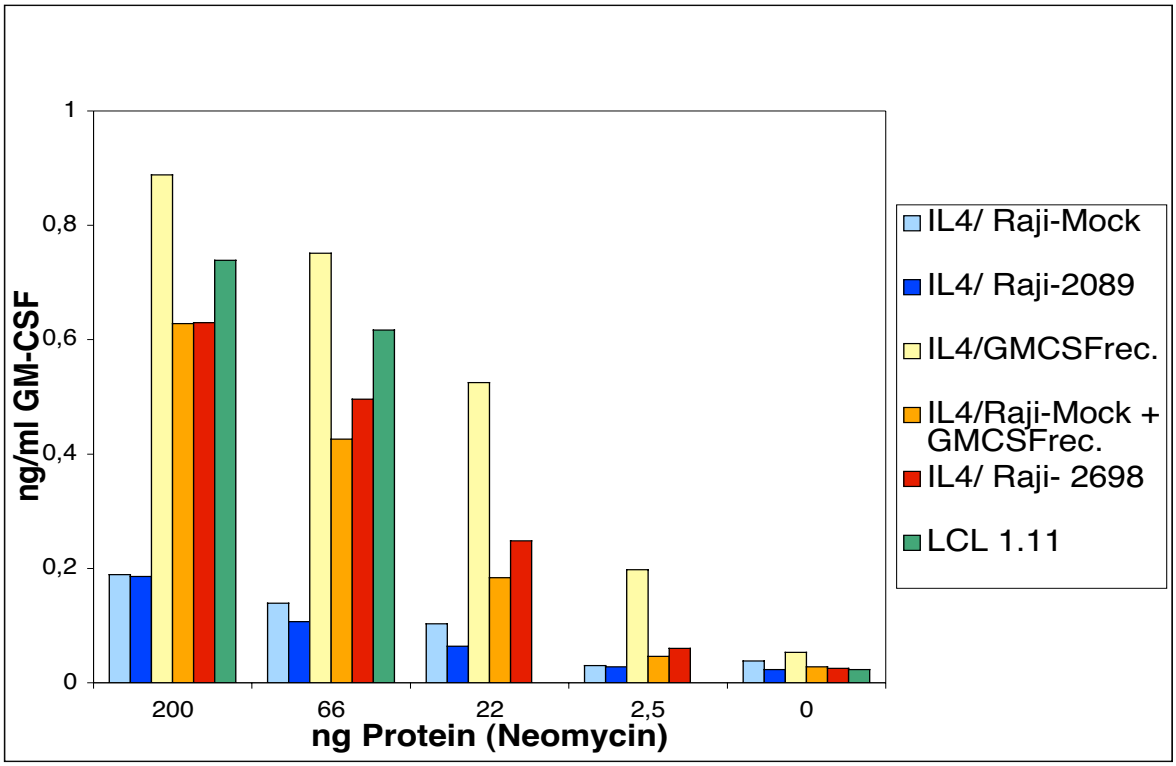


Abb.4.19: *In vitro*-Reifung von dendritischen Zellen und anschließende T-Zell-Aktivierung zur Evaluierung der Antigenpräsentationsfähigkeit

In Teil (**A**) der Abbildung ist die phänotypische Charakterisierung der *in vitro* gereiften DC in der Durchflusszytometrie gezeigt. Die Reifung erfolgte wie in Abb.4.16. Dargestellt sind fünf parallele Reifungsansätze ohne und mit GM-CSF (rekombinant oder nach Gentransfer sezerniert). Es handelt sich jeweils um eine Dreifachfärbung CD14-PE, CD83-FITC und CD86-APC. Gegeneinander aufgetragen sind in der ersten Reihe CD14-PE und CD83-FITC, in der zweiten Reihe CD86-APC und CD83-FITC. Angefärbt wurden zwei Reifungsansätze ohne GM-CSF (IL-4/Raji-2089- mit Überständen aus einer EBV-Wildtyp-Infektion mit 2089 und IL-4/Raji-Mock) und drei Reifungsansätze mit GM-CSF (IL-4/GM-CSF rekombinant, IL-4/Raji-Mock/GM-CSF rekombinant und IL-4/Raji-2698 mit Überständen aus 2698-transduzierten Raji-Zellen). Deutlich wird, dass durch den Zusatz von GM-CSF (grüne Ansätze) eine CD14-negative und CD83-positive Population entsteht, die wie in der zweiten Reihe zu sehen ist, sehr stark CD86/CD83 doppelt-positiv ist. Der Vergleich der Ansätze IL-4/Raji-Mock mit IL-4/Raji-Mock/GM-CSF rekombinant oder IL-4/Raji-2698 zeigt den Beitrag von GM-CSF bei der Entstehung einer CD14-negativen, CD83 und CD86-positiven Population. Das nach Gentransfer sezernierte GM-CSF erfüllt damit dieselben Funktionen wie das rekombinante.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass GM-CSF die Reifung der myelo-monozytären Zellpopulation zu Zellen mit einem DC-Phänotyp fördert und das nach Gentransfer sezernierte GM-CSF dabei ebenso effizient funktioniert wie das rekombinante. Die verschiedenen Reifungsansätze wurden nun verwendet, um CD4-positive T-Zellen zu aktivieren (Schema Abb.4.18). Als Positivkontrolle wurde die lymphoblastoide, EBV-transformierte B-Zelllinie LCL-1.11 (DP3) verwendet (Nimmerjahn F., 2003). Die Zellen der verschiedenen Reifungsansätze wurden mit

B



(**B**) Diese unterschiedlichen DC-Ansätze wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Antigen zu präsentieren und damit T-Zellen zu aktivieren. Die T-Zell-Aktivierung wurde nach dem Prozedere in Abb.4.18 mit dem DP3-restringierten CD4-positiven T-Zell-Klon 20-4/A4 durchgeführt, der spezifisch für das Protein Neomycin ist. Auf der x-Achse aufgetragen ist die Titration des Proteins Neomycin, auf der y-Achse die Aktivierung des T-Zell-Klons gemessen an der GM-CSF-Freisetzung im ELISA. Als Kontrolle mitgeführt wurde eine lymphoblastoide Zelllinie (LCL 1.11) (grün), die dem T-Zell-Klon über DP3 spezifisch Neomycin präsentieren kann. Die ohne GM-CSF gereiften Zellen konnten den T-Zell-Klon geringfügig aktivieren (hellblau und dunkelblau). Es handelt sich in diesem Ansatz wahrscheinlich nicht um vollständig ausgereifte, funktionelle DC, sondern weitgehend um CD14-positive Zellen, die schlechter Antigene präsentieren können. Durch die Inkubation mit GM-CSF entstehen funktionstüchtige DC, die wie die LCLs sehr gut Neomycin präsentieren können (gelb, orange, rot). Auf welcher Ebene das Zytokin die Fähigkeit Antigen zu präsentieren und T-Zellen zu aktivieren, beeinflusst, ist noch nicht vollständig verstanden. DC, die mit nach Gentransfer sezerniertem GM-CSF gereift wurden, das aus 2698-transduzierten Raji-Zellen stammt (rot), zeigen in diesem Test im Wesentlichen dieselbe Funktionalität wie die mit rekombinantem GM-CSF gereiften DC (gelb).

200, 66, 22 oder 2,5 ng Neomycin-Phosphotransferase II-Protein (neo) inkubiert und der Aktivierungszustand der T-Zellen 24 Stunden später über die GM-CSF-Ausschüttung bestimmt. Anhand der Negativkontrolle (ohne Protein) wird deutlich, dass ein Übertrag von GM-CSF-Protein aus den Reifungsansätzen ausgeschlossen ist. Die ohne GM-CSF gereiften Zellen zeigen kaum ein T-Zell-Aktivierung, während die mit verschiedenen GM-CSF-Kombinationen gereiften Zellen zu einer deutlich sichtbaren Aktivierung führen. Zwei Faktoren dürften dabei eine Rolle spielen. Zum einen ist der Anteil der Zellen mit einem klaren DC-Phänotyp in den Ansätzen mit GM-CSF deutlich größer und zum anderen erhöht das Zytokin die Fähigkeit der

Zellen, das Protein aufzunehmen und zu präsentieren (Cella et al., 1997; Sallusto et al., 1994).

Nach Gentransfer sezerniertes GM-CSF scheint also *in vitro* in der Lage zu sein, reife DC zu generieren, die in der Lage sind, Antigen sehr effizient CD4-positiven T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren.

5. Diskussion

5.1. Genvektoren auf der Basis von Maxi-EBVs

5.1.1. Sicherheitskriterien als entscheidende Parameter

Bis vor einigen Jahren war es noch nicht möglich, das EBV-Genom gezielt genetisch zu manipulieren. Neben Wildtyp EBV-Stämmen gab es nur zwei spontan entstandene EBV-Mutanten, die sich für genetische Experimente prinzipiell eignen: P3HR1 und Raji. Der EBNA2-defiziente EBV-positive Laborstamm P3HR1 ermöglicht zwar das Einbringen von einzelnen mutierten Genen in Kombination mit dem EBNA2-Gen in das EBV-Genom, jedoch entstand dabei intaktes, immortalisierendes EBV. Darüber hinaus war die Generierung von Mutanten ausschließlich in den eukaryontischen P3HR1-Zellen möglich (Tomkinson et al., 1993b). Problematisch und aufwendig blieb auch der Aufreinigungsschritt der rekombinanten Viren, um Wildtypkontaminationen auszuschließen. Idealerweise sollte die Konstruktion von viralen Vektoren jedoch in Bakterien vollzogen werden, da diese viel einfacher genetisch zu manipulieren sind. Durch die Einführung eines prokaryontischen Replikons in das virale EBV-Genom kann dieses als ‚single copy'-Plasmid in *E. coli* genetisch verändert werden (Delecluse et al., 1998). Auf diesem Maxi-EBV-Plasmid wurden dadurch alle EBV-Gene einer genetischen Veränderung zugänglich gemacht.

Dieses System habe ich in meiner Arbeit erstmals dazu verwendet, um einen sicheren EBV-Basisvektor zu klonieren. Wenige Gene im EBV-Genom gelten als essenziell für die B-Zell-Immortalisierung. Dazu zählen die nukleären Antigene EBNA1 und EBNA2, sowie EBNA3A und EBNA3C, die sich trotz großer Homologien nicht gegenseitig ersetzten können (Tomkinson et al., 1993a). LMP1-Deletionsmutanten weisen eine geringere Immortalisierungsfrequenz auf (Dirmeier, 2003) und LMP1 ist folglich essenziell für die Effizienz der B-Zell-Transformation (Kaye et al., 1993). Durch die Deletion der LMP1- und EBNA2-Gene wurde ein EBV-Genvektor geschaffen, der *in vitro* keine B-Zellen mehr immortalisieren kann. Darüber hinaus wurde BZLF1 deletiert, das als molekularer Schalter für den Übergang von der latenten zur lytischen Phase von EBV verantwortlich ist. Das

BZLF1-Gen gehört zur Familie der ‚immediate-early'-Gene und ist das Schlüsselgen bei der Induktion des lytischen Zyklus. Es kann transient transfiziert werden, um bei stabil transfizierten HEK293-Zell-Klonen, die rekombinantes Maxi-EBV tragen, den lytischen Zylus zu induzieren und rekombinanten EBV-Vektor zu generieren. Die so entstandene Dreifachdeletionsmutante liegt in infizierten B-Lymphozyten im latenten Zustand vor und kann den lytischen Zyklus nicht induzieren. Diese Dreifachdeletionsmutante erfüllt damit grundlegende Sicherheitsanforderungen an einen Genvektor für eine Anwendung in der *ex vivo*-Gentherapie. Das EBNA1-Gen, das in der latenten Phase der EBV-Infektion die extrachromosomale DNA-Replikation und damit auch die Expression des Transgens sichert, ist nach dem momentanen Stand der Wissenschaft noch nicht ersetzbar. Dies wäre zukünftig jedoch wünschenswert, da mit diesem Gen ebenfalls transformierende Eigenschaften verknüpft werden (Wilson et al., 1996). Die EBNA3-Genfamilie, die vermutlich in die Feinregulation der Immortalisierung von primären B-Zellen involviert ist, scheint allerdings entbehrlich zu sein für die Konstruktion von EBV-Genvektoren und könnte in weiteren Ansätzen ebenfalls deletiert werden.

Problematisch bleibt die grundsätzliche Möglichkeit von Rekombinationsereignissen zwischen dem Genvektor und Wildtyp-EBV in einer EBV-infizierten Zielzelle, da 90% der Bevölkerung das Virus lebenslang trägt. Die Rekombinationseffizienz scheint aber im Fall von EBV einige Größenordnungen niedriger zu sein als bei anderen Herpesviren, z.B. α-Herpesviren (Delecluse et al., 2000). Die Wahrscheinlichkeit wird durch die Deletion des BZLF1-Gens reduziert, da die Induktion des lytischen Zyklus Voraussetzung für Rekombinationsereignisse ist, die meistens während des Verpackungsprozesses des viralen Genoms stattfinden. Da vermutlich die Größe des zu verpackenden EBV-Vektors entscheidend ist (Delecluse et al., 1999), dürfte bei den Maxi-EBV-Vektoren die Frequenz deutlich unter 1% (persönliche Mitteilung Eva Hettich, Arbeisgruppe Vaecgene) liegen. Allerdings bleibt ähnlich wie bei anderen viralen Vektoren ein Restrisiko auf Grund der großen Homologien bestehen.

5.1.2. Expression des Transgens

Die Maxi-EBV-Vektoren besitzen eine hohe Klonierungskapazität für Transgene von bis zu 30 kb. Diese Klonierungskapazität wird vorgegeben durch die Deletion von

Genen, die Platz schafft für das Einfügen neuer Gene und der maximalen Verpackungsgröße des Virusgenoms in virale Partikel. Damit ist es möglich, multiple Expressionskassetten für mehrere therapeutische Gene oder auch ganze Gen-Loci in das EBV-Genom einzusetzen. Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war die Insertion des Transgens GM-CSF in die Dreifachdeletionsmutante. Dafür wurden verschiedene Expressionskassetten für das Transgen kloniert und diese dann über homologe Rekombination in den EBV-Basis-Genvektor eingesetzt. Drei der Konstrukte trugen den starken CMV-Promotor des Cytomegaloviruses, eines den retroviralen LTR-Promotor des, 'Spleen Focus Formingvirus' (SFF) und ein weiteres Konstrukt exprimiert das GM-CSF über den *W*-Promotor des EBV. Gute Ergebnisse erzielten zwei EBV-Genvektoren, die das GM-CSF mittels CMV-Promotor exprimierten vor allem in Raji-Zellen (2660 GM-CSF-IRES-GFP-Vektor und 2698 GM-CSF-BCMGS-Vektor) (Abb. 4.7 und 4.13). Dies führte zu recht hohen Expressionsraten des Transgens (bis zu 10ng/3x10^5 Zellen/6 Tagen) und einer stabilen Expression über mindestens eine Woche. Im Falle des 2660-Vektors wurde das Transgen über ein kommerziell erhältliches IRES-Konstrukt (Clontech) exprimiert, das die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA ermöglicht. Das Transgen wurde damit in der Nähe des F-Faktors im prokaryontischen Anteils des Maxi-EBV-Vektors integriert. Es zeigte sich allerdings, dass das GFP als zweites translatiertes Protein schwächer exprimiert wurde, und daher die Infektionsrate des 2660-Maxi-EBV-Vektors in B-CLL-Zellen schwerer abschätzbar war. Im 2698-Maxi-EBV-Vektor basiert die Expressionskassette für GM-CSF auf dem BCMGS-Plasmid (Karasuyama et al., 1990), das bis auf die Bovinen Papillomvirus-Sequenzen komplett in den Maxi-EBV-Basisvektor umgesetzt wurde. Die guten Expressionsergebnisse nach Transduktion von Maus-B-Zell-Lymphomzellen mit dem GM-CSF-exprimierenden BCMGS-Plasmid (Strehl et al., 1999), konnten mit dem 2698-Maxi-EBV-Vektor bestätigt werden. Der SFF-Promotor erzielte wider Erwarten überhaupt keine Expression des Transgens, obwohl er sich besonders gut für die Expression in hämatopoetischen Zellen eignen sollte (Baum et al., 1997). Dies blieb unverständlich, mag aber an Interferenzen mit EBV-Regulatoren oder benachbarten Sequenzen liegen. Der 2965-Maxi-EBV-Vektor (*W*p-GM-CSF), der das GM-CSF-Gen anstelle des EBNA2-Gens ins EBV-Genom inseriert trägt, scheint ein vielversprechender Kandidat zu sein für eine höhere

Transgenexpression vor allem in B-CLL-Zellen (Abschnitt 4.2.1, Abb.4.6). Unter normalen Zellkulturbedingungen findet *in vitro* keine Immortalisierung von B-CLL-Zellen statt, da zwar EBNA2 aber nicht LMP1 neben anderen EBNA-Genen exprimiert wird (Maeda et al., 2001; Rickinson et al., 1982; Teramoto et al., 2000). Dies konnte auch in meinen Infektionsexperimenten von B-CLL-Zellen verschiedener Patienten mit Wildtyp-EBV (2089) gezeigt werden (Abb. 4.6). In der Immunoblot- und FACS-Analyse ließ sich die EBNA2-Expression darstellen. In der frühen Phase der Infektion wird EBNA2 vom *W*p-Promotor exprimiert, der auf den ‚Internal Repeats' von EBV kodiert vorliegt und in mehreren Kopien vorhanden ist. Während der Infektion kommt es dann zum Promotor-Switch (*C*p-Promotor), wobei das EBNA2-Protein selbst über EBNA2-abhängige Sequenzen daran beteiligt ist (Woisetschlaeger et al., 1991; Woisetschlaeger et al., 1990). Beide Promotoren scheinen sich ergänzende Funktionen zu haben und können sich ersetzen (Yoo et al., 1997). Wie sich diese Situation *in vivo* in B-CLL-Zellen darstellt ist bisher allerdings unklar. Möglicherweise ist dort die Expression der EBNA-Proteine anders reguliert (Laytragoon-Lewin et al., 1995). Infektionsexperimente von Raji-Zellen und B-CLL-Zellen mit dem 2698-Maxi-EBV-Vektor stehen noch aus und werden sicherlich Aufschluß geben.

Die Insertionsstelle der Transgen-Expressionskassette scheint nach den bisherigen Ergebnissen nicht unbedingt kritisch zu sein für die GM-CSF-Expression. Vielmehr sind wahrscheinlich andere Kriterien von Bedeutung, wie z.B. der Promotor, der Genvektortiter und die Vitalität der transduzierten Zellen.

5.2. Transduktion von B-Zellen mit den Maxi-EBV-Genvektoren

Die von mir klonierten unterschiedlichen GM-CSF-Vektoren sollten verwendet werden, um Raji-Zellen und B-CLL-Zellen zu transduzieren und die Expression des Transgens zu evaluieren. Dafür mußten zuerst einmal stabile HEK293-Klone etabliert werden, die die GM-CSF-Vektoren episomal tragen und durch transiente Expression des BZLF1-Gens rekombinante Viruspartikel generieren (Abschnitt 4.3). Durch Aufkonzentration der Zellkulturüberstände wurden Viruspräparationen hergestellt, mit Konzentrationen von $5x10^5$- $2x10^6$ infektiösen Partikeln pro ml (Abschnitt 4.3.3). Mit diesen konzentrierten Viruspräparationen konnten bei einer MOI von 0,5 bei Raji-

Zellen Transduktionsraten von bis zu 50 % erreicht werden, bei B-CLL-Zellen ungefähr 10 bis 40 % (Abb.4.14). Der Vorteil der Maxi-EBV-Vektoren liegt darin, dass durch die spezifische B-Zell-Infektion über den CD21-Rezeptor bereits bei einer geringen MOI hohe Transduktionsraten erzielt werden (Wendtner et al., 2003). Bei anderen Genvektoren wie z.B Adenovirus-Vektoren wird eine MOI von 100 bis 500 benötigt, um zum Beispiel B-CLL -Zellen zu transduzieren. Der Grund für die schlechte Infektionsrate ist die geringe Expression des Integrins, das notwendig ist zur Internalisierung des Virus (Cantwell et al., 1996). Sicherlich wirkt sich dies negativ auf die Fitness und Vitalität der Tumorzellen aus. Limitierend wirkt zur Zeit bei den EBV-Vektoren noch der Virustiter von einigen 10^6 Viruspartikeln pro Milliliter, der im Gegensatz steht zu dem anderer viraler Vektoren (z.B Adenovirus-Vektoren oder AAV-Vektoren bis zu 10^{11} Viruspartikel pro ml) und dazu führt, dass die Infektionen in größerem Volumen stattfinden müssen, um eine ausreichende Zahl an Zellen zu transduzieren.

Die Mengen des exprimierten Transgens sind in der Raji-Zelllinie und den primären Tumorzellen sehr unterschiedlich. Während Raji-Zellen GM-CSF in Mengen von bis zu 10ng/3x10^5 Zellen/6 Tagen sezernieren, ist die Produktion durch B-CLL-Zellen ungefähr zehnfach bis zwanzigfach geringer (Abb.4.14.C und D). Dies liegt vor allem an der relativ geringen Vitalität der Tumorzellen *in vitro*. Außerdem ist natürlich der gesundheitliche Zustand des Patienten entscheidend. Obwohl wir vornehmlich versucht haben Material von nicht-therapierten Patienten oder solchen mit einem Rezidiv zu erhalten, ist nicht auszuschließen, dass geringe Transduktionsraten und Expressionsraten zum Teil an den Nachwirkungen einer Chemotherapie lagen. Die B-CLL-Zellen haben eine verlängerte Überlebenszeit, da sie in der nicht-proliferierenden G_0/G_1-Phase des Zellzyklus arretiert sind und der Apoptose entkommen. Charakteristisch dürfte auch im Gegensatz zu Raji-Zellen eine limitierte Transkriptionsfaktorausstattung sein. Darüber hinaus proliferieren die B-CLL-Zellen *in vitro* kaum und lassen sich deshalb schlechter infizieren. Durch den Zusatz von IL-4 ließ sich die Expressionsrate des Transgens geringfügig verbessern (nicht gezeigte Daten). Weitere Proliferationsstimuli wie z.B. CD40-Antikörper, die den CD40-Rezeptor stimulieren (Crawford et al., 1993), oder *Staphyloccocus aureus* Cowan-Stamm1 (SAC) oder IL-2 aktivieren B-CLL-Zellen und induzieren ebenfalls

Proliferation. Die Zellen überwinden damit die Zellzyklusarretierung und lassen sich besser mit EBV infizieren. Auf diese Art und Weise konnten sogar EBV-positive Zelllinien von B-CLL-Zellen *in vitro* generiert werden (Wendel-Hansen et al., 1994). Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es mit einer Kombination aus unterschiedlichen Stimuli wie z.B. SAC, IL-2, IL-4, IL-10, Thioredoxin, CD32-Ligand-‚Feeder-Layer' oder anti-CD40 monoklonalem Antikörper die B-CLL-Zellen über einen Zeitraum von bis zu einem Monat in vitalem Zustand und mit variabler Proliferationsrate zu kultivieren (Soderberg et al., 1999). Vorläufige Ergebnisse von Eva Hettich (Arbeitsgruppe Vaecgene) zeigen, dass auch die humane Fibroblasten-Zelllinie MRC5 als ‚Feeder-Layer' geeignet scheint, um eine höhere Transduktionseffizienz und Transgenexpression in B-CLL-Zellen zu erhalten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse legen nahe, dass es noch zahlreiche vielversprechende Ansätze gibt, die GM-CSF-Expression in B-CLL-Zellen zu verbessern. Sicherlich sind die *in vitro*-Zellkulturbedingungen weit entfernt von der *in vivo*-Situation, wo ein ausgeglichenes Zytokinumfeld dafür sorgt, dass die Tumorzellen nicht sofort absterben.

5.3. Funktionen des GM-CSF

Die Funktion von GM-CSF ist in der Literatur als sehr vielseitig beschrieben und umfaßt zahlreiche Funktionen in der Immunregulation und der Hämatopoese. GM-CSF erhöht die Anzahl der Neutrophilen, Eosinophilen und Monozyten im Blut und verbessert die Funktionalität von Monozyten (sowie deren Abkömmlinge) und Makrophagen. Insbesondere beschrieben ist die Rolle in der Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen (DC). Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, kostimulatorischen Molekülen und Antigen-präsentierenden Molekülen auf der Oberfläche ist zum großen Teil auf die Wirkung von GM-CSF zurückzuführen (Banchereau et al., 1998). Diese Fähigkeit macht GM-CSF zu einem wichtigen Faktor bei der Immunabwehr gegen Infektionen und Tumore. *In vivo*-Studien haben mehrfach gezeigt, dass GM-CSF-transduzierte Tumorzellen über die Rekrutierung von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen zu einer protektiven Anti-Tumorantwort führen und sich damit sehr gut als Vakzine eignen (Dranoff et al., 1993; Levitsky et al., 1996; Mahvi et al., 2002; Mahvi et al., 1997; Simons et al., 1997; Soiffer et al., 1998). Die Erkenntnisse aus zahlreichen

unterschiedlichen Tumormodellen und die klinischen Erfahrungen mit der systemischen Gabe von GM-CSF zur Unterstützung anderer Therapien (z.B. Chemotherapie), lassen GM-CSF als zell-basiertes Vakzin auch zur Immun-Gentherapie der CLL geeignet erscheinen.

Um die biologische Aktivität des nach GM-CSF-Genvektor-Transduktion von Raji-Zellen und B-CLL-Zellen sezernierten GM-CSF zu zeigen, wurde die promyeloide TF-1-Zelllinie mit Zellkulturüberständen aus diesen Infektionen inkubiert. Die TF-1-Zelllinie ist in ihrem Wachstum abhängig von GM-CSF und ihre Proliferationsrate kann daher zur relativen Konzentrationsbestimmung des GM-CSF-Gehalts in den Zellkulturüberständen, als auch zum Beweis der Funktionalität des Zytokins verwendet werden. Es zeigte sich, dass sowohl das von Raji-Zellen wie auch B-CLL-Zellen nach Gentransfer sezernierte Zytokin wachstumsfördernd auf TF-1-Zellen wirkt (Abb.4.15). Das Ergebnis aus ELISA-Messungen, das eine ungefähr zehnfach bis zwanzigfachl geringere Expression von GM-CSF in B-CLL-Zellen im Gegensatz zu Raji-Zellen demonstrierte, bestätigte sich hier. Darüber hinaus läßt dies den Schluß zu, dass das von Raji- und B-CLL-Zellen sezernierte Zytokin biologisch gleichwertig ist. Da die momentan noch recht geringen Expressionsraten in B-CLL-Zellen limittierend erschienen für eine weitere Austestung in anderen Versuchsreihen, wurden vorerst für die weitere Evaluierung der biologischen Funktionalität des GM-CSF Zellkulturüberstände von Raji-Zellen verwendet.

In einem der *in vivo*-Situation ähnlicherem Ansatz wurden diese GM-CSF-haltigen Raji-Überstände eingesetzt zur Generierung von DC aus CD14-positiven monozytären Vorläuferzellen des peripheren Bluts. Um den Beitrag des Zytokins dabei eindeutig feststellen zu können, mußte die Ausgangspopulation in einem möglichst wenig voraktivierten Zustand mit einem geringen Anteil an DC vorliegen. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen der intermediären Phase des Ficoll-Gradienten auf IgG-beschichten Plastikschalen ausgesät. Hauptsächlich Zellen, die Fc-Rezeptoren exprimieren, blieben an der Oberfläche haften. Der Effekt des GM-CSF wurde nach sechs- bis siebentägiger Reifung der Zellen mit IL-4 und GM-CSF, sowie anschließend für 24 Stunden TNF-α, IL-1β und PGE_2 anhand der Expression der Oberflächenmarker CD14, CD83 und CD86 evaluiert (Banchereau et al., 1998; Bender et al., 1996). Die Zytokine TNF-α, undI L-1β sind dabei notwendig, um einen irreversiblen, vollständig ausgereiften DC-Phänotyp zu erhalten (Romani et al., 1994;

Sallusto et al., 1994). Die Zellen wurden jeweils unter den gleichen Zellkulturbedingungen gehalten und die Ansätze unterschieden sich nur durch den Zusatz von GM-CSF. Es zeigte sich, dass bei den mit GM-CSF kultivierten Zellen das CD14-Oberflächenmolekül herunterreguliert und der DC-spezifische Marker CD83 dagegen hochreguliert wurde (Abb. 4.17). In einer Doppelfärbung konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die CD83-positiven Zellen sehr stark das kostimulatorische Molekül CD86 exprimieren (Abb.4.19) und somit über gesteigerte immunstimulatorische Eigenschaften verfügen. Darüber hinaus zeigte sich, dass Zellkulturüberstände von uninfizierten Raji-Zellen bereits eine differenzierungsfördernde Wirkung auf die Vorläuferzellen besitzen. Eine Messung von mehreren Zytokinen im Überstand von Maxi-EBV-Vektor infizierten Raji-Zellen ergab, dass IL-6, IL-8, IL-10 und TNF-α zusätzlich sezerniert werden. Obwohl IL-10 grundsätzlich in Zusammenhang gebracht wird mit einer inhibierenden Wirkung auf die Reifung von APC, während ihre Antigenaufnahmekapazität aufrecht erhalten bleibt (Banchereau et al., 1998; Mocellin et al., 2003), dominiert letztendlich die reifungsstimulierende Wirkung. In jedem Fall konnte bei dem Vergleich von DC-Reifungsansätzen mit Raji-Zellkulturüberständen beim Zusatz von rekombinantem GM-CSF oder nach Gentransfer sezerniertem GM-CSF der Beitrag des Zytokins deutlich demonstriert werden (Abb. 4.17.c,d,e und 4.19.A.c,d,e). Darüber hinaus konnte hervorgehoben werden, dass das sezernierte GM-CSF die Funktionen des rekombinanten Proteins gleichwertig übernehmen kann. Die typische Größenveränderung der gereiften DC konnte im Mikroskop betrachtet werden und zeigt sich darüber hinaus auch in der Durchflußzytometrie (Abb.4.16.B und C). Die Reifung von DC aus CLL-Patienten scheint *in vitro* prinzipiell ebenfalls möglich zu sein. Die DC besitzen eine normale Funktionalität, exprimieren aber ein untypisches Zytokinmuster (Rezvany et al., 2001). Dies legt nahe, dass GM-CSF-Sekretion in CLL-Patienten zu einem normalen DC-Phänotyp und einer normalen DC-Funktion führen. Das untypische Zytokinmuster könnte mit der Pathophysiologie der Krankheit verbunden sein.

Um die Funktionalität der *in vitro*-generierten DC noch besser zu charakterisieren, wurde ihre Fähigkeit eine T-Zell-Antwort auszulösen, überprüft. Dafür wurden Antigen-spezifische CD4-positive T-Zell-Klone verwendet, die das spezifische Antigen in Kombination mit einem speziellen MHCII-Typus auf APC erkennen. Voraussetzung für eine Erkennung des Antigens auf den DC ist die HLA-

Kompatibilität des DC-Spenders und T-Zell-Klons in zumindest einem Allel. Es wurden verschiedene Reifungsansätze von Monozytenvorläufern – mit oder ohne GM-CSF - mit Protein und mit dem spezifischen CD4-positiven T-Zell-Klon kokultiviert. Die T-Zell-Aktivierung wurde anhand von GM-CSF ermittelt. Dies erscheint kritisch, da es sich um das selbe Zytokin handelt, das vorher zur Reifung eingesetzt wurde. Eine Verschleppung kann allerdings über die Negativkontrolle ausgeschlossen werden (Abb.4.19.B). Der verwendete CD4-positive T-Zell-Klon wurde auf die Sekretion von Zytokinen nach Aktivierung untersucht, und GM-CSF als bester Aktivierungsmarker befunden. Allgemein können aber auch andere Marker wie IL-4 oder auch IFN-γ je nach T-Zell-Typ verwendet werden (Markus et al., 1995). In den T-Zell-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Reifungsansätze die einen größeren Anteil an reifen DC beinhalten, was durch den Effekt des GM-CSF zustande kommt, eine höhere T-Zell-Aktivierung hervorrufen. Dies scheint darauf zurückzuführen zu sein, dass durch GM-CSF die Fähigkeit der DC Protein aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren deutlich zunimmt (Cella et al., 1997; Sallusto et al., 1994). DC reagieren damit vermutlich stärker auf das Zytokin als Monozyten oder Makrophagen. Diese müssen mit einer größeren Menge Protein beladen werden, damit sie die gleiche T-Zell-Aktivierung hervorrufen. Da Reifungsansätze, die nur mit Raji-Zellkulturüberständen inkubiert wurden zum Teil einen ähnlichen Phänotyp zeigten (bezogen auf CD14 und CD83), liegen die Unterschiede bei der T-Zell-Aktivierung wahrscheinlich in der Antigenaufnahme und Prozessierung. Dies könnte in weiteren Versuchen zur Bestimmung der Endozytose- bzw. Phagozytoseaktivität der Zellen durch Inkubation mit FITC-konjugiertem Dextran oder Latex-Beats genauer charakterisiert werden. Ebenfalls Aufschluß geben über die Funktionalität der *in vitro*-gereiften DC, dürfte ein ‚MLR'-Versuch (‚Mixed-Lymphocyte Reaction'), der allerdings nicht so sensitiv und spezifisch ist.

Um die Funktion des GM-CSF nach Gentransfer von B-CLL-Zellen zu evaluieren, könnte desweiteren ein autologer Versuchsansatz gewählt werden, bei dem GM-CSF-Vektor-transduzierte B-CLL-Zellen kokultiviert werden mit peripheren mononukleären Blut-Lymphozyten des Selben Spenders. Zu Erwarten ist eine T-Zell-Aktivierung auf Grund von Präsentation der Tumorantigene und EBV-Antigene über APC. Durch Depletion der CD14 und CD83-positiven Zellen müsste der Effekt verhindert werden können (Wahl et al., eingereicht). Bevor dieser Versuchsansatz

mit Aussicht auf Erfolg praktisch umsetzbar ist, scheint jedoch eine weitere Optimierung der GM-CSF-Sekretion nach Gentransfer notwendig zu sein.

5.4. Hypothese zur Wirkung des GM-CSF im Rahmen von B-CLL-Zell-Vakzinen

Maligne B-Zellen entkommen der Immunantwort dadurch, dass die Präsentation ihrer Tumorantigene unzureichend ist oder sie die für eine effiziente T-Zell-Aktivierung notwendigen Adhäsions- und kostimulatorischen Signale (Chen et al., 1992) nicht liefern können. In dieser Hinsicht verhalten sich die meisten B-Zell-Lymphom-Zellen wie ruhende B-Zellen, denen diese Moleküle ebenfalls fehlen (Ho et al., 1994). Um die Immuntoleranz gegen Tumorantigene (TAA) zu durchbrechen, werden autologe Tumorzellen als Vakzine verwendet, die genetisch derart verändert sind, dass sie therapeutische Zytokine sezernieren (Schultze, 1999).

Das in Abbildung 5.1 gezeigte Modell erläutert schematisch die Vorgänge, die vermutlich *in vivo* zu einer verbesserten Anti-Tumorantwort nach Verabreichung von GM-CSF-modifizierten B-CLL-Zellen führen. Das GM-CSF wird über EBV-Vektoren *ex vivo* in die Tumorzellen eingebracht und von diesen lokal sezerniert. Eine Anti-Tumorantwort wird hauptsächlich durch dendritische Zellen und andere APC induziert, die die Tumorantigene aufnehmen, zu den Lymphknoten wandern und dort den T-Zellen präsentieren. Es ist anzunehmen, dass CD4-und CD8-positive T-Zellen in eine Anti-Tumorantwort involviert sind. Tumorzellen selbst können zwar auch als Antigen-präsentierende Zellen fungieren, müssten jedoch dazu gebracht werden ein starkes TAA und MHCI, MHCII sowie die kostimulatorischen Antigene zu exprimieren. Bei der Präsentation von Tumorantigenen über DC oder andere APC dürfte die ‚Kreuzpräsentation' von TAA eine wichtige Rolle spielen. *In vivo* ist es möglich, dass exogene Antigene (wie z.B. TAA) prozessiert und in einer TAP-abhängigen oder unabhängigen Weise über MHCI präsentiert werden (Harding et al., 1994; Huang et al., 1996; Kovacsovics-Bankowski et al., 1995). Als Folge kommt es zu einer Lyse der Tumorzellen über zytotoxische CD8-positive T-Lymphzyten oder zu einer über MHCII-Moleküle induzierten CD4-abhängigen T-Zellantwort.

Infektionsstudien von B-CLL-Zellen mit EBV haben gezeigt, dass es zum Teil möglich ist, über zytotoxische T-Zellen *in vitro* eine Immunantwort gegen EBV-infizierte Zellen auszulösen (Avila-Carino et al., 1994; Tomita et al., 1998). Damit es nicht zu einer frühzeitigen Eliminierung der GM-CSF-tranduzierten B-CLL-Zellen kommt, sollten deshalb dominante EBV-Antigene auf den Genvektoren fehlen. EBNA1 ist nur sehr schwach immunogen und es ist umstritten, ob überhaupt eine Präsentation stattfindet (Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997). Daher ist nicht anzunehmen, dass zytotoxische T-Zellen in den Patienten vorhanden sind. Die Expression der EBNA3-Gene dürfte durch die Deletion von EBNA2 indirekt weitgehend unterbunden sein. In weiteren EBV-Genvektoransätzen würde man diese aber sicherlich zusätzlich deletieren. Lytische Gene, die einen immunogenen Effekt haben könnten, sind durch die Deletion von BZLF1 vollständig ausgeschaltet. Die Dreifachdeletionsmutante ist folglich in ihrer Immunigenität deutlich eingeschränkt. Wie sich die Situation nach einer Vakzinierung darstellen würde, muss noch genauer evaluiert werden. Da aus Sicherheitsgründen eine Bestrahlung der Zellen vor der Vakzinierung stattfinden würde und die Zellen damit ohnehin abgetötet sind, ist eine EBV-sensitive Immunantwort sicherlich nicht ausschlaggebend für den Therapieerfolg.

5.5. Ausblick: Anwendung der EBV-Genvektoren in der Immun- und Gentherapie?

In dieser Arbeit wurden grundlegende Faktoren bearbeitet, die für die Anwendung einer attenuierten EBV-Lebend-Vakzine in der Gentherapie ausschlaggebend sind. Sie reichen von der Frage des Sicherheitsaspekts, über die der Transgenexpression bis hin zu Transduktionseffizienzen. Mit der Möglichkeit der Ausschaltung sämtlicher onkogenen Eigenschaften des Virus wird das EBV-System zunehmend interessanter und konkurrenzfähig zu anderen viralen Vektorsystemen. Bisher stand die Etablierung und Untersuchung von immortalisierten B-Zelllinien im Vordergrund. Viele EBV-positive Tumore weichen aber im viralen Genexpressionsmuster und den genetischen Abnormalitäten von den *in vitro*-immortalisierten B-Zelllinien ab. Daher scheint es sinnvoll das Virus genetisch derart zu verändern, dass alle pozenziell ‚gefährlichen'

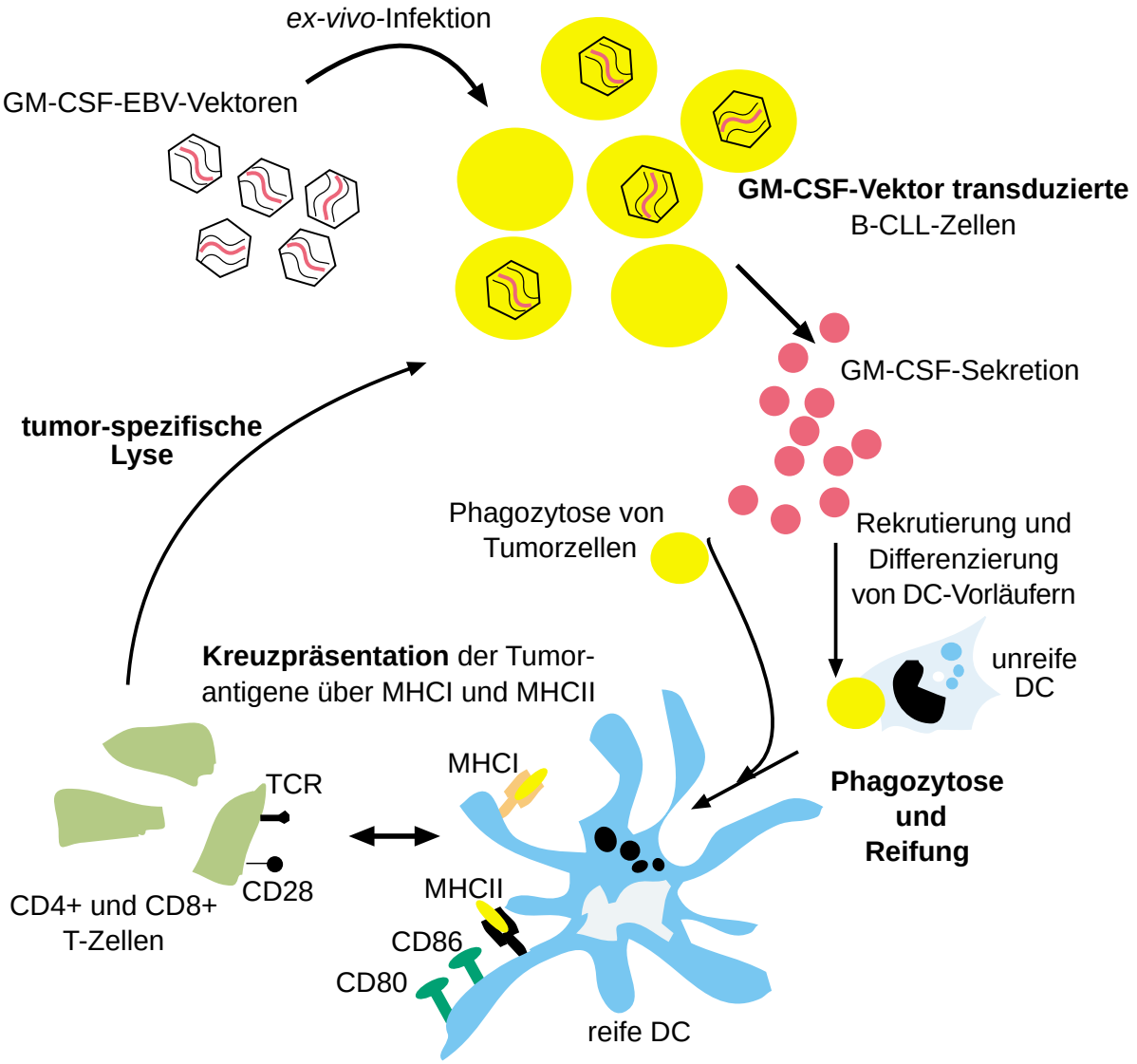


Abb 5.1: Hypothetischer Mechanismus der Induktion einer Antitumorantwort durch GM-CSF-transduzierte B-CLL-Zellen.

GM-CSF-Vekor-transduzierte Tumorzellen sezernieren lokal in hoher Konzentration GM-CSF und rekrutieren auf diese Weise dendritische Vorläuferzellen aus dem Gewebe und Knochenmark. Diese differenzieren zu unreifen dendritischen Zellen, nehmen Antigen auf und reifen durch den Beitrag des Zytokins zu funktionellen Antigen-präsentierenden Zellen. In einem Prozess, der Kreuzpräsentation genannt wird, können Tumorantigene der B-CLL-Zellen über MHCI-Moleküle zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) präsentiert werden (Huang et al., 1996; Huang et al., 1994). Ebenfalls können über den herkömmlichen Weg der Phagozytose CD4-positive T-Zellen aktiviert werden. Diese Präsentation erfolgt in den Lymphknoten und soll schließlich über eine Anti-Tumorantwort zur Tumorregression führen (TCR= T-Zell-Rezeptor).

Eigenschaften berücksichtigt bleiben. Eine vielversprechende Weiterentwicklung ist daher eine Verpackungszelllinie auf der Basis des EBV-Genoms (Delecluse et al., 1999), die die Generierung von infektiösen mutanten EBV-Vektoren erlaubt, die nur einen Vektor mit minimaler EBV-Genausstattung enthalten. Auch hier muss aber wie

bei den Maxi-EBV-Vektoren das onkogene Potenzial in der Verpackungszelllinie minimiert werden.

Die hohe Klonierungskapazität der EBV-abgeleiteten Vektoren, die besondere Eignung für die Transduktion von B-Zellen sowie die hohe Stabilität in infizierten B-Zellen werden diese Genvektoren zukünftig sicherlich für einige Anwendungen qualifizieren.

6. Zusammenfassung

Die Immuntherapie von niedrig malignen Tumoren stellt eine vielversprechende alternative Behandlungsmethode dar. Epstein Barr-Virus (EBV) etabliert eine latente Infektion in der Zielzelle, in der das EBV-Genom extrachromosomal aufrecht erhalten wird. EBV eignet sich mit diesen Eigenschaften hervorragend als Genvektor.

Meine Aufgabenstellung war es, neue EBV-abgeleitete Genvektoren zu entwickeln, die das therapeutische Zytokin GM-CSF in Tumorzellen von B-CLL-Patienten (Chronische lymphatische Leukämie) exprimieren. Dabei entscheidend ist die Eigenschaft von EBV naive, wie auch reife und maligne B-Lymphozyten über den CD21-Rezeptor spezifisch zu infizieren. Als Grundlage diente das Maxi-EBV-System, mit dem das EBV-Genom für genetische Veränderungen zugänglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein sicherer EBV-Basis-Vektor etabliert, der replikations-defizient ist und dem zusätzlich die immortalisierenden Eigenschaften von EBV fehlen. Im selben Zuge wurden verschiedene Expressionskassetten für das Transgen GM-CSF in den EBV-Basis-Vektor eingebracht. Es konnten fünf unterschiedliche GM-CSF-Vektoren etabliert werden, die das Transgen an verschiedenen Genorten innerhalb des Maxi-EBV-Genoms tragen. Zwei dieser GM-CSF-Vektoren erzielten besonders hohe Transduktionseffizienzen und Expressionsraten in der Modellzelllinie Raji (Burkitt-Lymphom-B-Zelllinie). Auch B-CLL-Zellen konnten mit guter Effizienz transduziert werden, die Expression des GM-CSF war aber deutlich schwächer.

Das immunstimulatorische Zytokin GM-CSF führt *in vivo* zu einer verbesserten Immunantwort gegen Tumore. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass GM-CSF-haltige Überstände von Vektor-transduzierten Raji-Zellen eine Reifung von dendritischen Zellen (DC) bewirken, die als wichtige Effektoren bei einer Anti-Tumorantwort gelten. Die Funktion von GM-CSF konnte auch anhand eines Proliferationsversuchs mit einer Zytokin-abhängigen Zelllinie gezeigt werden. Darüber hinaus waren DC nach exogener Antigenbeladung in der Lage, spezifischen CD4-positiven T-Zell-Klonen effizienter ein antigenes Peptid zu präsentieren, wenn die DC in Gegenwart von GM-CSF gereift waren. Damit zeigt das nach Gentransfer sezernierte GM-CSF einen immunstimulatorischen Effekt ähnlich dem von

rekombinantem GM-CSF und kann eine effizientere Antigenpräsentation von Tumorantigenen hervorrufen. Prinzipiell eignen sich B-CLL-Zellen daher als Produzenten von EBV-Genvektor-transduziertem GM-CSF, das zur immunologischen Demaskierung von B-CLL-spezifischen, tumor-assoziierten Antigenen auch *in vivo* führen sollte.

7. Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
ca.	zirka
CD	Oberflächenantigen („cluster of determination')
Ci	Curie
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
Cy3	Indocarbocyanin
CMV	Cytomegalovirus
d	Tag
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
bzw.	beziehungsweise
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluorescin-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor
GRE	grüne Raji Einheiten
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure

HRP	gekoppelte Merrettich-Peroxidase
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie („lymphoblastoid cell line“)
mA	Milliampere
MCS	multiple Klonierungsstelle (‚multi cloning site’)
MHC	Hauptkompartibilitätskomplex (‚major histocompability complex’)
min.	Minute
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
PBL	primäre B-Lymphocyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TEMED	N, N, N‘, N‘-Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
UpM	Umdrehungen (rounds) pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

8. Literatur

Abbot, S. D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., and Rickinson, A. B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus- encoded latent membrane protein. J Virol *64*, 2126-2134.

Aiyar, A., Tyree, C., and Sugden, B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. EMBO J *17*, 6394-6403.

Allday, M. J., Crawford, D. H., and Thomas, J. A. (1993). Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. J Gen Virol *74*, 361-369.

Ardavin, C., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., Anjuere, F., Arias, C. F., Marin, A. R., Ruiz, S., Parrillas, V., and Hernandez, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. Trends Immunol *22*, 691-700.

Avila-Carino, J., Lewin, N., Yamamoto, K., Tomita, Y., Mellstedt, H., Brodin, B., Rosen, A., and Klein, E. (1994). EBV infection of B-CLL cells in vitro potentiates their allostimulatory capacity if accompanied by acquisition of the activated phenotype. Int J Cancer *58*, 678-685.

Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C.*, et al.* (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. Nature *310*, 207-211.

Baichwal, V. R., and Sugden, B. (1988). Latency comes of age for herpesviruses. Cell *52*, 787-789.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol *18*, 767-811.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature *392*, 245-252.

Baum, C., Itoh, K., Meyer, J., Laker, C., Ito, Y., and Ostertag, W. (1997). The potent enhancer activity of the polycythemic strain of spleen focus-forming virus in hematopoietic cells is governed by a binding site for Sp1 in the upstream control region and by a unique enhancer core motif, creating an exclusive target for PEBP/CBF. J Virol *71*, 6323-6331.

Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M., and Bhardwaj, N. (1996). Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. J Immunol Methods *196*, 121-135.

Bramson, J. L., Graham, F. L., and Gauldie, J. (1995). The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo. Curr Opin Biotechnol *6*, 590-595.

Calender, A., Billaud, M., Aubry, J. P., Banchereau, J., Vuillaume, M., and Lenoir, G. M. (1987). Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 8060-8064.

Cantwell, M. J., Sharma, S., Friedmann, T., and Kipps, T. J. (1996). Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood *88*, 4676-4683.

Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. Curr Opin Immunol *9*, 10-16.

Chen, L., Ashe, S., Brady, W. A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Ledbetter, J. A., McGowan, P., and Linsley, P. S. (1992). Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. Cell *71*, 1093-1102.

Cherepanov, P. P., and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene *158*, 9-14.

Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 2172-2175.

Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A *81*, 1991-1995.

Countryman, J., and Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. Proc Natl Acad Sci U S A *82*, 4085-4089.

Crawford, D. H., and Catovsky, D. (1993). In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40. Immunology *80*, 40-44.

de Nully Brown, P., and Hansen, M. M. (1999). GM-CSF treatment in patients with B-chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma *32*, 365-368.

Delecluse, H. J., and Hammerschmidt, W. (2000). The genetic approach to the Epstein-Barr virus: from basic virology to gene therapy. Mol Pathol *53*, 270-279.

Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R., and Hammerschmidt, W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 8245-8250.

Delecluse, H. J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C., and Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 5188-5193.

Dirmeier , N. B., Kilger E., Reisbach G., Sandberg M., Hammerschmidt W. (2003). Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein Barr Virus. Cancer Research *in press*.

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 3539-3543.

Dranoff, G., Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Kolesar, K., Liebster, L., Lam, P., Duda, R., Mentzer, S.*, et al.* (1997). A phase I study of vaccination with autologous, irradiated melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Hum Gene Ther *8*, 111-123.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem *132*, 6-13.

Goldblum, N., Daefler, S., Llana, T., Ablashi, D., Josephs, S., and Salahuddin, Z. (1990). Susceptibility to HIV-1 infection of a human B-lymphoblastoid cell line, DG75, transfected with subgenomic DNA fragments of Epstein-Barr virus. Dev Biol Stand *72*, 309-313.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol *36*, 59-74.

Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. Cell *55*, 427-433.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol *166*, 557-580.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning. A practical approach, D. e. In Glover, ed. (Oxford), pp. 109-135.

Harding, C. V., and Song, R. (1994). Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. J Immunol *153*, 4925-4933.

Hartmann, G., and Krieg, A. M. (1999). CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. Gene Ther *6*, 893-903.

Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A. (1991). Induction of bcl-2 expression by Epstein-

Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. Cell *65*, 1107-1115.

Hildinger, M., Abel, K. L., Ostertag, W., and Baum, C. (1999). Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. J Virol *73*, 4083-4089.

Ho, W. Y., Cooke, M. P., Goodnow, C. C., and Davis, M. M. (1994). Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. J Exp Med *179*, 1539-1549.

Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem *114*, 193-197.

Huang, A. Y., Bruce, A. T., Pardoll, D. M., and Levitsky, H. I. (1996). In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. Immunity *4*, 349-355.

Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. Science *264*, 961-965.

Itala, M., Pelliniemi, T. T., Remes, K., Vanhatalo, S., and Vainio, O. (1998). Long-term treatment with GM-CSF in patients with chronic lymphocytic leukemia and recurrent neutropenic infections. Leuk Lymphoma *32*, 165-174.

Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W., and Delecluse, H. J. (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. J Virol *74*, 10142-10152.

Jayachandra, S., Low, K. G., Thlick, A. E., Yu, J., Ling, P. D., Chang, Y., and Moore, P. S. (1999). Three unrelated viral transforming proteins (vIRF, EBNA2, and E1A) induce the MYC oncogene through the interferon-responsive PRF element by using different transcription coadaptors. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 11566-11571.

Jin, X. W., and Speck, S. H. (1992). Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein- Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter. J Virol *66*, 2846-2852.

Jochner, N., Eick, D., Zimber-Strobl, U., Pawlita, M., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. EMBO J *15*, 375-382.

Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. J Virol *73*, 4481-4484.

Karande, A., Fialkow, P. J., Nilsson, K., Povey, S., Klein, G., Najfeld, V., and Penfold, G. (1980). Establishment of a lymphoid cell line from leukemic cells of a patient with chronic lymphocytic leukemia. Int J Cancer *26*, 551-556.

Karasuyama, H., Kudo, A., and Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. J Exp Med *172*, 969-972.

Kay, M. A., Glorioso, J. C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nat Med *7*, 33-40.

Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., Tai, S. J., Herzog, R. W.*, et al.* (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. Nat Genet *24*, 257-261.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 9150-9154.

Kieff, E., and Rickinson, A. B. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. In Field's Virology, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Straus, eds. (Philadelphia, Lippincott - Williams & Wilkins), pp. 2511-2573.

Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. EMBO J *17*, 1700-1709.

Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y. F., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1989). Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. J Cell Physiol *140*, 323-334.

Klausner, R. D., Donaldson, J. G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. J Cell Biol *116*, 1071-1080.

Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K. L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. Science *267*, 243-246.

Kulwichit, W., Edwards, R. H., Davenport, E. M., Baskar, J. F., Godfrey, V., and Raab-Traub, N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 11963-11968.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Laytragoon-Lewin, N., Chen, F., Avila-Carino, J., Zou, J. Z., Mellstedt, H., Ernberg, I., and Klein, G. (1995). Epstein Barr virus (EBV)-carrying cells of a chronic lymphocytic leukemia (CLL) subpopulation express EBNA1 and LMPs but not EBNA2 in vivo. Int J Cancer *63*, 486-490.

Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., and Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. Nature *375*, 685-688.

Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 12616-12621.

Levitsky, H. I., Montgomery, J., Ahmadzadeh, M., Staveley-O'Carroll, K., Guarnieri, F., Longo, D. L., and Kwak, L. W. (1996). Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idiotype-specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity. J Immunol *156*, 3858-3865.

Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R. D. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. Cell *67*, 601-616.

Maeda, A., Bandobashi, K., Nagy, N., Teramoto, N., Gogolak, P., Pokrovskaja, K., Szekely, L., Bjorkholm, M., Klein, G., and Klein, E. (2001). Epstein-barr virus can infect B-chronic lymphocytic leukemia cells but it does not orchestrate the cell cycle regulatory proteins. J Hum Virol *4*, 227-237.

Mahvi, D. M., Burkholder, J. K., Turner, J., Culp, J., Malter, J. S., Sondel, P. M., and Yang, N. S. (1996). Particle-mediated gene transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cDNA to tumor cells: implications for a clinically relevant tumor vaccine. Hum Gene Ther *7*, 1535-1543.

Mahvi, D. M., Shi, F. S., Yang, N. S., Weber, S., Hank, J., Albertini, M., Schiller, J., Schalch, H., Larson, M., Pharo, L.*, et al.* (2002). Immunization by particle-mediated transfer of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene into autologous tumor cells in melanoma or sarcoma patients: report of a phase I/IB study. Hum Gene Ther *13*, 1711-1721.

Mahvi, D. M., Sondel, P. M., Yang, N. S., Albertini, M. R., Schiller, J. H., Hank, J., Heiner, J., Gan, J., Swain, W., and Logrono, R. (1997). Phase I/IB study of immunization with autologous tumor cells transfected with the GM-CSF gene by particle-mediated transfer in patients with melanoma or sarcoma. Hum Gene Ther *8*, 875-891.

Markus, N. R., Rosenberg, S. A., and Topalian, S. L. (1995). Analysis of cytokine secretion by melanoma-specific CD4+ T lymphocytes. J Interferon Cytokine Res *15*, 739-746.

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

Mocellin, S., Panelli, M. C., Wang, E., Nagorsen, D., and Marincola, F. M. (2003). The dual role of IL-10. Trends Immunol *24*, 36-43.

Monahan, P. E., and Samulski, R. J. (2000). AAV vectors: is clinical success on the horizon? Gene Ther *7*, 24-30.

Muyrers, J. P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Ansorge, W., and Stewart, A. F. (2000). Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. EMBO Rep *1*, 239-243.

Neuhierl, B., Feederle, R., and Delecluse, H. J. (2002). Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr Virus determins viral tropism and efficiency of infection. Proc Natl Acad Sci U S A.

Nijman, H. W., Kleijmeer, M. J., Ossevoort, M. A., Oorschot, V. M., Vierboom, M. P., van de Keur, M., Kenemans, P., Kast, W. M., Geuze, H. J., and Melief, C. J. (1995). Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. J Exp Med *182*, 163-174.

Nimmerjahn F., M. S., Behrends U., Jaffee EM., Pardoll D., Bornkamm G., Mautner J. (2003). Major Histocompatibility Complex Class-II restricted Presentation of a Cytosolic Antigen by Autophagy. submitted.

Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., and Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. Nature *388*, 787-792.

Pulvertaft (1964). Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). Lancet *i*, 238-240.

Ragoczy, T., Heston, L., and Miller, G. (1998). The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. J Virol *72*, 7978-7984.

Reis e Sousa, C., Stahl, P. D., and Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. J Exp Med *178*, 509-519.

Rezvany, M. R., Jeddi-Tehrani, M., Biberfeld, P., Soderlund, J., Mellstedt, H., Osterborg, A., and Rabbani, H. (2001). Dendritic cells in patients with non-progressive B-chronic lymphocytic leukaemia have a normal functional capability but abnormal cytokine pattern. Br J Haematol *115*, 263-271.

Rickinson, A. B., Finerty, S., and Epstein, M. A. (1982). Interaction of Epstein-Barr virus with leukaemic B cells in vitro. I. Abortive infection and rare cell line establishment from chronic lymphocytic leukaemic cells. Clin Exp Immunol *50*, 347-354.

Roberge, C. J., McColl, S. R., Larochelle, B., and Gosselin, J. (1998). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances EBV-induced synthesis of chemotactic factors in human neutrophils. J Immunol *160*, 2442-2448.

Robertson, E. S., Ooka, T., and Kieff, E. D. (1996). Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 11334-11340.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. J Exp Med *180*, 83-93.

Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., and Schuler, G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. J Immunol Methods *196*, 137-151.

Rosengart, T. K., Lee, L. Y., Patel, S. R., Sanborn, T. A., Parikh, M., Bergman, G. W., Hachamovitch, R., Szulc, M., Kligfield, P. D., Okin, P. M.*, et al.* (1999). Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. Circulation *100*, 468-474.

Russo, F., Guadagni, S., Mattera, G., Esposito, G., and Abate, G. (1999). Combination of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) anf erythropoietin (EPO) for the treatment of advanced non-responsive chronic lymphocytic leukemia. Eur J Haematol *63*, 325-331.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J Exp Med *182*, 389-400.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med *179*, 1109-1118.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H., and et al. (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. Cell *61*, 361-370.

Schepers, A., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1996). Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. Virology *220*, 367-376.

Schultze, J. L. (1999). Why do B cell lymphoma fail to elicit clinically sufficient T cell immune responses? Leuk Lymphoma *32*, 223-236.

Sheng, Y., Mancino, V., and Birren, B. (1995). Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. Nucleic Acids Res *23*, 1990-1996.

Silins, S. L., and Sculley, T. B. (1994). Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA- 4. Virology *202*, 16-24.

Simons, J. W., Jaffee, E. M., Weber, C. E., Levitsky, H. I., Nelson, W. G., Carducci, M. A., Lazenby, A. J., Cohen, L. K., Finn, C. C., Clift, S. M.*, et al.* (1997). Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. Cancer Res *57*, 1537-1546.

Soderberg, O., Thunberg, U., Weigelt, C., Christiansen, I., Totterman, T. H., Carlsson, M., Sallstrom, J., and Nilsson, K. (1999). Staphylococcus aureus Cowan strain 1 activation of B-chronic lymphocytic leukaemia cells augments the response to CD40 stimulation. Scand J Immunol *50*, 363-370.

Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S.*, et al.* (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 13141-13146.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol *98*, 503-517.

Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol *9*, 271-296.

Steinman, R. M., and Young, J. W. (1991). Signals arising from antigen-presenting cells. Curr Opin Immunol *3*, 361-372.

Strehl, J., Selmayr, M., Kremer, J. P., Hultner, L., Lindhofer, H., and Mocikat, R. (1999). Gene therapy of B-cell lymphoma with cytokine gene-modified trioma cells. Int J Cancer *83*, 113-120.

Sung, N. S., Kenney, S., Gutsch, D., and Pagano, J. S. (1991). EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. J Virol *65*, 2164-2169.

Svensson, M., Stockinger, B., and Wick, M. J. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. J Immunol *158*, 4229-4236.

Takada, K., Horinouchi, K., Ono, Y., Aya, T., Osato, T., Takahashi, M., and Hayasaka, S. (1991). An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. Virus Genes *5*, 147-156.

Teramoto, N., Gogolak, P., Nagy, N., Maeda, A., Kvarnung, K., Bjorkholm, T., and Klein, E. (2000). Epstein-Barr virus-infected B-chronic lymphocyte leukemia

cells express the virally encoded nuclear proteins but they do not enter the cell cycle. J Hum Virol *3*, 125-136.

Tomita, Y., Avila-Carino, J., Yamamoto, K., Mellstedt, H., and Klein, E. (1998). Recognition of B-CLL cells experimentally infected with EBV by autologous T lymphocytes. Immunol Lett *60*, 73-79.

Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993a). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. J Virol *67*, 2014-2025.

Tomkinson, B., Robertson, E., Yalamanchili, R., Longnecker, R., and Kieff, E. (1993b). Epstein-Barr virus recombinants from overlapping cosmid fragments. J Virol *67*, 7298-7306.

Verma, I. M., and Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. Nature *389*, 239-242.

Wagner, J. A., Messner, A. H., Moran, M. L., Daifuku, R., Kouyama, K., Desch, J. K., Manley, S., Norbash, A. M., Conrad, C. K., Friborg, S.*, et al.* (1999). Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. Laryngoscope *109*, 266-274.

Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. Cell *43*, 831-840.

Wang, D., Liebowitz, D., Wang, F., Gregory, C., Rickinson, A., Larson, R., Springer, T., and Kieff, E. (1988). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B- lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. J Virol *62*, 4173-4184.

Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. J Virol *64*, 2309-2318.

Wendel-Hansen, V., Sallstrom, J., De Campos-Lima, P. O., Kjellstrom, G., Sandlund, A., Siegbahn, A., Carlsson, M., Nilsson, K., and Rosen, A. (1994). Epstein-Barr virus (EBV) can immortalize B-cll cells activated by cytokines. Leukemia *8*, 476-484.

Wendtner, C. M., Kofler, D. M., Theiss, H. D., Kurzeder, C., Buhmann, R., Schweighofer, C., Perabo, L., Danhauser-Riedl, S., Baumert, J., Hiddemann, W.*, et al.* (2002). Efficient gene transfer of CD40 ligand into primary B-CLL cells using recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. Blood *100*, 1655-1661.

Wendtner, C. M., Kurzeder, C., Theiss, H. D., Kofler, D. M., Baumert, J., Delecluse, H. J., Janz, A., Hammerschmidt, W., and Hallek, M. (2003). High level of transgene expression in primary chronic lymphocytic leukemia cells using helper-virus-free recombinant Epstein-Barr virus vectors. Exp Hematol *31*, 99-108.

Wilson, J. B., Bell, J. L., and Levine, A. J. (1996). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. EMBO J *15*, 3117-3126.

Wilson, J. B., Weinberg, W., Johnson, R., Yuspa, S., and Levine, A. J. (1990). Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. Cell *61*, 1315-1327.

Woisetschlaeger, M., Jin, X. W., Yandava, C. N., Furmanski, L. A., Strominger, J. L., and Speck, S. H. (1991). Role for the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 in viral promoter switching during initial stages of infection. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 3942-3946.

Woisetschlaeger, M., Yandava, C. N., Furmanski, L. A., Strominger, J. L., and Speck, S. H. (1990). Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 1725-1729.

Wood, S. A., Park, J. E., and Brown, W. J. (1991). Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. Cell *67*, 591-600.

Wu, H., Ceccarelli, D. F., and Frappier, L. (2000). The DNA segregation mechanism of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. EMBO Rep *1*, 140-144.

Yates, J. L., Warren, N., and Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature *313*, 812-815.

Yoo, L. I., Mooney, M., Puglielli, M. T., and Speck, S. H. (1997). B-cell lines immortalized with an Epstein-Barr virus mutant lacking the Cp EBNA2 enhancer are biased toward utilization of the oriP-proximal EBNA gene promoter Wp1. J Virol *71*, 9134-9142.

Zimber-Strobl, U., Suentzenich, K. O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G. M., and Bornkamm, G. W. (1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. J Virol *65*, 415-423.

Entwicklung von GM-CSF-produzierenden EBV-Vektoren für die Immuntherapie der B-CLL

Anhang

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Eva Hellebrand

2003

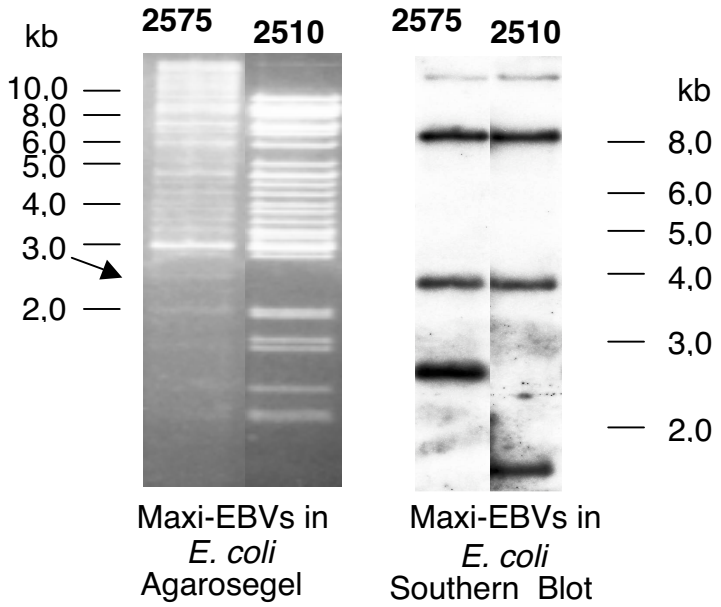
Anhang

Abb.A-F: Überprüfung und Identitätskontrolle der EBV-Zwei-und Dreifachmutanten p2510 und p2575 und der fünf davon abgeleiteten GM-CSF-EBV-Vektoren

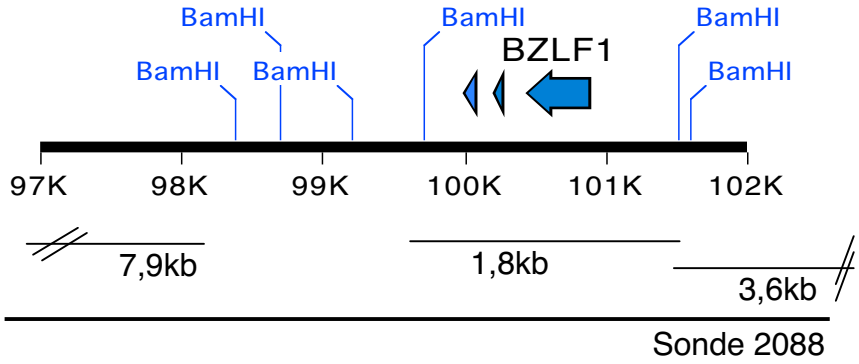
Dargestellt sind die Ergebnisse der zwei wichtigsten Prozessschritte zur Herstellung von mutanten EBV-Vektoren. Zum einen wurde die Integrität der maxi-EBV DNA nach homologer Rekombination in *E. coli* überprüft, zum anderen deren genetische Identität nach stabiler Selektion der EBV-Vektoren in HEK293-Zellen. Beide Prozessschritte wurden bei der Herstellung aller GM-CSF-Vektoren und der Ausgangskonstrukte überprüft. Die Überprüfung erfolgte anhand von Restriktionsfragment-Mustern des Maxi-EBV Plasmids und Southernblot-Hybridisierungen mit einer dem GM-CSF hoch spezifischen radioaktiven Sonde. Dies wurde mit Plasmidpräparationen aus *E. coli* und gesamtzellulärer DNA aus HEK293-Zellen durchgeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden jeweils nur Ausschnitte des Southernblots gezeigt, was bedeutet, dass die maxi-EBV Ausgangsprodukte p2510 oder p2575 direkt neben die jeweilige GM-CSF-Mutante gestellt wurde. Bei der Überprüfung der Identität der 293-Klone wurde geschnittene *E. coli* DNA mit gesamtzellulärer DNA der selben Mutante aus 293HEK-Zellen verglichen.

Alle Restriktionen erfolgten mit dem Enzym *BamHI.* Für die Verdaus wurden 1 μg CsCl-gereinigte Plasmid-DNA aus E.coli bzw. 10 μg gesamtzelluläre DNA aus 293-Zellen eingesetzt. Die auftretenden Restriktions-Banden wurden mit dem Bandenmuster der Ausgangsmutante (Zwei- oder Dreifachmutante, p2510 oder p2575) verglichen. Unterschiedliche Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Zusätzlich wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die auftretenden Fragmente im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel bzw. Autoradiogramm des Southernblots sind jeweils in einer Schemazeichnung dargestellt. In allen untersuchten Prozessstadien konnte die Identität der Klone bestätigt werden. Die Testung der HEK293-Klone der p2965-Mutante steht noch aus.

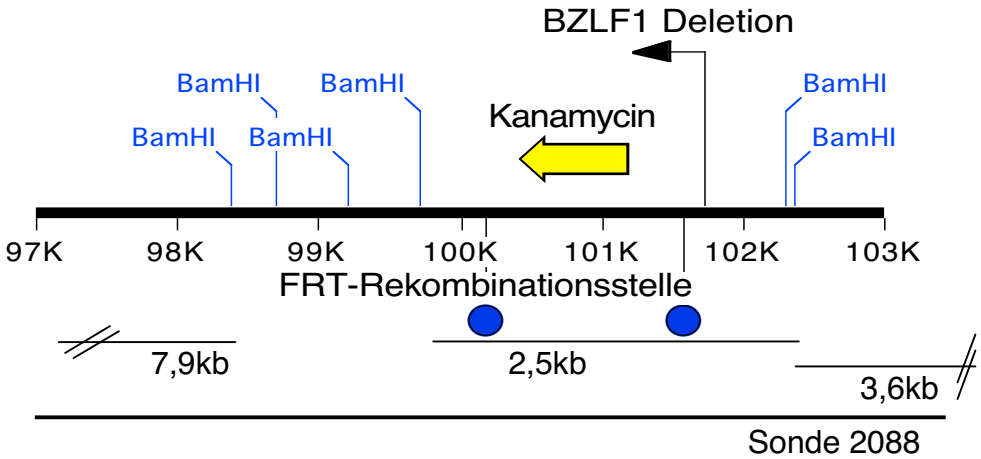
A

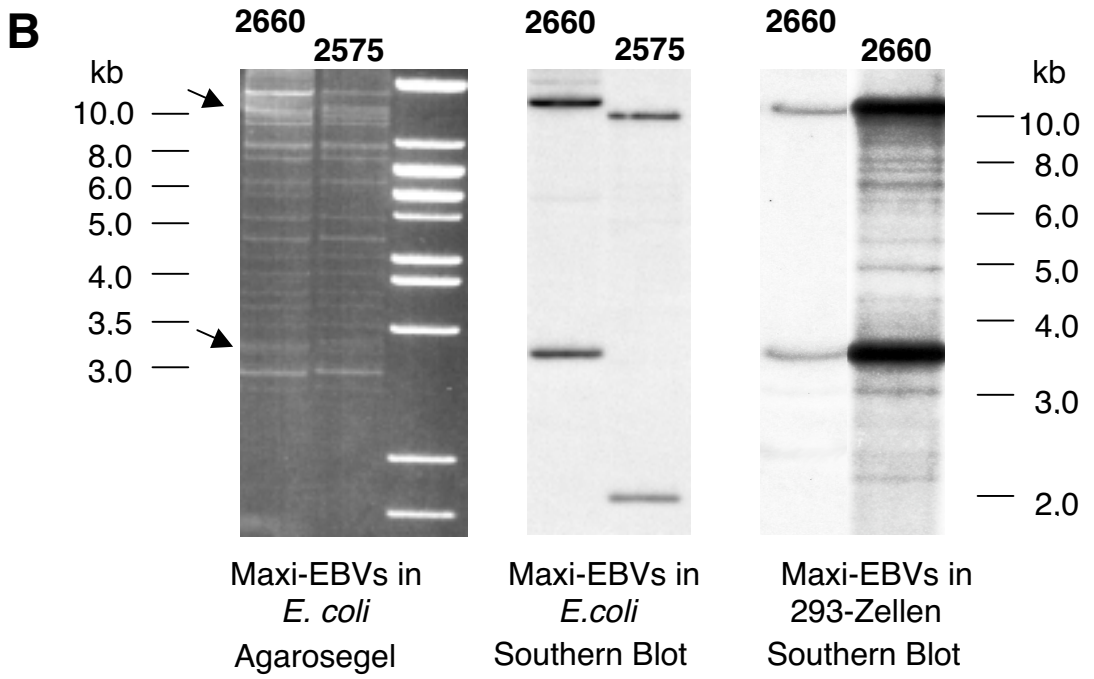


2510 Doppelmutante:

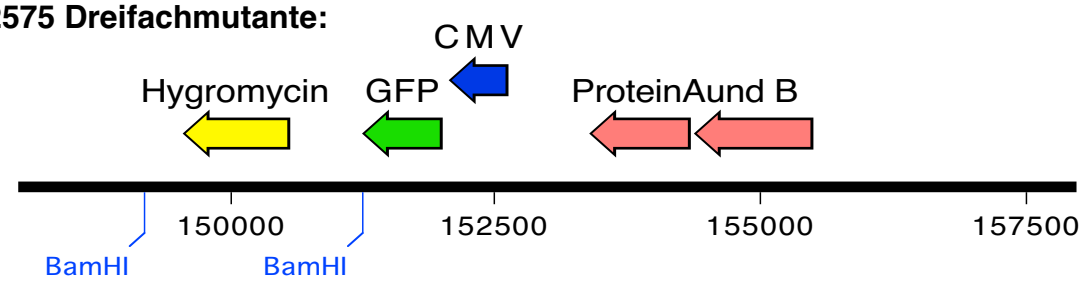


2575 Dreifachmutante mit Kanamycin:

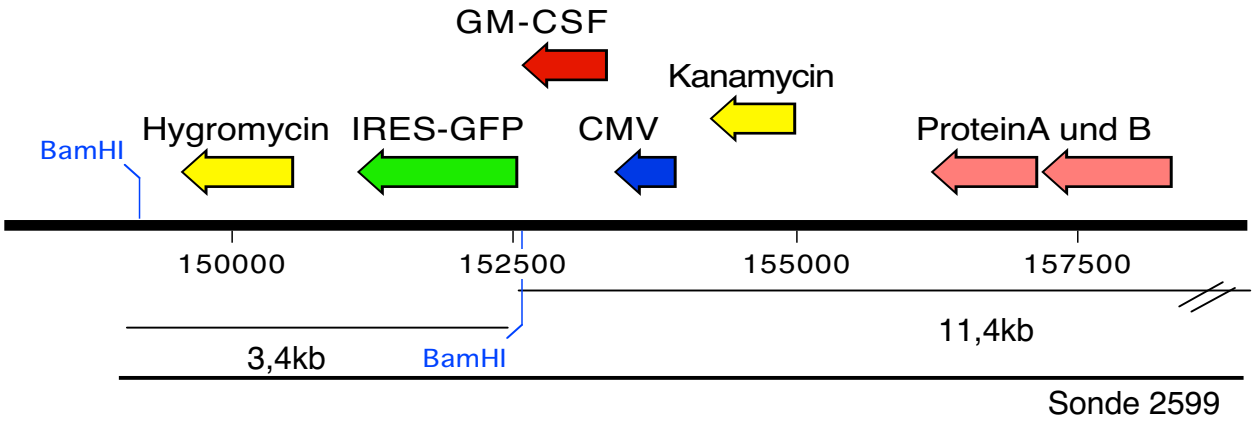




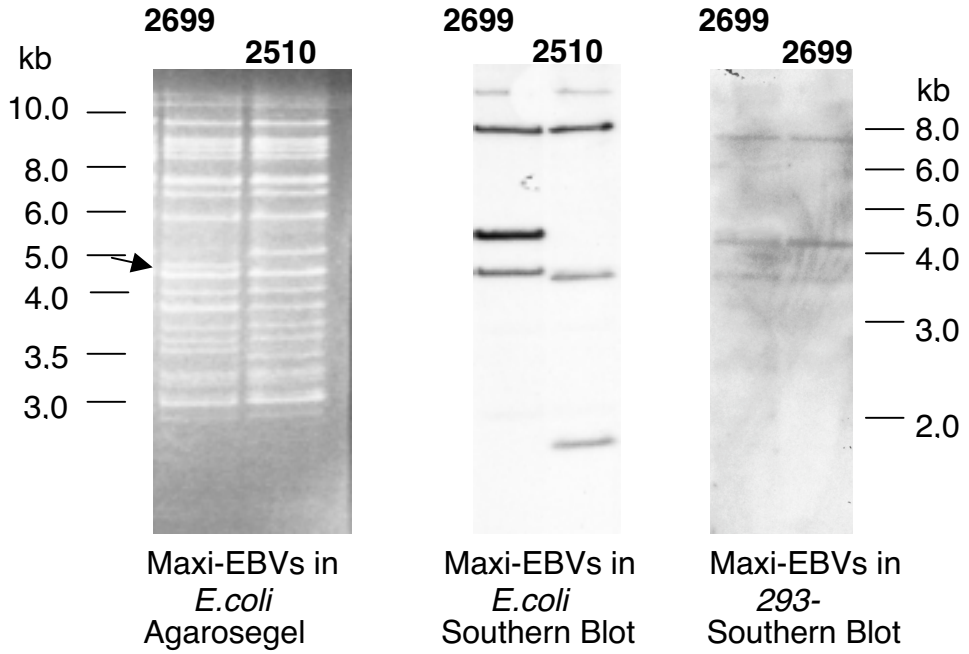
2575 Dreifachmutante:



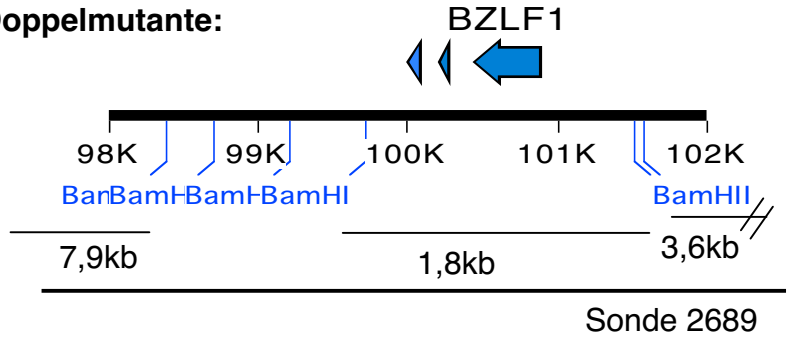
2660 GM-CSF-IRES-GFP-Vektor:



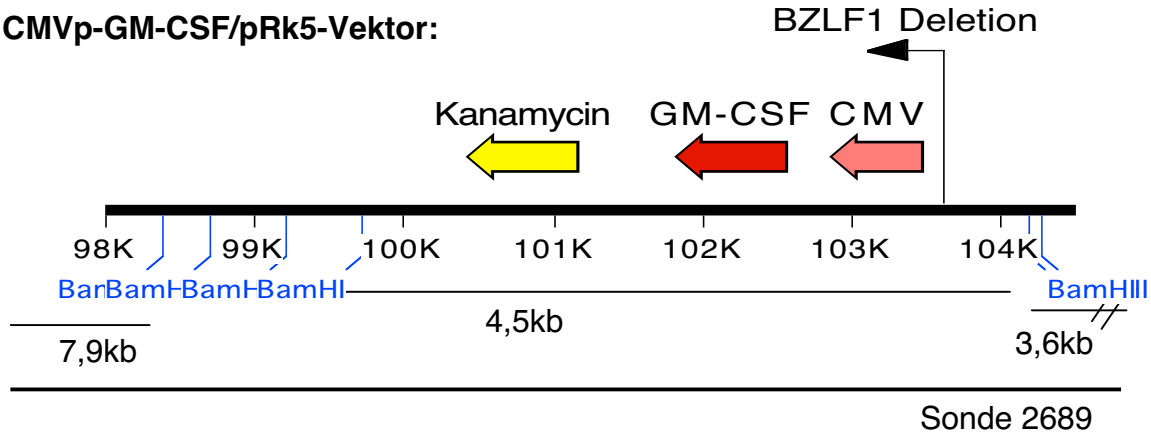
C



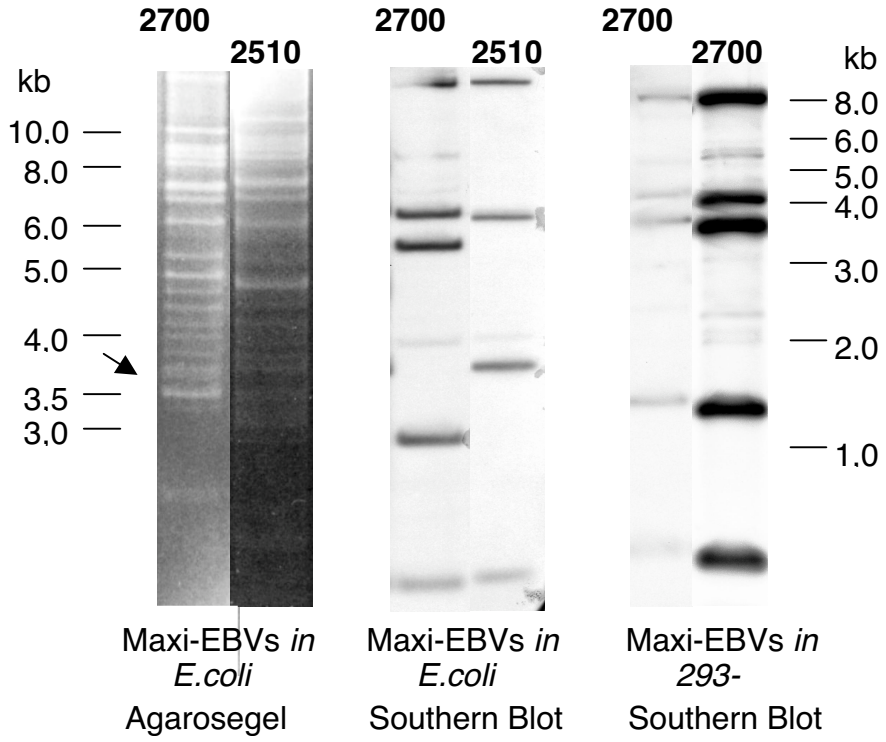
2510 Doppelmutante:



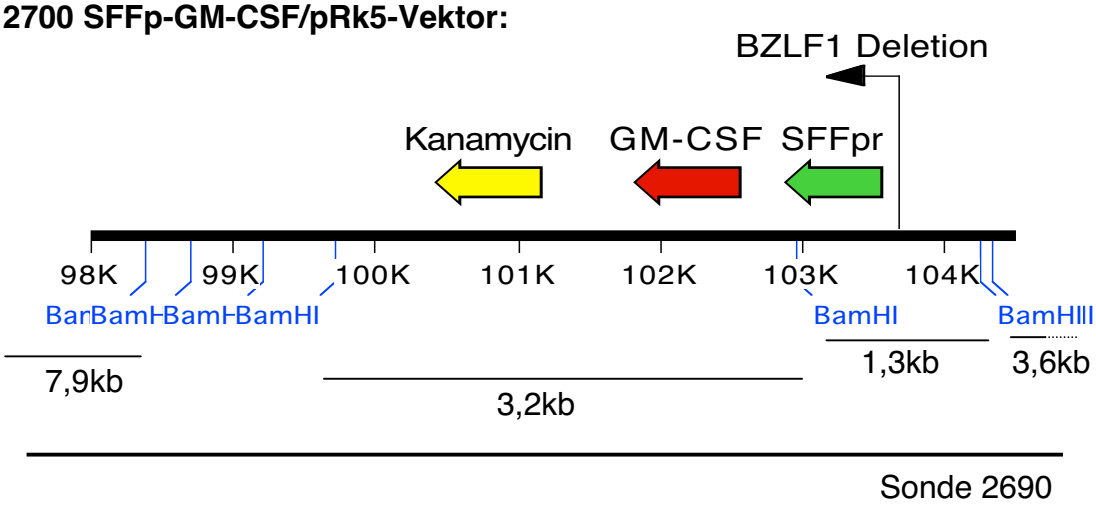
2699 CMVp-GM-CSF/pRk5-Vektor:

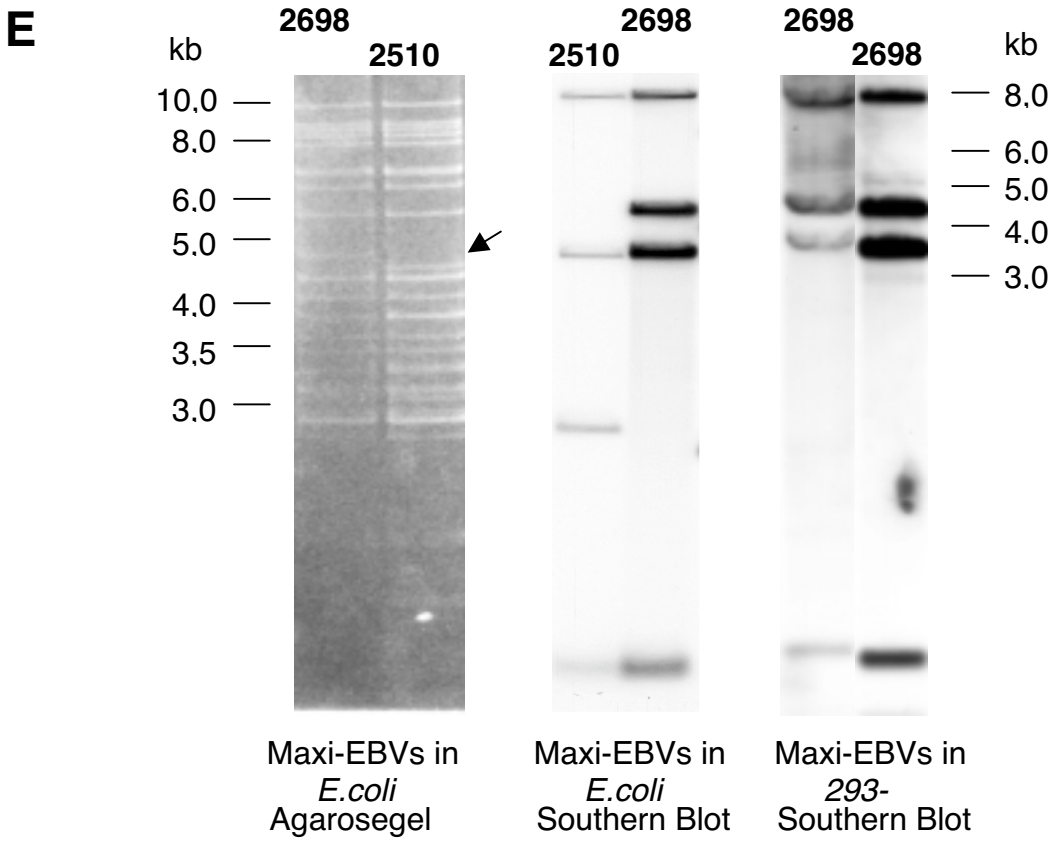


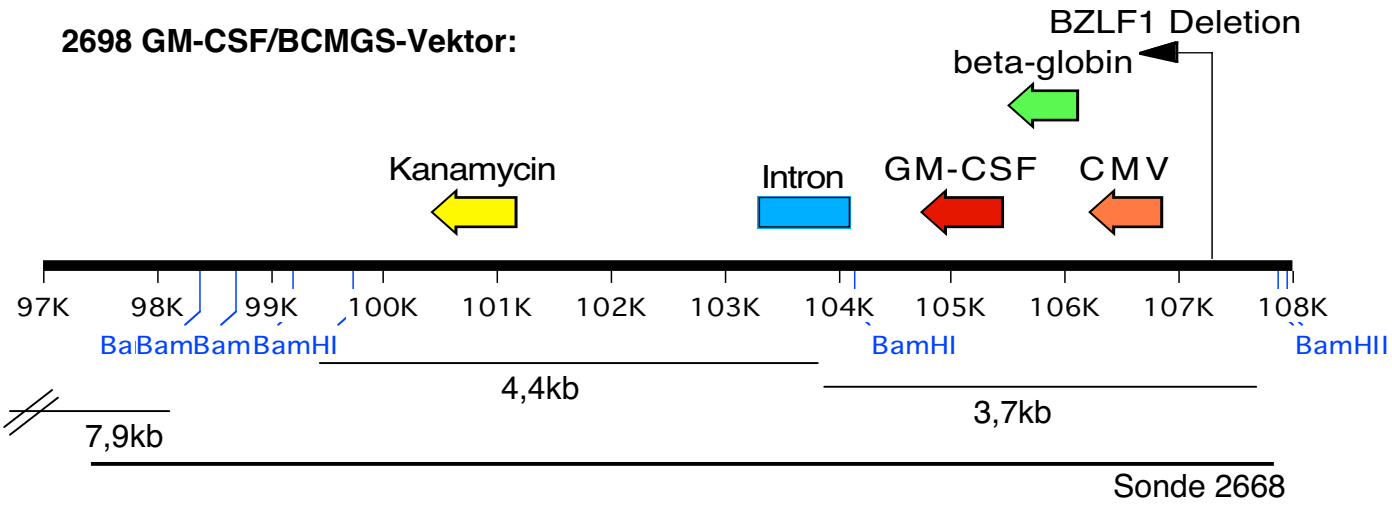
D



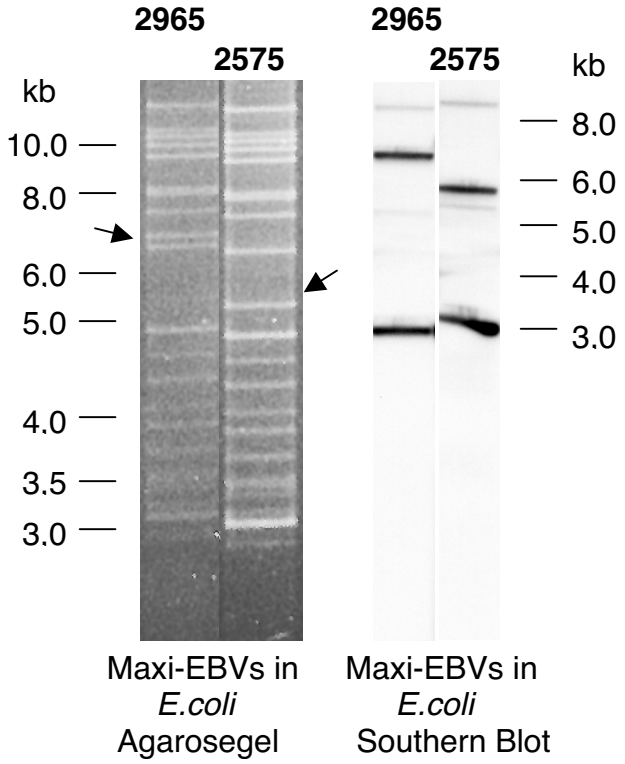
2700 SFFp-GM-CSF/pRk5-Vektor:



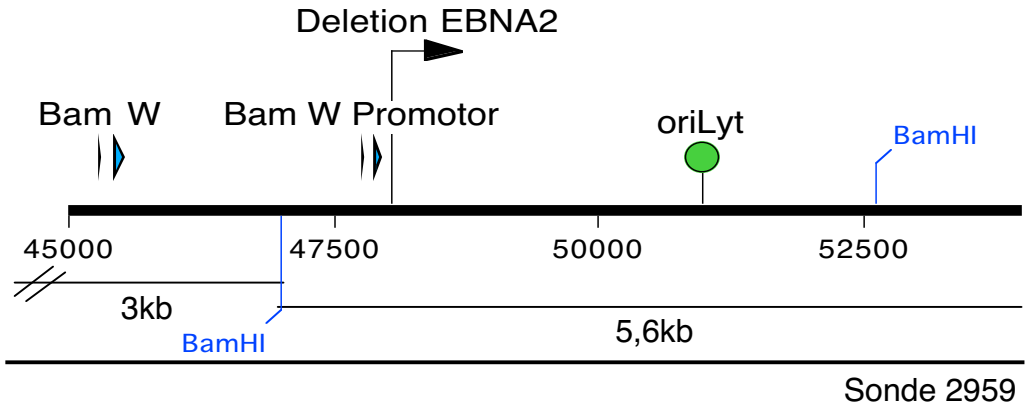

E
kb
2698
2510
10,0
8.0
6.0
5.0
4.0
3,5
3.0
2510
2698
2698
2698
kb
8,0
6.0
5.0
4.0
3.0
Maxi-EBVs in E.coli Agarosegel
Maxi-EBVs in E.coli Southern Blot
Maxi-EBVs in 293- Southern Blot


2698 GM-CSF/BCMGS-Vektor:
BZLF1 Deletion
beta-globin
Kanamycin
Intron
GM-CSF
CMV
97K
98K
99K
100K
101K
102K
103K
104K
105K
106K
107K
108K
BamHI
BamHI
4,4kb
3,7kb
7,9kb
Sonde 2668

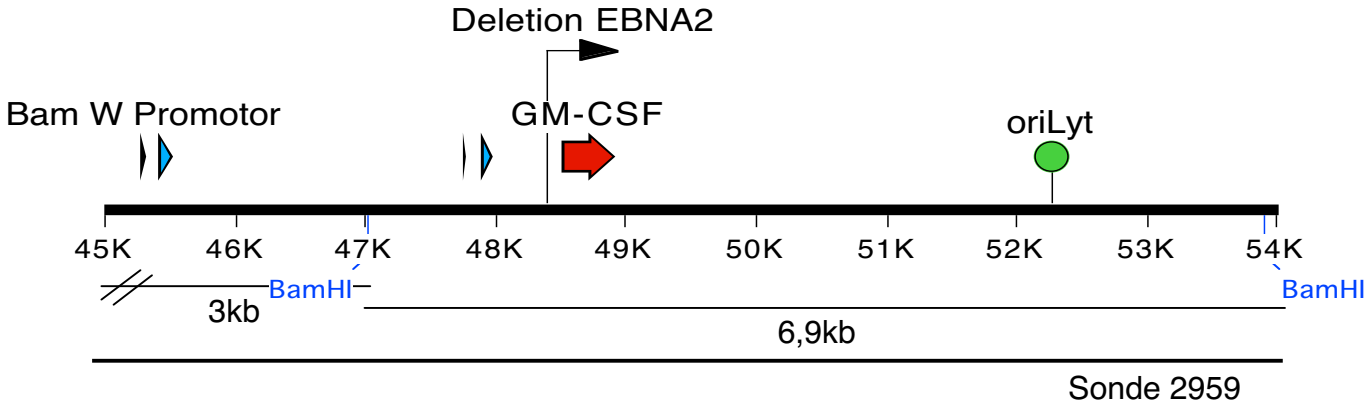
F



2575 Dreifachmutante:



2965 EBNA2p-GM-CSF-Vektor:



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Eva Hellebrand
Geburtsdatum	06.02.1974
Geburtsort	München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulischer Werdegang

1980 – 1984	Grundschule Karlsfeld an der Kremoosstraße
1984 – 1993	Josef-Effner-Gymnasium Dachau
Juni 1993	Abitur

Studium

1993 – 1998	Studium der Humanbiologie, Phillips-Universität Marburg
August 1997	Diplomprüfung im Studium der Humanbiologie
Okt.1997 – Okt.1998	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Hygiene (Virologie), Marburg bei PD Dr. Heinz Feldmann
Feb.1999 – Nov.1999	Promotion am Pettenkofer-Institut München bei PD Dr. Hartmut Hengel
Jan.2000 – April 2003	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt, Abteilung Genvektoren in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ralph Mocikat, Institut für Immunologie an der GSF, München.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die hervorragende Betreuung, den wissenschaftlichen Rat und die unerschöpfliche Hilfsbereitschaft in sämtlichen Fragestellungen und dafür, dass immer „eine Runde Jammern“ möglich war,

PD. Dr. Ralph Mocikat für die kompetente Unterstützung in immunologischen Fragen und das schnelle Korrekturlesen, sowie allen Leuten aus der IMI, die mir sonst noch mit Rat und Tat beiseite standen,

Prof. Dr. Dirk Eick dafür, dass er die Pflichten des offiziellen Betreuers übernommen hat,

Dr. Josef Mautner sowie dem gesamten Mautner'schen Labor für die Bereitstellung der T-Zell-Klone, die tolle Hilfe in immunologischen Fragen und (Dr.) Falk Nimmerjahn besonders für die Einführung in die Geheimnisse der DC,

Dr. Bernhard Neuhierl, unserem „Genetikbay-Königstiger“ in spe, der meinen Computer mehrmals rettete und dem immer eine Lösungsmöglichkeit zu allen Laborproblemen einfiel,

Dr. Gilbert Reisbach für seine verdienstvollen Aufgaben beim Blutabnehmen und seine Unterstützung in FACS-Fragen, sowie Elisabeth Spitzer beim MTT-Assay,

meinen hilfsbereiten (Ex-)Doktorandenkollegen (Dr.) Markus, (Dr.) Uli, (Dr.) Ute, Sibille und meiner „Nachbarin“ Madelaine ohne die die Arbeit im Labor bei weitem nicht so viel Spaß gemacht hätte und vor allem den tapferen Blutspendern Sibille, Markus etc.....

dem „Vaecgene“-Labor, vor allem (Dr.) Annette, Eva, Andreas, Reinhard und allen anderen, die dem „Gentherapie-Exoten“ aus der Genetik-Bay immer Asyl gegeben haben,

den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Genvektoren für die gute Zusammenarbeit, praktische Unterstützung und wissenschaftliche Diskussion und allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts, die zum guten Arbeitsklima beigetragen haben,

Dr. Christine Mayr und Dagmar Bund der Arbeitsgruppe Hallek sowie der HNO-Abteilung im Klinikum Grosshadern für die Bereitstellung von CLL-Material,

und Matthias fürs Korrekturlesen, seine unendliche Geduld und motivierende Unterstützung.