

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann**

Gentransfer in primäre B-CLL-Zellen mittels EBV abgeleiteter Genvektoren

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Christian Kurzeder

aus
Rosenheim

2004

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Hallek
Mitberichterstatter: Prof. Dr. U. Koszinowski
Prof. Dr. H.-G. Klobeck
Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. C.-M. Wendtner
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2004

*Für meine Frau Dominique, meinen Sohn Maximilian und meine Tochter
Lea-Sarah*

Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne Verwendung von Hilfsmittel, außer den angegebenen angefertigt. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden sind als solche kenntlich gemacht.

Die hier vorgelegte Dissertation wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, 17.02.2004

Christian Kurzeder

Inhalte dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

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

Buhmann R, Kurzeder C, Rehklau J, Westhaus D, Bursch S, Hiddemann W, Haferlach T, Hallek M, Schoch C. (2002) CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 118, 968-975.

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

Wendtner CM, Kurzeder C, Theiss HD, Kofler DM, Baumert J, Delecluse HJ, Janz A, Hammerschmidt W, Hallek M. (2003) High Level of Transgene Expression in Primary CLL Cells Using Helpervirus-free Recombinant Epstein-Barr Virus (EBV) Vectors. *Experimental Hematology*, 31, 99–108.

Teile dieser Arbeit wurden präsentiert:

Kurzeder C, Delecluse HJ, Buhmann R, Hammerschmidt W, Hallek M, Wendtner CM. Efficient Gene Transfer into Primary B-CLL Cells by Helpervirus Free Recombinant Epstein-Barr Virus Vectors, 2000 Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco

| | |
|--|-----------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Chronische lymphatische Leukämie (CLL) | 1 |
| 1.1.1 Diagnose..... | 1 |
| 1.1.2 Epidemiologie | 2 |
| 1.1.3 Ätiologie..... | 2 |
| 1.1.4 Immunologie | 2 |
| 1.1.5 Verlauf..... | 3 |
| 1.1.6 Therapie..... | 4 |
| 1.2 Die Rolle von CD40-Ligand für die Regulation von humoralen und zellulären Immunreaktionen | 7 |
| 1.3 Immuntherapie der chronischen lymphatischen Leukämie | 11 |
| 1.3.1 Die Rolle von CD154 (CD40-L) in der Pathogenese der chronischen lymphatischen Leukämie..... | 11 |
| 1.3.2 Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen | 12 |
| 1.3.3 Therapeutischer Gentransfer von CD40-Ligand in B-CLL-Zellen | 16 |
| 1.4 Epstein-Barr-Virus | 19 |
| 1.4.1 Epidemiologie und Biologie..... | 19 |
| 1.4.2 Virale Genvektoren auf der Basis von EBV..... | 19 |
| 2 ZIELE DER ARBEIT | 21 |
| 3 MATERIAL | 22 |
| 3.1 Zelllinien | 22 |
| 3.2 Patientenproben | 23 |
| 3.3 Plasmide | 24 |
| 3.4 Antikörper | 25 |
| 3.5 Bakterienstämme | 26 |
| 3.6 Enzyme | 26 |
| 3.7 Chemikalien, andere Materialien, Standards und Kits | 26 |
| 3.8 Durchflußzytometer | 26 |
| 3.9 Weitere Geräte | 26 |
| 4 METHODEN | 27 |
| 4.1 Kultivierung von Mikroorganismen (Bakterien) | 27 |
| 4.1.1 Plattenkultur | 27 |
| 4.1.2 Flüssigkultur..... | 27 |
| 4.2 DNA Arbeitstechniken | 28 |
| 4.3 Transformation von Plasmiden in Bakterien | 29 |
| 4.4 Kultivierung und Aufarbeitung von Zellen | 30 |
| 4.4.1 Kultivierung von Zelllinien | 30 |
| 4.4.2 Isolierung und Kultivierung mononukleärer Zellen aus Patientenblutproben..... | 30 |
| 4.5 Stimulation primärer B-CLL-Zellen mittels CD154-Feederzellen | 31 |
| 4.5.1 Transfektion von HeLa-Zellen und Selektion stabiler Zellklone mit Hygromycin..... | 31 |
| 4.5.2 Feederstimulation primärer B-CLL-Zellen..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6 Vektor-Produktion und Zelltransduktion | 32 |
| 4.6.1 Generierung und Aufreinigung infektiöser Überstände | 32 |
| 4.6.2 Bestimmung des infektiösen Titers | 32 |
| 4.6.3 Transduktion von Zelllinien und primärer B-CLL-Zellen mit infektiösen Überständen..... | 32 |
| 4.6.4 Neutralisation der infektiösen Überstände | 33 |
| 4.6.5 Mikroskopischer Transduktionsnachweis | 33 |
| 4.6.6 Annexin-V Bindungsassay..... | 33 |
| 4.6.7 Immunhistochemischer Nachweis von VCA (gp125) nach Induktion des lytischen Zyklus in den Verpackungszellen | 33 |
| 4.7 Durchflußzytometrische Analysen | 34 |
| 4.8 Statistische Auswertung | 34 |
| 5 ERGEBNISSE | 35 |
| 5.1 EBV abgeleitete Genvektoren, die für eGFP kodieren | 35 |
| 5.1.1 Generierung von EBV-Genvektoren mittels einer Verpackungszelllinie der ersten Generation | 35 |
| 5.1.2 Expression des EBV Rezeptors CD21 auf B-CLL-Zellen | 37 |
| 5.1.3 Transduktion von Zelllinien und primärer B-CLL-Zellen..... | 37 |
| 5.1.4 Neutralisation der Transduktion mittels eines anti-gp350 monoklonalen Antikörpers..... | 38 |
| 5.1.5 EBV Genvektoren mit deletierten TR-Sequenzen..... | 39 |
| 5.1.6 Transgenexpression im zeitlichen Verlauf | 41 |
| 5.1.7 Annexin Bindung nach Transduktion mit EBV-Genvektoren | 42 |
| 5.1.8 Transduktion von CD40L-Feeder stimulierten B-CLL-Zellen..... | 43 |
| 5.2 EBV-abgeleitete Genvektoren, die für CD40-Ligand kodieren | 45 |
| 5.2.1 Klonierung CD40-Ligand kodierender Genvektorplasmide | 45 |
| 5.2.2 Transduktion, Neutralisation und Genvektoren mit deletierten TR-Sequenzen..... | 45 |
| 6 DISKUSSION | 47 |
| 6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und kritische Würdigung | 47 |
| 6.2 Diskussion der Methodik und Fehleranalyse | 51 |
| 6.3 Diskussion alternativer Genvektorsysteme im Kontext der Literatur | 53 |
| 6.4 Ausblick für die klinische Applikation EBV-abgeleiteter Genvektoren | 57 |
| 6.5 Ausblick für die Immuntherapie der chronisch lymphatischen Leukämie | 58 |
| 7 ZUSAMMENFASSUNG | 59 |
| 8 LITERATURVERZEICHNIS | 60 |
| 9 ANHANG | 70 |
| 9.1 Verzeichnis der Abkürzungen | 70 |
| 9.2 Danksagung | 72 |
| 9.3 Lebenslauf | 73 |

1 Einleitung

1.1 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp ist ein niedrig malignes Non-Hodgkin Lymphom und zugleich die häufigste Form unter den Leukämien im Erwachsenenalter. Sie ist charakterisiert durch eine zunehmende Akkumulation monoklonaler leukämischer B-Zellen mit definiertem Immunphänotyp im Blut, im Knochenmark und in den lymphatischen Organen. Die Erkrankung unterscheidet sich von anderen B-Zell-Malignomen in mehrfacher Hinsicht. Als einzige unter den Leukämien wird die chronische lymphatische Leukämie nicht mit ionisierender Strahlung oder toxischen Substanzen in Verbindung gebracht, Opfer atomarer Bomben besitzen kein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Caligaris-Cappio & Hamblin, 1999). Des Weiteren geht die chronische lymphatische Leukämie mit einer Reihe charakteristischer Immunphänomene einher, die den Krankheitsverlauf komplizieren. Unter anderem haben die Patienten ein erhöhtes Risiko, an Autoimmunzytopenien zu erkranken, verursacht durch polyklonale Autoantikörper, die sich gegen Epitope bestimmter Blutzellfraktionen richten (Kipps & Carson, 1993).

1.1.1 Diagnose

Oftmals wird die Erkrankung akzidentell bei asymptomatischen Patienten diagnostiziert, die durch eine Leukozytose im Routineblutbild auffallen. Die Diagnose der chronischen lymphatischen Leukämie basiert dabei auf der Morphologie im Blutaussstrich und einem bestimmten Immunphänotyp der neoplastischen Zellen. Morphologisch handelt es sich bei CLL-Zellen vom B-Zelltyp um kleine reife Lymphozyten, deren Membran beim Anfertigen von Blutaussstrichen leicht rupturiert. Charakteristisch sind deshalb sogenannte Gumprechte Kernschatten, die als Zelltrümmer zu finden sind. Mittels durchflußzytometrischer Analyse läßt sich eine klonale B-Zell Expansion zuverlässig von reaktiven Lymphozytosen abgrenzen. Die Leichtkettenrestriktion klonaler B-Zellen führt zu einem asymmetrischen Verhältnis zwischen kappa - und gamma-Leichtketten als Bestandteil der Oberflächenimmunglobuline, typischerweise größer 3:1 oder kleiner 1:2 (Geary *et al.*, 1993). Eine Multiparameteranalyse erlaubt auch bei kleiner Tumorlast eine zuverlässige Detektion der Leichtkettenrestriktion innerhalb entsprechender Subpopulationen. Das Antigenmuster der CLL-Zellen vom B-Zelltyp in der Durchflußzytometrie ähnelt dem von Lymphozyten im Bereich der Mantelzone

sekundärer Lymphfollikel. Charakteristisch ist dabei die Koexpression von CD5, CD19, CD20, CD23 und Oberflächenimmunglobulin bei Fehlen der Marker FMC7 und CD79b.

1.1.2 Epidemiologie

Das mediane Alter bei Diagnose liegt bei 70 Jahren. Weniger als 15% der Erstdiagnosen entfallen auf Patienten unter 50 Jahren. Die jährliche Inzidenz beträgt 3 von 100000 Einwohnern.

1.1.3 Ätiologie

Die Ursache der Erkrankung ist unbekannt. Hinsichtlich der Prognose und des Erkrankungsverlaufs handelt es sich um eine heterogene Erkrankung. Chromosomale Aberrationen lassen sich in der Interphasenzytogenetik mittels FISH-Analyse in mehr als 80% der Fälle detektieren und betreffen verschiedene Chromosomen: Chr.13q in 55% der Patienten, Chr.11q in 18%, Chr.12 in 16%, und andere (Stilgenbauer *et al.*, 2002), die biologische Bedeutung ist jedoch unklar. Aufgrund der Erkenntnis, dass nur ein Teil der Patienten somatische Mutationen der Immunglobulingene in den CLL-Zellen aufweist wurde die Existenz von zwei Erkrankungssubgruppen postuliert. Die malignen Klone entspringen demnach entweder naiven B-Zellen ohne Mutation oder den mutierten B-Zellen nach Reifung im Keimzentrum eines Lymphfollikels (Hamblin *et al.*, 1999). Durch Analyse mittels DNA-Microarrays wurde jedoch ein für beide Subgruppen gemeinsames Genexpressionsprofil gefunden, welches B-CLL-Zellen unabhängig vom Mutationsstatus der Immunglobulingene von normalen B-Zellen und von anderen B-Zell abgeleiteten Malignomen unterscheidet (Rosenwald *et al.*, 2001).

1.1.4 Immunologie

Die bei der CLL beobachteten Störungen des Immunsystems betreffen sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem. Aufgrund der komplexen Interaktionen der verschiedenen Effektorsysteme lassen sich viele der beobachteten Mechanismen derzeit nicht kausal erklären. Möglicherweise verursacht die große Masse an Tumorzellen im Blut, im Knochenmark und in den lymphatischen Organen ein suppressives Mikromilieu für die

unterschiedlichen Effektorzellpopulationen. Im Laufe der Erkrankung entwickelt sich eine zunehmende Hypogammaglobulinämie, ein funktioneller T-Lymphozytendefekt sowie eine Funktionsstörung von NK-Zellen. Klinisch spiegelt sich der Immundefekt in rezidivierenden Infektionen wider, häufige Infektionen durch Staphylokokken und Streptokokken führt man dabei auf eine insuffiziente Immunglobulinsekretion zurück, virale Infektionen auf die eingeschränkte Funktion des zellulären Immunsystems.

1.1.5 Verlauf

In den frühen Stadien ist die chronisch lymphatische Leukämie meist asymptomatisch. Mit fortschreitender Erkrankung entwickeln die Patienten eine Lymphadenopathie, Müdigkeit, eine B-Symptomatik und häufige Infekte. Aufgrund von zunehmender Knochenmarksinfiltration entwickeln sich mit fortgeschrittener Erkrankung eine Anämie und eine Thrombozytopenie. Die klinische Stadieneinteilung erfolgt nach Binet et al. 1981 und stützt sich auf das Blutbild und die Erfassung befallener Lymphknotenstationen (s. Tabelle 1.1). Je nach Erkrankungsstadium variiert die mittlere Überlebenszeit zwischen 2 und mehr als 10 Jahren.

| Krankheitsstadium nach Binet 1981 | Klinischer Befund | Medianes Überleben |
|--|--|---------------------------|
| A | Befall von höchstens 2 Lymphknoten-regionen | > 10 Jahre |
| B | Befall von mindestens 3 Lymphknoten-regionen | 5 Jahre |
| C | Anämie und/oder Thrombozytopenie | 2 Jahre |

Tabelle 1.1: Prognoseabschätzung anhand der Stadieneinteilung nach Binet (Binet et al., 1981)

Die biologische Heterogenität der Erkrankung spiegelt sich in sehr unterschiedlichen klinischen Verläufen wider. Viele Patienten leben über viele Jahre unbeeinträchtigt, ohne dass sie einer Therapie bedürfen, andere hingegen erliegen den Komplikationen der Erkrankung trotz maximaler therapeutischer Anstrengungen innerhalb weniger Jahre. Die Abschätzung der Prognose anhand des Tumorstadiums ist unbefriedigend. Um eine präzisere

Risikostratifizierung zu erreichen finden deshalb weitere Laborparameter, sowie genetische- und biologische Marker bei der Prognoseabschätzung Berücksichtigung. Ziel ist die Identifikation von Patienten, die ein hohes Risiko für einen rasch progredienten Erkrankungsverlauf haben, und deshalb möglicherweise von einer frühen Therapie oder einer aggressiveren Therapie profitieren. Für CLL-Patienten mit dem Tumorstadium Binet A konnte gezeigt werden, dass der Serumwert der Thymidinkinase einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt (Hallek *et al.*, 1999). Eine Übersicht über Prognosefaktoren die bereits in der klinischen Routine oder im Rahmen von Studien zur Risikostratifizierung eingesetzt werden zeigt Tabelle 1.2.

| <i>Befunde, die mit einem ungünstigen Verlauf einhergehen</i> | |
|--|---|
| Lymphozytenverdopplungszeit | Weniger als 12 Monate |
| Beta-2-Mikroglobulin | Erhöhter Serumspiegel |
| Thymidinkinase | Erhöhter Serumspiegel |
| Interphasenzytogenetik | Aberrationen der Chromosomen 11q oder 17p |
| CD38 Status | CD38-Positivität der CLL-Zellen |
| Mutationsstatus der Immunglobulin-V_H-Genregion | Fehlen von somatischen Hypermutationen |
| Muster der Knochenmarksinfiltration | Diffuse oder nichtnoduläre Infiltration |

Tabelle 1.2: Ergänzende Untersuchungen zur Risikostratifizierung von CLL-Patienten

1.1.6 Therapie

Da einerseits eine kurative Therapie derzeit nicht zur Verfügung steht, andererseits die Erkrankung oft über viele Jahre indolent verläuft und bevorzugt ältere Patienten betrifft, sehen die Empfehlungen der NCIWG eine therapeutische Intervention erst bei symptomatischer oder fortgeschrittener Erkrankung vor (Cheson *et al.*, 1996). Im Rahmen von Studien wird derzeit geprüft, ob Patienten mit hohem Progressionsrisiko von einer Therapie in einem frühen Krankheitsstadium profitieren (Hallek *et al.*, 2002). Mit Chlorambucil und Fludarabin stehen heute wirksame Chemotherapeutika zur Verfügung. Durch Therapie mit Fludarabin werden bei unvorbehandelten Patienten insgesamt Ansprechraten zwischen 70 und 80% erzielt, davon zwischen 23 und 37% komplette Remissionen. Zahlreiche neue therapeutische Substanzen werden derzeit klinisch erprobt.

Verschiedene wirksame monoklonale Antikörper, die an definierte Oberflächenantigene der B-CLL-Zellen binden stehen mittlerweile in humanisierter Form oder als chimäre Antikörper zur Verfügung (Mavromatis & Cheson, 2003). Für Alemtuzumab, einem humanisierten anti-CD52-Antikörper konnte in Patienten mit rezidivierender Erkrankung nach vorangegangener Therapie mit Fludarabin ein Ansprechen in 33% festgestellt werden (Keating *et al.*, 2002). Die Kriterien der NCIWG für eine komplette Remission wurden über die Jahre mehrfach ergänzt, so dass heute neben einer Normalisierung des klinischen Befundes und des Blutbildes ein unauffälliger Knochenmarksbefund erforderlich ist. Eine minimale Resterkrankung, wie sie mittels molekularer Methoden detektiert werden kann, wird dadurch allerdings nicht ausgeschlossen. Tabelle 1.3 beschreibt die unterschiedlichen Verfahren, die bei der Beurteilung des therapeutischen Erfolges herangezogen werden können.

| | <i>Befund</i> |
|-------------------------------------|---|
| Klinische Remission | Symptomfreiheit und unauffälliger körperlicher Untersuchungsbefund |
| Laborchemische Remission | Normalisierung des Blutbildes und der Lymphozytenzahl im Knochenmarksaspirat |
| Pathologische Remission | Rückbildung fokaler Infiltrate im Knochenmark |
| Immunphänotypische Remission | Normalisierung des Verhältnisses kappa- zu lambda-Leichtketten innerhalb der CD5-positiven B-Zellfraktion |
| Molekulare Remission | Kein Nachweis von Immunglobulin-Gen-Rekombination in der Southernblotanalyse, kein Nachweis maligner Zellen mittels PCR |

Tabelle 1.3: Verschiedene Ansätze die bei der Beurteilung des Therapieerfolges verfolgt werden

Insgesamt ist die therapeutische Situation insofern unbefriedigend, als außer mittels allogener Knochenmarkstransplantation eine Heilung nicht erzielt wird. Durch konventioneller Chemotherapie wird nur bei einem Teil der Patienten eine komplette Remission erzielt, die progressionsfreien Intervalle nach Therapie sind oft nur kurz. Immunologische Therapieansätze der chronischen lymphatischen Leukämie sind vielversprechend. Man erhofft sich eine Eradikation des malignen Klons durch spezifische Effektorzellen oder durch Antikörper, die sich gegen Oberflächenmoleküle auf B-CLL-Zellen richten. Ein weiterer erfolgversprechender Ansatz ist die genetische Manipulation von B-CLL-Zellen mit dem Ziel einer Stimulation spezifischer T-Lymphozyten *in vivo*, die eine anti-Tumor Immunantwort

vermitteln können.

1.2 Die Rolle von CD40-Ligand für die Regulation von humoralen und zellulären Immunreaktionen

Eine zentrale Rolle für die Regulation von humoralen und zellulären Immunreaktionen aber auch in der Pathogenese des Immundefekts in der chronischen lymphatischen Leukämie spielt CD40-Ligand (CD40-L, CD154), ein Klasse II Membranglykoprotein aus der Familie der Tumor Nekrose Faktor Liganden (TNF-Liganden). Die Interaktionen der Vertreter der TNF-Liganden mit ihren Rezeptoren auf T-Lymphozyten und den anderen Zellen des Immunsystems regulieren das Immungeschehen, indem sie kostimulatorische und apoptotische Signale vermitteln. Die Induktion der TNF-Ligandenmoleküle erfolgt dabei mit einer für den jeweiligen Vertreter charakteristischen Kinetik, weshalb man den einzelnen Molekülen eine unterschiedliche Rolle in der T-Lymphozytenaktivierung aber auch in der Lymphompathogenese zuschreibt.

T-Zellen erkennen Antigene an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen über ihren Rezeptor als prozessierte Peptide in Assoziation mit den Glykoproteinen des autologen Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I und II. Anders als das ubiquitär exprimierte MHC Klasse I Genprodukt werden MHC Klasse II Moleküle nur von wenigen Zelltypen konstitutiv exprimiert: von B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, den sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und von Epithelzellen des Thymus. Endogene Peptidantigene (z.B. Onkoproteine einer Tumorzelle) werden als Oligopeptide komplexiert an MHC Klasse I Molekülen präsentiert, exogene Peptidantigene (z.B. durch Tumorzellnekrose freigewordene Tumorantigene) werden im Kontext von MHC Klasse II Molekülen präsentiert. Eine strikte Trennung beider Prozessierungswege erscheint heute jedoch als nicht mehr aufrecht erhaltbar. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen fähig sind, Antigene von untergehenden Zellen aufzunehmen und über MHC Klasse I Moleküle zu präsentieren (Albert *et al.*, 1998; Kovacovics-Bankowski & Rock, 1995). Komplexe aus endogenen Proteinen und MHC Klasse I Molekülen werden spezifisch von CD8 positive, zytotoxischen T-Zellen erkannt. MHC Klasse II/Peptidkomplexe werden an der Oberfläche der APCs spezifisch von CD4 positive T-Helfer Zellen erkannt.

CD4 positive T-Zellen, sogenannte T-Helferzellen, können zur Initiierung sowohl einer humoralen Immunreaktion als auch von zytotoxischen Immunantworten beitragen, indem sie mit MHC Klasse II tragenden Zellen, den Antigen-präsentierenden Zellen, in Interaktion

treten. Im Falle einer T-Helferzell-abhängigen humoralen Reaktion ist die Aufnahme des Antigens mit nachfolgender Prozessierung und MHC Klasse II gekoppelter Präsentation durch eine B-Zelle erforderlich. Zytotoxische T-Zellen erkennen zwar MHC Klasse I gekoppelte Antigene direkt auf der Zielzelle, die Ausdifferenzierung naiver, CD8 positiver T-Zellen, die zur Zytolyse fähig sind, erfordert *in vivo* jedoch das Mitwirken von T-Helferzellen (Cardin *et al.*, 1996; Keene & Forman, 1982). Derzeit geht man davon aus, dass die T-Helferzellen mit den Antigen-präsentierenden Zellen in Interaktion treten, um diese zu aktivieren (Guerder & Matzinger, 1992). Die Aktivierung erfolgt über den durch die Antigen-präsentierenden Zellen exprimierten Rezeptor CD40, und bedingt eine Reihe von Veränderungen, welche die Antigen-präsentierenden Zellen in die Lage versetzen eine zytotoxische T-Zell Antwort zu initiieren. Mittels anti-CD40 monoklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, dass ein CD40 getriggertes Signal die Präsenz von T-Helferzellen ersetzen kann (Bennett *et al.*, 1998) (Schoenberger *et al.*, 1998).

Eine zentrale Rolle für die Initiierung zytotoxischer Immunantworten spielen MHC Klasse II exprimierende dendritische Zellen, die ihrerseits über MHC Klasse I restringierte Antigenpräsentation mit CD8 positiven T-Zellen und über MHC Klasse II restringierte Antigenpräsentation mit CD4 positiven T-Zellen interagieren.

Nach Jenkins sind für die T-Zell Aktivierung zwei verschiedene Signale erforderlich (Jenkins, 1994). Neben der Antigen-spezifischen Interaktion zwischen T-Zell Rezeptor und MHC-Peptidkomplex auf der Antigen-präsentierenden Zelle ist ein Kostimulus erforderlich, der auf der T-Zelle durch die Rezeptoren CD28 und CTLA-4 vermittelt wird. Für eine vollständige T-Zell-Antwort nach Interaktion mit dem Peptid/MHC Komplex (Signal 1) ist ein zweites, sogenanntes kostimulatorisches Signal erforderlich. Diese kostimulatorischen Signale werden vor allem durch die Interaktion zwischen den auf den Antigen-präsentierenden Zellen exprimierten Oberflächenmolekülen B7-1 und B7-2 und den Rezeptoren CD28 und CTLA-4 auf T-Zell Seite geliefert. Weitere kostimulatorisch wirksame Molekülpaare sind die Komplexe aus CD70/CD27 und CD40/CD40-L. Diese Signale sind für die Induktion einer klonalen T-Zell Expansion sowie einer selektierten Interleukin Produktion entscheidend. Fehlt dieses kostimulatorische Signal, kommt es zur klonalen Apoptose des Antigen-spezifischen T-Zell-Klons *in vitro* (Jenkins *et al.*, 1987) bzw. peripheren T-Zell Toleranz *in vivo* (Eynon & Parker, 1992) (siehe Abb. 1.1).

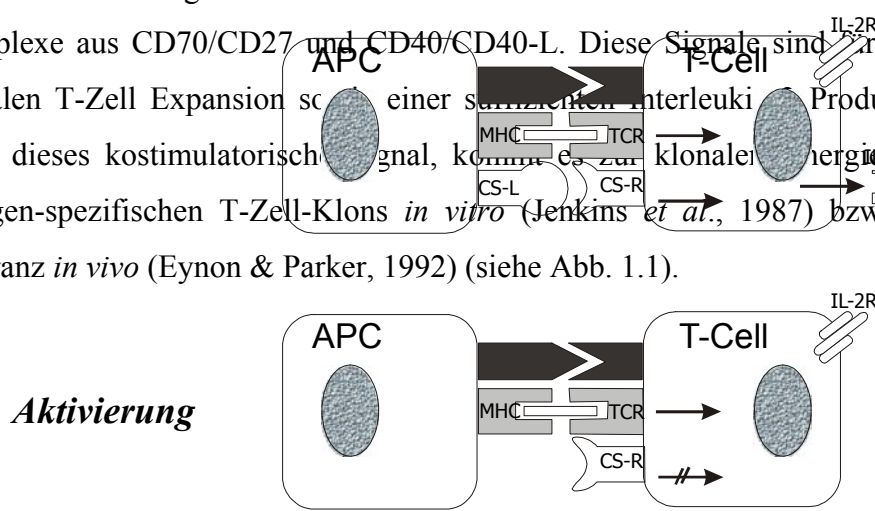


Abb. 1.1: Notwendige Signale für die T-Zell Aktivierung. Neben einem Antigen-restringierten Signal vermittelt über den T-Zellrezeptor ist ein zweites kostimulatorisches Signal erforderlich, damit es zur Aktivierung der T-Zelle kommt. APC: Antigen präsentierende Zelle, MHC: Major Histocompatibility Complex, TCR: T-Zell Rezeptor, CS-L: Kostimulatorischer Ligand, CS-R: Rezeptor für CS-L, IL-2 Interleukin 2, IL-2R Rezeptor für IL-2

Damit Antigen-präsentierende Zellen die Kompetenz zur Aktivierung von T-Zellen erlangen müssen sie ihrerseits zunächst aktiviert werden. Die Interaktion zwischen dem TNF-Liganden/Rezeptorpaar CD40-L/CD40 spielt dabei eine zentrale Rolle. Monoklonale Antikörper, die sich gegen den zellmembranständigen Rezeptor CD40 richten und Zelllinien, die stabil das CD40-Ligandenmolekül exprimieren, haben zur Aufklärung der Signalkaskade beigetragen, die einer Aktivierung von Immuneffektorzellen vorausgeht. CD40-L wird transient von CD4-positiven T-Zellen aufreguliert, nachdem sie ein Antigen-restringiertes Signal über den T-Zellrezeptor erhalten haben (Casamayor-Palleja *et al.*, 1995). *In vitro* lässt sich eine transiente Expression von CD154 auf der Oberfläche von CD4 positiven T-Lymphozyten durch Ligation von CD3 induzieren, einem akzessorischen Molekül des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (Castle *et al.*, 1993). Erst durch Ligation von CD40 auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle wird diese zur Expression von B7-1 und B7-2 stimuliert, so dass eine vollständige T-Zell Aktivierung durch Kostimulation via CD28 und CTLA-4 erfolgen kann (Caux *et al.*, 1994) (siehe Abb. 1.2). *In vitro* lässt sich die T-Helferzell-vermittelte Aufregulation von B7-1 und B7-2 auf B-Zellen mittels eines monoklonalen anti-CD40 Antikörpers blockieren (Ranheim & Kipps, 1993; Roy *et al.*, 1995). Neben den kostimulatorischen Molekülen werden auch Adhäsionsmoleküle aufreguliert, inflammatorische Zytokine sezerniert und die Kapazität zur Antigenprozessierung gesteigert (Grewal & Flavell, 1998)

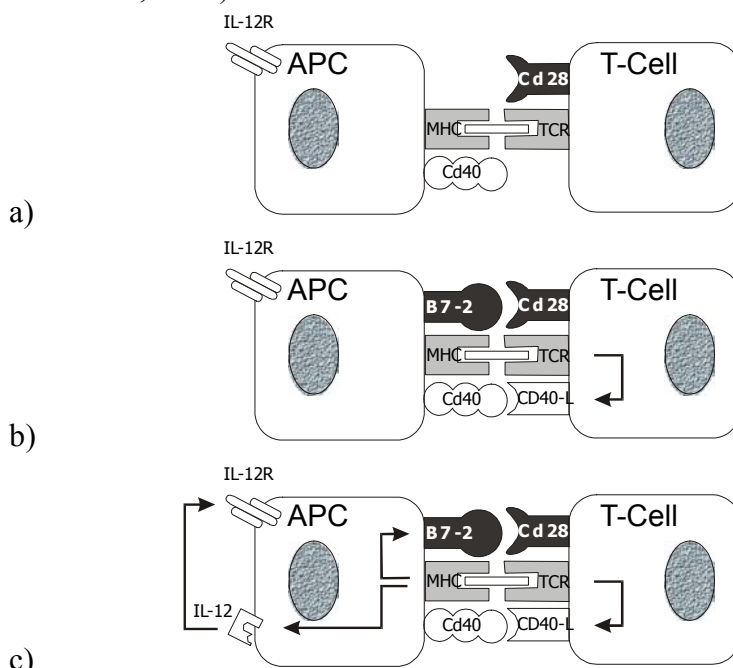


Abb. 1.2: CD40 Bindung auf Antigen-präsentierenden Zellen erhöht die stimulatorische Kapazität gegenüber T-Zellen. a) Aufregulation von CD40-L durch die T-Zelle nach Empfang eines MHC-restringierten Signales über den T-Zell Rezeptor (TCR). Erst durch Bindung von CD40-L an den Rezeptor auf Antigen-präsentierenden Zellen (b) werden notwendige autokrin stimulatorische Moleküle wie Interleukin-12 sezerniert und kostimulatorische Moleküle für die T-Zell Aktivierung aufreguliert (c).

1.3 Immuntherapie der chronischen lymphatischen Leukämie

1.3.1 Die Rolle von CD154 (CD40-L) in der Pathogenese der chronischen lymphatischen Leukämie

Der beobachtete komplexe Immundefekt, der sich mit fortschreitender Erkrankung bei B-CLL-Patienten ausbildet, legt die Vermutung nahe, dass sich neben einer Verdrängung von Zellen des Immunsystems aus den blutbildenden- und lymphatischen Geweben durch Akkumulation von Zellen des malignen Klons auch sekundäre Defekte anderer Immuneffektorkompartimente ausbilden. Mitunter beobachtet man eine eingeschränkte T-Zell Proliferation nach allogener Stimulation mit Lymphozytenmischpopulationen *in vitro* (Kay & Kaplan, 1986). Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des CD154-CD40 Signalweges ergeben sich aus der Analyse eines CD154-Mutations-Syndroms bzw. von CD154 $-/-$ Knockout-Mäusen. Bei dem Hyper-IgM Syndrom handelt es sich um eine X-chromosomal vererbte Immunerkrankung, die durch eine Mutation im Locus für CD154 hervorgerufen wird und dadurch die Expression eines funktionalen Moleküls auf aktivierten T-Zellen unterbindet (Ramesh *et al.*, 1994). Ebenso wie bei den CD154 $-/-$ Knockout-Mäusen unterbleibt eine sekundäre humorale Immunantwort als Reaktion auf eine wiederholte Immunisierung mit T-Helferzell-abhängigen Antigenen bei den Patienten (Callard *et al.*, 1993; Xue *et al.*, 1994). Bedingt durch einen Isotypenwechsel basieren sekundäre humorale Immunantworten auf den Immunglobulinklassen IgA, IgE und IgG im Gegensatz zur primären IgM-Antwort. Die Serumspiegel für IgA, IgE und IgG sind deshalb bei diesen Patienten erniedrigt. In den Gewebeschnitten der lymphatischen Organe fällt auf, dass Keimzentren in den Lymphfollikel fehlen. Die Patienten erkranken rezidivierend an Infektionen des Atemtrakts, aber auch an opportunistischen Infektionen, wie sie sonst für T-Zell Immundefekte typisch sind (Notarangelo *et al.*, 1992). Untersuchungen an CD154 $-/-$ Knockout-Mäusen konnten schließlich bestätigen, dass CD40-L essentiell für die Initiierung Antigen-spezifischer T-Zell Immunreaktionen *in vivo* ist (Grewal *et al.*, 1995). Interessanterweise finden sich bei diesen Patienten, ähnlich wie bei der chronischen lymphatischen Leukämie, häufig Immunzytopenien verursacht durch polyklonale Autoantikörper (Rosen *et al.*, 1995). Die grosse Übereinstimmung dieser Symptome mit den beobachteten Symptomen bei der chronischen lymphatischen Leukämie legt die Vermutung nahe, dass bei der CLL sekundär eine defekte Expression von CD154 durch aktivierte T-Zellen vorliegt. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass die B-CLL-Zellen in der Tat über ihren CD40-Rezeptor eine Herabregulierung von CD154 auf aktivierten T-Zellen bewirken (Cantwell *et al.*, 1997).

Unklar ist derzeit die Bedeutung der CD40-vermittelten *in vitro* Effekte für die Expansion des malignen Klons der chronischen lymphatischen Leukämie *in vivo*. Die neoplastischen Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie zeichnen sich aus durch einen Defekt in der Induktion des programmierten Zelltods (Reed, 1998). Während CD40 Stimulation hochmaligner Non-Hodgkin Lymphome die Apoptosebereitschaft der neoplastischen Zellen erhöht (Wang *et al.*, 1997), gibt es für die niedrig malignen Non-Hodgkin Lymphome zahlreiche Hinweise, die eher für einen proliferativen bzw. anti-apoptotischen Effekt sprechen. Mittels des rekombinanten humanen CD40-Ligand Trimermoleküls konnte eine Zellzyklusprogression primärer Mantelzelllymphomkulturen erzielt werden (Andersen *et al.*, 2000). Primäre CLL-Zellen werden durch CD40 Stimulation zur Expression von Survivin, einem Apoptose-inhibierenden Molekül, angeregt (Granziero *et al.*, 2001). Die Beobachtung von CLL-Zell-Clustern im Knochenmark, die Survivin exprimieren, ähnlich den Zellen in den stark proliferierenden Arealen eines Lymphfollikels, lässt Spekulationen über eine mögliche kausale Rolle für die Expansion des Proliferationspools neoplastischer Zellen zu.

1.3.2 Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen

Zytotoxische T-Zellen sind nach vorausgegangener Aktivierung in der Lage, autologe Tumorzellen zu lysieren. Ein vielversprechender Ansatz zur Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie zielt deshalb auf die Generierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen. Voraussetzung für die Induktion tumorspezifischer Effektorzellen ist allerdings, dass die Tumorzellen Antigene exprimieren, die nach Prozessierung als Peptide MHC-gekoppelt gegenüber T-Zellen präsentiert werden. Die Tabelle 1.4 zeigt potentielle Tumorantigene B-Zell abgeleiteter Tumoren. Aufgrund ihrer Abstammung von B-Zellen exprimieren alle Zellen des malignen Klons der B-CLL ein bestimmtes Oberflächenimmunglobulin, das auch als Idiotyp bezeichnet wird. Idiotypen sind die am besten charakterisierten Tumorantigene, die von Lymphomzellen prozessiert und in Form von Peptiden gebunden an MHC I Molekülen präsentiert werden (Weiss & Bogen, 1989). Tumorspezifische zytotoxische T-Zellen konnten aus dem Blut von Non-Hodgkin Lymphompatienten nach Idiotypvaksinierung isoliert werden (Nelson *et al.*, 1996).

| | <i>Tumor Antigen</i> | <i>Beispiel</i> |
|---------------------------------------|---|---|
| Patienten-spezifische Antigene | Akzidentelle Mutationen normaler Genprodukte, hypervariable Genprodukte | Idiotyp, Expression auf B-Zellen und B-Zell Lymphomen |
| Gemeinsame Antigene | Aktivierte Onkogene oder mutierte Tumorsuppressorgene | |
| | Virus kodierte Proteine | Epstein-Barr virale Proteine, Expression in EBV assoziierten Malignomen z.B. Burkitt Lymphom, Morbus Hodgkin |
| | Gewebespezifische Antigene, tumorspezifische Antigene | Katalytische Untereinheit der Telomerase (h-TERT), Framework-Abschnitte der variablen Region der Immunglobuline |

Tabelle 1.4: Tumorantigene B-Zell abgeleiteter Tumoren

Ex vivo generierte Lymphom-spezifische, zytotoxische T-Zellen wurden bereits erfolgreich zur Therapie Epstein-Barr Virus assoziierter Lymphome durch adoptiven T-Zell Transfer eingesetzt. EBV-spezifische, zytotoxische T-Zellen wurden dabei durch *in vitro* Stimulation mit autologen lymphoblastoiden Zellen (Rooney *et al.*, 1998), besonders potent in Hinblick auf die Generierung EBV spezifischer zytotoxischer T-Zellen scheinen dabei die nukleären Antigene EBNA-3A und EBNA-3B zu sein (Christian Münz, mündlich).

Konzeptionell lassen sich folgende immuntherapeutische Strategien zur Lymphomtherapie unterscheiden, die eine gegen den Tumor gerichtete zytotoxische Immunantwort hervorrufen sollen:

- Vakzinierung mit definierten Antigenen in Form von Proteinen, Peptiden oder rekombinanter DNA, die Antigenformulierung wird i.d.R. mit einem Adjuvans oder mit GM-CSF verabreicht, einem Zytokin, das Antigen-präsentierende Zellen anlockt und aktiviert
- Vakzinierung mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, welche die Tumorantigene *in vivo* an Immuneffektorzellen präsentieren
- Vakzinierung mit autologen oder allogenen Tumorzellen, die durch Stimulation *ex vivo* oder durch genetische Modifikation Tumorantigene effektiver präsentieren oder

Antigen-präsentierende Zellen aktivieren, so dass diese nach Aufnahme von Tumorantigenen diese effektiver gegenüber T-Zellen präsentieren

Vakzinierungsstrategien, die auf definierten Tumorantigenen beruhen, setzen voraus, dass potente Tumorantigene für das entsprechende Malignom zur Verfügung stehen. Formulierungen für Idiotyp-Vakzinierungen müssen individuell für jeden Patienten kloniert bzw. synthetisiert werden. Sie sind deshalb mit einem erheblichen Arbeitsaufwand verbunden. Zuletzt haben Methoden der Bioinformatik zur Identifizierung von gemeinsamen Tumorantigenen aus den Idiotypen unterschiedlicher CLL-Patienten beigetragen (Trojan *et al.*, 2000). Anhand einer Datenbank mit Sequenzinformationen des Idiotyps mehrerer Patienten gelang es, MHC Klasse I bindende Peptide aus den unspezifischen Immunglobulinabschnitten (Framework-Abschnitte) zu berechnen. Durch repetitive Stimulation konnten Peptid-spezifische, zytotoxische T-Zellen expandiert werden, die imstande waren, CLL-Zellen von verschiedenen Patienten zu lysieren. Ein erster Schritt in Richtung universelles Tumorantigen gelang durch die Identifizierung MHC Klasse I bindender Peptidabschnitte der katalytischen Untereinheit der Telomerase (h-TERT) und der Generierung spezifischer zytotoxischer T-Zellen gegen h-TERT exprimierende Tumorzellen (Vonderheide *et al.*, 1999). Telomerase wird von ca. 85% aller Karzinome exprimiert und schützt die Chromosomenenden vor DNA Verlust, wie man ihn z.B. bei Zellteilung beobachtet.

Bisher erzielte Erfolge in klinischen Studien zur Tumorstimmung konnten die hohen Erwartungen jedoch nicht befriedigen. Ein Grund hierfür liegt in der geringen Anzahl und möglicherweise auch defizitären Potenz verfügbarer Tumorantigene. Immer wenn das Antigenprodukt keine kausale Rolle in der malignen Transformation spielt, sind spontane Mutationen oder sogenannte Escape-Mutationen unter Immuntherapie wahrscheinlich. Für niedrig maligne Non-Hodgkin-Lymphome wurde eine klonale Expansion von Tumorzellen, die Mutationen im variablen Abschnitt ihres Idiotyps tragen, durch Immunselektion beschrieben. Ein Verlust des Idiotyps mit fortschreitender Erkrankung wurde für unterschiedliche Lymphommodelle ebenfalls beschrieben (George *et al.*, 1991; Zelenetz *et al.*, 1991). Fortschritte erhofft man sich durch die Kombination mehrerer Tumorantigene oder durch Vakzinierung mit genetisch veränderten Tumorzellen.

Obwohl vereinzelt Fälle von spontanen Komplettremissionen berichtet wurden (Ribera *et al.*, 1987), entwickeln CLL-Patienten i.d.R. keine tumorwirksame Immunantwort. Stattdessen

nimmt die Tumorlast ohne therapeutische Intervention stetig und kontinuierlich zu. Potentielle CLL-spezifische Tumorantigene, die von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen MHC gekoppelt gegenüber zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert werden können, wurden bereits beschrieben. Phänotypisch sind die B-CLL-Zellen einer CD5 exprimierenden Subpopulation von B-Lymphozyten zuzuordnen und dementsprechend exprimieren sie MHC Moleküle der Klasse I und II. Da aktivierte B-Lymphozyten *in vitro* effiziente Antigen-präsentierende Zellen darstellen (von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2002), besteht ein möglicher Ansatz für die Immuntherapie B-Zell abgeleiteter Malignome darin, die Tumorzellen so zu stimulieren, dass sie ihre eigenen Antigene gegenüber zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen präsentieren. Aufgrund ihrer potentiellen Fähigkeit als Antigen-präsentierende Zellen eigene, spezifische Tumorantigene gegenüber T-Zellen zu präsentieren, eignen sich B-Zell abgeleitete Tumoren deshalb besonders für eine Immuntherapie mit einer Tumorzellvakzine. So wie B-Lymphozyten müssen allerdings auch B-Lymphomzellen zuerst stimuliert werden, um als Antigen-präsentierende Zellen zu funktionieren. Ein potenter Stimulus, der physiologisch von aktivierten T-Zellen vermittelt wird, erfolgt durch Ligation von CD40 auf der Oberfläche von Lymphomzellen (Abschnitt 1.2) (Ranheim & Kipps, 1993). Tabelle 1.5 zeigt unterschiedliche Möglichkeiten für eine CD40-vermittelte Stimulation von B-Lymphomzellen für verschiedene Applikationen.

| | <i>Beispiele</i> | <i>Applikation</i> |
|---|----------------------------------|------------------------|
| Makromoleküle | Anti-CD40 monoklonale Antikörper | <i>Ex vivo/in vivo</i> |
| | Lösliches CD40-L Homotrimer | <i>Ex vivo/in vivo</i> |
| Zellständige CD40-Ligandenmoleküle | Transgene Feederzellen | <i>Ex vivo</i> |
| | Transgene Tumorzellen | <i>In vivo</i> |
| | Präaktivierte autologe T-Zellen | <i>In vivo</i> |

Tabelle 1.5: Potentielle Therapeutika, die auf eine CD40-vermittelte Aktivierung von B-Lymphomzellen abzielen

Im *in vitro* Modell konnte durch Stimulation von B-CLL-Zellen mittels eines CD40-Ligand exprimierenden Feedersystems gezeigt werden, dass CLL-Zellen dabei wichtige kostimulatorische Moleküle wie B7-1, B7-2, Adhäsionsmoleküle u.a. ICAM-1, LFA-3 und ferner MHC Moleküle beider Klassen aufregulieren (Buhmann *et al.*, 1999). Naive B-CLL-

Zellen waren nicht imstande, *in vitro* eine allogene T-Zell Proliferation zu stimulieren. Erst durch Feederstimulation können B-CLL-Zellen die Kapazität erwerben, autologe und allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Durch repetitive Stimulation allogener T-Zellen mit Feeder-stimulierten B-CLL-Zellen konnten zytotoxische T-Zellen expandiert werden, die zur spezifischen Lyse unstimulierter CLL-Zellen, gemessen im [⁵¹Chrom]-Freisetzungssassay, imstande waren. CD40-L-Feeder-stimulierte CLL-Zellen könnten sowohl direkt *in vivo* als Vakzine als auch *in vitro* zur Expansion Lymphom-spezifischer T-Zellen für den adoptiven T-Zell Transfer eingesetzt werden. Für das follikuläre Lymphom und für die B-CLL konnte gezeigt werden, dass sich durch repetitive Stimulation mit CD40-aktivierten Lymphomzellen in Gegenwart von Interleukin-2 und INF γ autologe T-Zellen in ausreichender Zahl für einen adoptiven Transfer expandieren lassen (Schultze *et al.*, 1997).

Das therapeutische Prinzip der CD40-Aktivierung neoplastischer B-Zellen konnte auch im Mausmodell für verschiedene B-Zell Lymphome bestätigt werden. Im A20-Lymphommodell, einer Prä-B-lymphoblastoiden Zelllinie aus der BALB/C Maus, konnte erfolgreich das Prinzip einer therapeutischen Vakzinierung demonstriert werden (Dilloo *et al.*, 1997). Durch Ko-Injektion von bestrahlten Tumorzellen mit transgenen, CD40-L-und Interleukin-2-exprimierenden Fibroblasten konnte ein signifikanter therapeutischer Effekt, gemessen am tumorfreien Überleben, erzielt werden. In einer Studie von French wurden Mäuse nach Inokkulation mit syngenen Tumorzellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit anti-CD40 monoklonalen Antikörper therapiert. Neben einer Tumoreradikation konnte dadurch eine Protektion für nachfolgende Tumoreradikationen ("Tumor-Rechallenge") erzielt werden (French *et al.*, 1999). Die erhobenen Daten unterstützen die Hypothese, dass neoplastische B-Zellen durch CD40-Aktivierung ihre Kompetenz als Antigen-präsentierende Zellen steigern und dadurch eine Tumorrogression bewirken können. Antikörpervermittelte Zytotoxizität unabhängig von der Spezifität und dem CD40-Rezeptor nachgeschalteten Signalweg konnten als Effektormechanismen ausgeschlossen werden. Partielle therapeutische Effekte durch Antikörperapplikation wurden auch in CD40-negativen Lymphomen beobachtet, so dass man vermuten muss, dass zur therapeutischen Wirkung der CD40-vermittelten Therapien auch CD40 exprimierende, nichtneoplastische Zellen wie dendritische Zellen des Patienten beitragen (s.a. Abschnitt 1.2).

1.3.3 Therapeutischer Gentransfer von CD40-Ligand in B-CLL-Zellen

Durch adenoviralen Gentransfer konnte *in vitro* in B-CLL-Zellen die Expression von CD154 als funktionellen Liganden für CD40 erzielt werden (Kato *et al.*, 1998). Das aktivierende

Signal, das physiologischerweise durch aktivierte T-Zellen vermittelt wird, soll in der gemischten Lymphozytenkultur und *in vivo* durch transgene Zellen des malignen Klons erbracht werden. Der entscheidende Vorteil dieses Ansatzes gegenüber einer Vakzinierung mit stimulierten Lymphomzellen liegt dabei in der Fähigkeit transgener Lymphomzellen, nicht-transduzierte Zellen, sogenannte Bystander-Zellen, zu aktivieren. Die Transaktivierung von Bystander Zellen lässt sich *in vitro* durch eine intrazytoplasmatische Farbmarkierung klar von der Aktivierung der transduzierten Zellen abgrenzen. Als phänotypische Veränderungen wurden u.a. die Aufregulation von B7 Molekülen, ICAM-1 und LFA-3 dokumentiert (Kato *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu mock-transduzierten B-CLL-Zellen waren die CD154-transgenen B-CLL-Zellen imstande, allogene und autologe T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren. Auch die Sekretion von $\text{INF}\gamma$, einem Leitzytokin von TH1-Effektorantworten, lässt sich vermehrt im Überstand nachweisen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Genterapieprotokoll entwickelt mit dem Ziel, eine antileukämische Immunreaktion *in vivo* durch Reinfusion CD154 transgener B-CLL-Zellen auszulösen. Durch ihre Akkumulation im peripheren Blut ist die Isolation neoplastischer Zellen in ausreichender Anzahl z.B. durch ein Aphereseprotokoll leicht zu bewerkstelligen. In einer Phase-I-Dosiseskalation wurden B-CLL-Patienten bis zu 3×10^9 transgene, autologe B-CLL-Zellen intravenös reinfundiert (Wierda *et al.*, 2000). Dosis limitierende Nebenwirkungen wurden dabei nicht beobachtet. Gemessen an der Lymphozytenzahl im peripheren Blut und an der Lymphknotengröße wurden in der Mehrzahl der Patienten signifikante klinische Effekte beobachtet. Im *in vitro* Monitoring nahm die Zahl reaktiver T-Zellen, die auf Stimulation mit präaktivierten, autologen CLL-Zellen mit Proliferation oder mit $\text{INF}\gamma$ -Sekretion reagierten, zu. Dennoch ist unklar, inwieweit das klinische Ansprechen auf die zytolytische Aktivität Leukämie-spezifischer T-Zellen zurückzuführen ist.

Erste klinische Studien zur *in vivo* Applikation des löslichen funktionellen CD40-Liganden Moleküls (rhCD40-L) wurden aufgrund vorliegender *in vitro* Daten für hochmaligne Non-Hodgkin Lymphome und solider Tumoren initiiert, aufgrund möglicher anti-apoptotischer Effekte (Abschnitt 1.3.1) wird diese Form der CD40-Stimulation bei den niedrig malignen Non-Hodgkin Lymphomen derzeit nicht evaluiert. Eine Generierung von Antigen-präsentierenden Zellen aus B-Lymphozyten *in vitro* mittels rhCD40-L für einen immuntherapeutische Ansatz wurde beschrieben (von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2002).

Als ein zusätzliches Phänomen wurde in den geschilderten *in vitro* Modellen konsistent eine

Aufregulation von Apo-1/Fas durch die CLL-Zellen nach CD40-Stimulation beobachtet. B-Lymphozyten reagieren auf CD40-Stimulation einerseits mit Aktivierung und Proliferation, andererseits führt eine verstärkte Expression von Apo-1/Fas dazu, dass sie empfänglich für apoptotische Signale, vermittelt durch Fas-L, werden (Schattner *et al.*, 1995). Unklar ist, inwieweit eine Fas-vermittelte Apoptose aktivierter CLL-Zellen *in vivo* eine Rolle für die beschriebenen therapeutischen Ansätze spielt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass CD40-stimulierte B-CLL-Zellen auch eine Empfänglichkeit für eine Fas-L vermittelte Apoptose erwerben (Chu *et al.*, 2002). Möglicherweise lassen sich über eine Fas-vermittelte Apoptose Tumorantigene der Prozessierung und Präsentation durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen zuführen (Nagata & Golstein, 1995)

1.4 Epstein-Barr-Virus

1.4.1 Epidemiologie und Biologie

Das Epstein-Barr Virus gehört zur Familie der Herpesviridae, zur Unterfamilie der gamma-Herpesviren, und ist ein humanpathogenes Virus. Das virale Genom besitzt eine Länge von 172kb. Terminale Wiederholungen (terminal repeats, TR) flankieren den DNA-Doppelstrang und sind erforderlich für die Replikation und Verpackung des Genoms in Virionen. Der Lebenszyklus des EBV weist wie der anderer Herpesviren eine lytische und eine latente Phase auf. Die Primärinfektion mit EBV erfolgt über Epithelzellen des Nasen-Rachenraumes und ist gekennzeichnet durch lytische DNA-Replikation, Expression nahezu aller viraler Gene und Virusproduktion. Serologisch lässt sich in mehr als 90% aller Erwachsenen eine abgelaufene Infektion nachweisen (Cohen, 2000). Die Infektion erfolgt meist in jungem Alter und manifestiert sich in Form unspezifischer Symptome oder als infektiöse Mononukleose. In der latenten Phase liegt das Genom als extrachromosomales Plasmid vor und wird zusammen mit dem zellulären Genom repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Für die episomale Erhaltung des viralen Genoms ist das viral kodierte Protein EBNA-1 (EBV-nukleäres-Antigen-1) verantwortlich, es bindet an den Ursprung der latenten Replikation *oriP*. Über die Mechanismen, die *in vivo* zu einer Reaktivierung von EBV in latent infizierter Zellen führen, ist nur sehr wenig bekannt. Eine zentrale Rolle für die Umschaltung in den lytischen Zyklus spielt das virale Genprodukt BZLF-1. Als Transaktivator bindet es direkt an *oriLyt* und induziert eine Kaskade von EBV-Genen, die zur Virussynthese notwendige Proteine bereitstellen (Countryman & Miller, 1985; Hammerschmidt & Sugden, 1988).

1.4.2 Virale Genvektoren auf der Basis von EBV

Virale Genvektoren auf der Basis von großen DNA Viren wie EBV benötigen für die Verpackung eine Helferzelllinie. Diese Zelllinie trägt das Wildtyp- oder ein mutiertes EBV Genom und stellt die für die Enkapsidierung notwendigen viralen Faktoren, die dem Genvektor fehlen, *in trans* zur Verfügung. EBV-Genvektoren (mini-EBVs) wurden bereits erfolgreich zur Immortalisierung humaner B-Lymphozyten und zum Transfer therapeutischer Gene in B-Lymphozyten und B-Lymphomzellen *in vitro* eingesetzt (Banerjee *et al.*, 1995; Hammerschmidt & Sugden, 1989; Kempkes *et al.*, 1995). Gegen eine klinische Verwendung dieser Systeme spricht jedoch die Freisetzung von infektiösen Helferviruspartikel, die potentiell onkogene EBV Sequenzen wie LMP-1, LMP-2A, EBNA-LP, EBNA-1, EBNA-2,

EBNA-3A und EBNA-3C enthalten (Kieff, 1996). Ein wesentlicher Fortschritt war deshalb die Konstruktion einer neuen Helferzelllinie mit dem Namen TR-2/293. Dem darin enthaltenen rekombinanten Helfervirus wurden die Verpackungssignale TR deletiert, so dass eine Verpackung von EBV-Genvektoren ohne Freisetzung von Helferviruspartikel möglich ist (Delecluse *et al.*, 1998; Delecluse *et al.*, 1999). Diese Zelllinie erlaubt die Verpackung von rekombinanten Genvektorplasmiden, welche die Verpackungssignale TR und den lytischen Replikationsorigin *oriLyt* als essentielle EBV-Elemente enthalten (Hammerschmidt & Sugden, 1988; Zimmermann & Hammerschmidt, 1995). Durch Kotransfektion des Genvektors und eines die lytische Phase von EBV induzierenden BZLF-1-Expressionsplasmids in die Verpackungszelllinie TR-2/293 wird eine Verpackung der EBV Genvektoren als infektiöse Partikel in eine EBV Hülle erreicht (siehe Abb. 5.1).

2 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, ein EBV-basiertes Vektorsystem auf seine Eignung für den Gentransfer in B-CLL-Zellen zu testen. Zunächst wurde die Effizienz des viralen Gentransfers am Beispiel eines löslichen Markerproteins ermittelt, in einem zweiten Schritt wurde der Transfer eines immunstimulatorischen Moleküls demonstriert.

3 Material

3.1 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden den Stammsammlungen der Arbeitsgruppen M. Hallek (GSF-Forschungszentrum, Klinische Kooperationsgruppe Gentherapie hämatologischer Neoplasien, München) und W. Hammerschmidt (GSF-Forschungszentrum, Abteilung Genvektoren, München) entnommen.

| <i>Zelllinie</i> | <i>Herkunft</i> |
|-------------------------|---|
| 293 | Niere (Mensch, embryonal) (Graham <i>et al.</i> , 1977) |
| TR-2/293 | 293 Zellen, Transfektion mit einer TR-Deletionsmutante des EBV (Delecluse <i>et al.</i> , 1999) |
| HeLa | Cervixkarzinom (Mensch), HPV 16-transformiert (ATCC, Rockville, USA) |
| MEC1 | CLL (Mensch), in prolymphozytischer Transformation (Stacchini <i>et al.</i> , 1999) |
| Raji | Burkitt Lymphom (Mensch) (Pulvertaft, 1964) |
| Ramos | Burkitt Lymphom (Mensch), EBV-Genom negativ (Klein <i>et al.</i> , 1975) |

3.2 Patientenproben

Die verwendeten Blutproben wurden nach ärztlicher Aufklärung des Patienten und dessen Einwilligung durch Venipunktion gewonnen. Alle Patienten erfüllten die Kriterien zur Diagnose einer chronischen lymphatischen Leukämie und wurden gemäß der Binet-Klassifikation in Tumorstadien eingeteilt. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme in klinisch stabilem Zustand, frei von Infektionen, und hatten über einen Zeitraum von mindestens einem Monat keine zytoreduktive Therapie erhalten.

| <i>Patient</i> | <i>Stadium</i> | <i>Geschlecht/Alter</i> | <i>Vorausgegangene Therapien</i> |
|----------------|----------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1 | C | M/64 | CLB, F |
| 2 | B | M/32 | - |
| 3 | A | M/53 | - |
| 4 | C | W/63 | CLB, F |
| 5 | C | W/86 | - |
| 6 | C | M/57 | - |
| 7 | C | M/70 | - |
| 8 | A | M/70 | - |
| 9 | C | M/60 | CLB, F |
| 10 | C | W/65 | CLB |
| 11 | A | W/56 | - |
| 12 | C | W/68 | - |

W=weiblich; M=männlich; CLB=Chlorambucil; F=Fludarabin

3.3 Plasmide

Die meisten der im Rahmen meiner Arbeit verwendeten Plasmide wurden den Plasmid-Banken der Arbeitsgruppen M. Hallek und W. Hammerschmidt (GSF-Forschungszentrum, Abteilung Genvektoren, München) entnommen. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Plasmide wurden im Rahmen des Dissertationsprojektes in mehreren Klonierungsschritten unter Verwendung üblicher Klonierungstechniken (Sambrook & Russell, 2001) hergestellt.

| <i>Plasmid</i> | <i>Beschreibung</i> |
|-----------------------|---|
| p509 | pCMV:BZLF-1 (Hammerschmidt & Sugden, 1988) |
| p562 | oriP, oriLyt und Hygromycin-Resistenzgen in pBR322 |
| p562mCD40L* | mCD40L mit CMV Promotor in p562 |
| p588 | oriP, oriLyt, Terminal Repeats und Hygromycin-Resistenzgen in pBR322 (Delecluse <i>et al.</i> , 1999) |
| p588mCD40L* | mCD40L mit CMV Promotor in p588 |
| p1933 | oriP, oriLyt, Terminal Repeats, eGFP und Hygromycin-Resistenzgen in pBR322 |
| p2122 | oriP, oriLyt, eGFP und Hygromycin-Resistenzgen in pBR322 (Delecluse <i>et al.</i> , 1999) |
| p2670 | CMV:BALF-4; Expressionsplasmid für BALF-4 (gp125/110) |
| P2713* | mCD40L in pRK5mycMCS |
| pCep4mCD40L | CMV:mCD40L; Expressionsplasmid für mCD40L |
| pRK5mycMCS | CMV:Expressionsplasmid basierend auf pRK5 |

Ausgangsplasmide für die Klonierung CD40-Ligand kodierender EBV-Reporterplasmide waren die Plasmide p588 und p562. Analog zu p1933 kodiert p588 für die essentiellen EBV-Elemente TR und oriLyt. Dem deletierten Plasmid p562, fehlen analog dem Plasmid p2122 die für die Spaltung und Verpackung des Genvektors notwendigen TR-Sequenzen.

In einem ersten Schritt wurde das den Liganden kodierende AvrII-EcoRI Fragment aus pCep4mCD40L mit dem EcoRI und HindIII Fragment von pRK5myc-MCS ligiert, so dass das Ligandenmolekül unter Kontrolle des CMV-Promotors von pRK5myc-MCS gelangte. Die so entstandene Expressionskassette wurde nach Verdau mit SpeI und XmnI in die HindIII-Restriktionsstelle von p588 bzw. p562 kloniert.

3.4 Antikörper

Monoklonale Antikörper und Isotypkontrollen für durchflußzytometrische Analysen:

| <i>Antigen</i> | <i>Label</i> | <i>Isotyp</i> | <i>Hersteller</i> |
|------------------|--------------|---------------|-------------------|
| CD5 | FITC | IgG1/Maus | Becton Dickinson |
| CD19 | PC5 | IgG1/Maus | Immunotech |
| CD40 | FITC | IgG1/Maus | Becton Dickinson |
| CD80 | FITC | IgG1/Maus | Becton Dickinson |
| CD86 | PE | IgG1/Maus | Becton Dickinson |
| CD95 (Fas/APO-1) | PE | IgG1/Maus | Immunotech |
| mCD154 | PE | IgG3/Hamster | Becton Dickinson |
| huCD154 | PE | IgG1/Maus | Becton Dickinson |

Monoklonale Antikörper für Immunhistochemische Färbungen:

| <i>Antigen</i> | <i>Label</i> | <i>Isotyp</i> | <i>Hersteller</i> |
|----------------|--------------|----------------|-------------------|
| VCA (gp125) | - | IgG/Maus | Chemicon |
| α -Maus | Cy3 | IgG/Kanninchen | Dianova |

Monoklonale Antikörper zur Neutralisation der Transduktion mit EBV-Vektoren:

| <i>Antigen</i> | <i>Label</i> | <i>Isotyp</i> | <i>Hersteller</i> |
|------------------|--------------|---------------|--------------------|
| gp350/220 (72A1) | - | IgG2a/Maus | ATCC (Hybridom) |

PE: Phycoerythrin; FITC: Fluorescein-Isothiocyant; Cy3: Indocarbocyanin

Chemicon (Temecula, USA), Dianova (Hamburg), Immunotech (Hamburg), Becton Dickinson (Heidelberg)

3.5 Bakterienstämme

E. coli TOP10F': F' {*lacI^qTn10*(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15
 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*
(Firma Invitrogen)*

3.6 Enzyme

New England Biolabs, Schwalbach

Roche Diagnostics, Mannheim

Stratagene, Heidelberg

3.7 Chemikalien, andere Materialien, Standards und Kits

Siehe Anmerkungen in den einzelnen Abschnitten.

3.8 Durchflußzytometer

Durchflußzytometrische Analysen wurden an einem Coulter Epics XL4 Gerät (Coulter, Hialeah, USA) durchgeführt. Als Anregungslichtquelle dient ein Argon-Ionen Laser mit 15 mW Ausgangsleistung bei 488nm.

3.9 Weitere Geräte

Siehe Anmerkungen in den einzelnen Abschnitten.

4 Methoden

4.1 Kultivierung von Mikroorganismen (Bakterien)

4.1.1 Plattenkultur

Mit einer sterilen Impföse oder einem Drygalski-Spatel wurden Bakterien aus einer Flüssigkultur auf sterile LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C invertiert im Brutschrank inkubiert. Zur Herstellung der Platten wurde das Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55 C in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten bei 4°C invertiert gelagert. Zur Selektion der Bakterien auf Plasmide wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

| | | |
|------------|--|------|
| LB-Medium | Bacto Trypton | 1,0% |
| | Yeast Extract | 0,5% |
| | NaCl | 0,5% |
| | NaOH | 1mM |
| | Bacto Agar (bei Platten) | 1,5% |
| Ampicillin | Stocklösung: 50 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert Endkonzentration: 50 µg/ml | |

4.1.2 Flüssigkultur

Von Plattenkulturen entnommene Einzelkolonien wurden in 5ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 220 rpm und 37°C inkubiert. Mit diesen Übernachtskulturen wurde frisches Medium angeimpft und mit den Bakterien in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C bis zur makroskopischen Eintrübung inkubiert.

4.2 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, Ligierung freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse, Affinitätsmatrices oder durch Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook & Russell, 2001). Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden spektrophotometrisch mit einem Spektralphotometer (Eppendorf Biophotometer 6131, Firma Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen sowie für analytische und präparative Plasmidisolierungen wurden Kits der Firma Qiagen (Hamburg) verwendet. Sequenzanalysen wurden von der Firma MediGenomix (Martinsried) und Toplab (Martinsried) nach dem Kettenabbruch- und Fluoreszenzdetektionsverfahren durchgeführt. Alle Puffer und Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Säulenherstellers verwendet bzw. vorgenommen. Im einzelnen wurden folgende Kits der Firma Qiagen eingesetzt:

| | |
|---------------------------|---|
| QIAquick Spin Kit | Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Aufreinigung von DNA |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Untersuchung von Einzelkolonien nach Transformation eines Ligationsansatzes |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit | Plasmidpräparationen in größerem Maßstab für Klonierungen, Sequenzierung und, Virenverpackung |

4.3 Transformation von Plasmiden in Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Stämme erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan (Hanahan & Meselson, 1983). Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl kompetenter *E. coli* TOP10F' Zellen auf Eis aufgetaut. In einem 1.5ml Gefäß wurde die zu transformierende DNA vorgelegt, vorsichtig mit 50µl kompetenter Zellen vermischt und sofort für 30Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für 45-60Sek. bei 37°C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock), sofort wieder auf Eis abgekühlt, bei RT mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 60Min. bei 37°C und 280rpm geschüttelt. Die Hälfte der Kultur wurde dannach auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika oder Selektionszusätzen ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht invertiert bebrütet.

4.4 Kultivierung und Aufarbeitung von Zellen

4.4.1 Kultivierung von Zelllinien

Als Nährlösung für die verwendeten Zelllinien diente RPMI Medium, angereichert mit 10% foetalem Kälberserum (FCS), Penicillin (50 µg/ml) und Streptomycin (50 µg/ml). Die Zellen wurden in Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle nachfolgend aufgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Hood in der Zellkultur durchgeführt. Zur Aufrechterhaltung der episomalen Persistenz des Plasmides wurde dem Medium für die Zelllinien TR-2/293 100µg/ml Hygromycin zugesetzt. Soweit nicht anders vermerkt wurden die Nährlösungen und Zusätze von der Firma Pan Biotech (Aidenbach) bezogen.

4.4.2 Isolierung und Kultivierung mononukleärer Zellen aus Patientenblutproben

Blutproben von B-CLL-Patienten wurden 1:1 mit PBS vermischt und einem Pancoll Dichtegradienten (Pancoll human, Dichte 1.077) überschichtet. Nach Zentrifugation (800g, 30Min., Raumtemperatur) wurde die Interphase abgenommen und einem Waschschrift in PBS unterzogen, bevor die Zellen in Medium resuspendiert wurden. In einem vierstündigen Adhärenzschrift erfolgte die Depletion der Monozytenfraktion. Um den Anteil kontaminierender Zellen zu bestimmen, erfolgte anschließend die Analyse mittels Durchflußzytometer (Abschnitt 4.7). Der Anteil an CD5/CD19 doppelt positiver Zellen lag regelrecht über 98%. Als Medium zur Kultivierung mononukleärer Zellen aus Patientenblutproben diente IMDM der Firma Life Technologies, Eggenstein, angereichert mit 10% foetalem Kälberserum (FCS), Penicillin (50 µg/ml) und Streptomycin (50 µg/ml). Die Zellen wurden in Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.5 Stimulation primärer B-CLL-Zellen mittels CD154-Feederzellen

4.5.1 Transfektion von HeLa-Zellen und Selektion stabiler Zellklone mit Hygromycin

Die zu transfizierenden HeLa-Zellen wurden in 15cm Zellkultur-Petrischalen bis zu einer 70%-igen Konfluenz kultiviert. Die Transfektion erfolgte dann in $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Medium. Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden jeweils 35 μg pCep4hCD40L bzw. p588mCD40L mit 875 μl CaCl_2 -Lösung (260 mM) und 875 μl Transfektionspuffer BBS (2x) verdünnt und 15Min. bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde anschließend unter leichtem Schwenken der Platten gleichmäßig auf die Kulturen pipettiert. Nach 24Std. Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und der Zusatz von Hygromycin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration). Mittels Durchflußzytometrie wurde der Anteil transgener Feederzellen in der Kultur bestimmt, der nach mehreren Passagen unter Selektionsdruck über 90% lag.

| | | |
|--|---------------------------|--------|
| Transfektionspuffer BBS (2x), pH 6.95: | NaCl | 260mM |
| | BES | 50mM |
| | NaH_2PO_4 | 0,75mM |
| | Na_2HPO_4 | 0,75mM |

4.5.2 Feederstimulation primärer B-CLL-Zellen

HuCD40L/HeLa- bzw. mCD40L/HeLa-Zellen wurden durch eine Röntgenquelle (Max-Planck Institut für Neuroimmunologie, Martinsried) mit 200Gy bestrahlt. und dann in 6-Loch-Platten ausgesät (1×10^6 Zellen pro Loch). Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 über Nacht wurde das Medium abgenommen und es wurden 1×10^7 B-CLL-Zellen zur Kokultivierung in frischem Medium überschichtet. Nach drei Tagen wurden die B-CLL-Zellen geerntet und erneut durch eine Ficoll Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt (Abschnitt 4.4.2), bevor sie dann einer durchflußzytometrischen Analyse unterzogen wurden. Um den Effekt der Feederstimulation zu dokumentieren, wurden die B-CLL-Zellen vor und nach Feederstimulation mittels Durchflußzytometrie immunphänotypisiert. Bei erfolgreicher Stimulation wurde eine variable Aufregulation von CD95, CD80 und CD86 beobachtet (Buhmann *et al.*, 1999).

4.6 Vektor-Produktion und Zelltransduktion

4.6.1 Generierung und Aufreinigung infektiöser Überstände

TR-2/293 Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesäht. Nach 24-stündiger Kultivierung bei 37°C werden die Zellen in OptiMem (Life Technologies, Eggenstein) mit je 1µg/Loch des EBV Reporterplasmides und jeweils 0,5µg/Loch der Expressionsplasmide pCMV-BZLF-1 (p509) und pCMV-BALF-4 (p2670) transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Lipofektamin von Life Technologies. Nach drei Tagen Kultivierung bei 37°C wurden die Überstände geerntet und durch eine Porengröße von 0,45µm filtriert (Sartorius, Göttingen). Anschließend wurden die Überstände durch eine 2-stündige Ultrazentrifugation bei 20000g in einem Festwinkelrotor (Beckmann, München) pelletiert und durch Resuspension in kleinerem Volumen zehnfach konzentriert.

4.6.2 Bestimmung des infektiösen Titers

Zur Bestimmung des infektiösen Titers wurde Überstand, der durch Transfektion des Reporterplasmides p1933 in TR-2/293 Zellen gewonnen wurde, zur Transduktion von Raji Zellen verwendet. In eine 96-Loch-Platte wurden jeweils 5×10^4 Zellen pro Loch aliquotiert. Zur Transduktion wurden unterschiedliche Verdünnungen des Überstandes hinzugegeben. Nach 48Std. erfolgte die Quantifizierung der eGFP exprimierenden Zellfraktion mittels Durchflußzytometrie. Für die Berechnung des infektiösen Titers wurde angenommen, dass der prozentuale Anteil GFP positiver Zellen an der Gesamtzahl der Zellen im Loch über 48Std. konstant bleibt. Da die Raji-Zelllinie ein Wildtyp EBV Genom trägt, ist von einer episomalen Persistenz von Reporterplasmiden, die den Ursprung der latenten Replikation *oriP* enthalten, bei Zellteilung auszugehen. Die Berechnung des infektiösen Titers erfolgt dann anhand einer geeigneten Verdünnungsstufe.

4.6.3 Transduktion von Zelllinien und primärer B-CLL-Zellen mit infektiösen Überständen

Jeweils 5×10^4 Zellen einer Zelllinie oder 5×10^5 B-CLL-Zellen wurden pro Loch in eine 96-Loch-Platte aliquotiert. Für jede Zelllinie und jede Patientenprobe wurden anschließend jeweils 100 oder 200µl der verschiedenen konzentrierten Überstände hinzugefügt. 48Std. später erfolgte die Quantifizierung der Transgenexpression mittels Durchflußzytometrie.

4.6.4 Neutralisation der infektiösen Überstände

Zur Neutralisation der infektiösen Überstände wurden vor der Transduktion jeweils 100 oder 200µl Überstand aus der Vektorverpackung mit 20µg des anti-gp350/220 monoklonalen Antikörpers (ATCC 72A1) vorinkubiert.

4.6.5 Mikroskopischer Transduktionsnachweis

48Std. nach Transduktion wurde die eGFP Genexpression *in situ* mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 10, Zeiss, Oberkochen) intrazytoplasmatisch nachgewiesen. Die Wellenlänge der Lichtquelle beträgt 450-490 nm.

4.6.6 Annexin-V Bindungsassay

Zur Bestimmung der Annexin V Bindung und der Propidiumiodid Aufnahme durch primäre B-CLL-Zellen unter *in vitro* Kulturbedingungen und nach Transduktion mit Vektorüberständen wurde ein Kit der Firma Bendermed (Wien) gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometer.

4.6.7 Immunhistochemischer Nachweis von VCA (gp125) nach Induktion des lytischen Zyklus in den Verpackungszellen

Nach Ernte der infektiösen Überstände wurden die Verpackungszellen zur Fixierung in geringem Volumen HBSS-Puffer (Firma Life Technologies) aufgenommen, auf Polylysin-beschichtete 6-Loch-Objektträger (Firma Medco, München) pipettiert und nach dem Absetzen der Zellen mit Paraformaldehyd-Lösung (4% in PBS) fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 30Min. mit einem anti-VCA Antikörper bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Objektträger mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem Cy3-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper für weitere 30Min. bei 37°C. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in Mounting-Fluid (Firma Sigma, München) eingebettet und zur Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 10, Anregungswellenlänge 546nm) betrachtet.

4.7 Durchflußzytometrische Analysen

Zelllinien wurden zur Analyse der eGFP Expression nach Transduktion mit PBS (Phosphate-Buffered-Saline) gewaschen und in einem geeigneten Volumen PBS resuspendiert. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Zellen der gleichen Linie, die unter denselben Bedingungen kultiviert wurden. Die Bestimmung der eGFP Expression in primären CLL-Zellen erfolgte innerhalb der CD19 positiven Zellfraktion, so dass kontaminierende Zellen aus den peripheren mononukleären Zellen der Patientenprobe weitgehend unberücksichtigt bleiben.

Die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf B-CLL-Zellen erfolgte durch Multiparameter-Analyse nach Färbung mit FITC-, PE- und PC5-konjugierten monoklonalen Antikörpern. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte über 10Min. nach einem Waschschrift und Resuspension in FACS-Puffer im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit FACS-Puffer und Resuspension in einem geeigneten Volumen. Alle Analysen von B-CLL-Zellen erfolgten innerhalb einer CD19-positiven Zellfraktion zur Minimierung des Einflusses kontaminierender Zellen. Zur Quantifizierung der Oberflächenantigenexpression wurde die MFIR (Mean Fluorescence Intensity Ratio) als Quotient aus der mittleren Fluoreszenzintensität der mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper gefärbten Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität der mit der entsprechenden Isotypkontrolle gefärbten Zellen bzw. der entsprechenden Autofluoreszenz bei eGFP berechnet.

| | | |
|--------------|------------------|------|
| FACS-Puffer: | PBS | |
| | FCS | 2% |
| | NaN ₃ | 0,1% |

4.8 Statistische Auswertung

Zur Analyse abhängiger Stichproben wurde als Paarvergleichstest der Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben verwendet. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Statistik Software SAS, Version 8.2. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang wurde für $p < 0,05$ angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 EBV abgeleitete Genvektoren, die für eGFP kodieren

5.1.1 Generierung von EBV-Genvektoren mittels einer Verpackungszelllinie der ersten Generation

In einem ersten Schritt wurde ein standardisiertes Protokoll zur Bestimmung des infektiösen Titers in Raji Zellen, einer Burkitt-Lymphom Zelllinie, die bereits ein Wildtyp EBV-Genom trägt, entwickelt (Abschnitt 4.6.2). Die Helfervirusfreie Verpackung erfolgt durch Transfektion des EBV Genvektors p1933 (Abb. 5.2) in die deletionsmutierte Helferzelllinie TR-2/293 (Abb. 5.1). Durch Kotransfektion eines BZLF-1 Expressionsplasmides wird der lytische Zyklus in der Verpackungszelllinie induziert. Drei Tage nach Transfektion wird der Überstand geerntet.

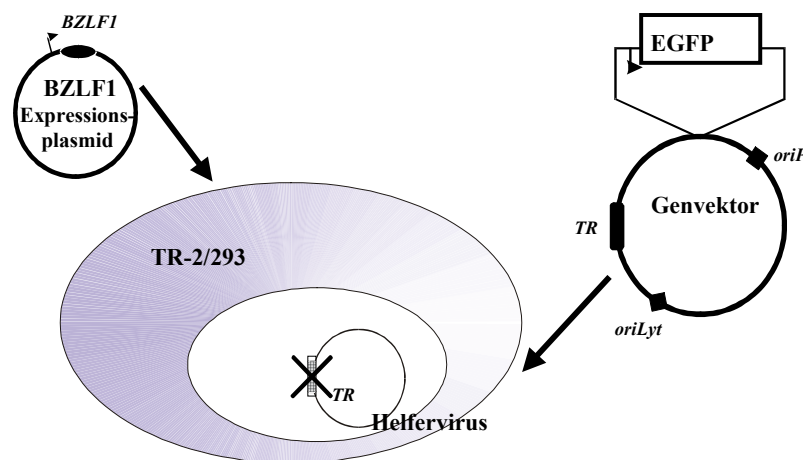


Abb. 5.1 Eine Helferzelllinie der ersten Generation zur Enkapsidierung von EBV-Vektoren. Die Zelllinie TR-2/293 trägt ein TR-deletiertes Helfervirus und erlaubt deshalb die Verpackung von EBV Genvektoren ohne Freisetzung von Helferviren. Die Induktion des lytischen Zyklus erfolgt durch Kotransfektion des EBV-Genvektors und einem BZLF-1 Expressionsplasmid.

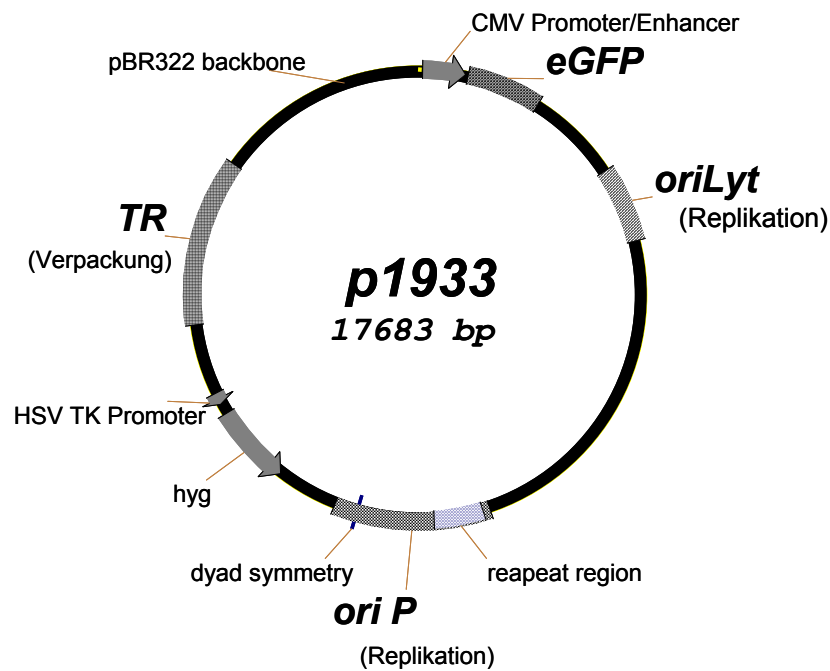


Abb. 5.2 Das EBV abgeleitete Genvektorplasmid p1933. Neben den essentiellen EBV Elementen für Verpackung und Replikation (TR und oriLyt) enthält p1933 das Markergen eGFP.

Die Expression lytischer viraler Gene durch die induzierten Helferzellen wurde immunhistochemisch durch Färbung mit einem monoklonalen anti-VCA Antikörper demonstriert (Abschnitt 4.6.7). Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab, dass ca. 20-25% der induzierten Verpackungszellen VCA exprimieren. Wesentliche Titersteigerungen konnten durch Implementierung zweier Zusätze zum Verpackungsprotokoll erzielt werden. EBV-Virione lassen sich durch einen Zentrifugationsschritt pelletieren, so dass die infektiösen Überstände für die Folgeexperimente durch eine Volumenreduktion um den Faktor zehn konzentriert wurden. Eine weitere Titersteigerung um ca. Faktor fünf wurde durch Kotransfektion eines Expressionsplasmids für BALF-4 (gp125/110) erzielt. Nach Optimierung der Vektorverpackung wurden Titer bis zu 2×10^6 infektiöse Partikel/ml erzielt. Die mittlere Transduktionsrate von Raji Zellen betrug $61,5 \pm 6,3\%$. Abb. 5.5 zeigt die Auswertung eines Experimentes mit dem Fluoreszenzmikroskop 48Std. nach Transduktion mit $10 \mu\text{l}$ bzw. $200 \mu\text{l}$ Überstand. Die durchflußzytometrische Auswertung dieses Experimentes ergab eine eGFP Expression in 11,7% bzw. 80,8% der transduzierten Zellen, bei einer MFIR von 1,7 bzw. 38,4.

5.1.2 Expression des EBV Rezeptors CD21 auf B-CLL-Zellen

Eine effiziente Transduktion durch EBV abgeleitete Vektoren setzt wahrscheinlich die Expression des Rezeptors CD21 voraus. Deshalb wurde die Expression von CD21 durch primäre B-CLL-Zellen anhand von vier Patientenproben durchflußzytometrisch bestätigt. Im Mittel exprimierten $73,9 \pm 12,2\%$ der Zellen CD21. Die mittlere MFIR betrug $22,6 \pm 10,1$.

5.1.3 Transduktion von Zelllinien und primärer B-CLL-Zellen

Neben Raji Zellen wurden die Zelllinien Ramos und MEC1 als weitere B-Zelllinien mit den Genvektor-Überständen transduziert. Unter gleichen Bedingungen wie für die Zelllinie Raji konnte durchflußzytometrisch im Mittel eine Positivität für eGFP Expression in $42,4 \pm 9,1\%$ der Ramos Zellen und $30,3 \pm 7,5\%$ der MEC1 Zellen bei einer MFIR von $9,6 \pm 5,8$ bzw. $3,1 \pm 0,5$ (siehe Tab. 5.1) gezeigt werden.

Die CD5/CD19 exprimierende Zellfraktion aus den peripheren Blutproben von insgesamt 11 bereits diagnostizierten und nach Tumorstadium befundeten Patienten wurde wie beschrieben isoliert und angereichert (Abschnitt 4.4.2). Die Transduktion mit EBV Genvektor-Überständen erfolgte bei einer errechneten MOI $< 0,3$ (multiplicity of infection) bezogen auf die Transduktion von Raji Zellen. Primäre B-CLL-Zellen erfordern nach den Erfahrungen des Labors eine höhere Zelldichte zur *in vitro* Kultivierung als die verwendeten Zelllinien, so dass höhere MOIs nicht realisierbar waren. Die eGFP Expression wurde durchflußzytometrisch in der auf CD19-selektierten Zellfraktion bestimmt. Die erzielten Transfektionsraten liegen zwischen 13,8 und 83,4% (Mittelwert 33,5%, Standardfehler 6,9). Tabelle 5.1 zeigt eine Übersicht über die detektierte Transgenexpression und MFIR der untersuchten Patientenproben. Mit Ausnahme von einzelnen blastoiden Zellen, die als eGFP positiv im Fluoreszenzmikroskop innerhalb der heterogenen Zellpopulation aufleuchten, gelingt ein eindeutiger mikroskopischer Nachweis der eGFP Expression für die große Population der B-CLL-Zellen nicht.

| Zelllinie/Patient | Positiv | MFIR |
|--------------------------|-------------------|----------------|
| Raji | $61,5 \pm 6,3\%$ | $16,6 \pm 6,1$ |
| Ramos | $42,4 \pm 19,1\%$ | $9,6 \pm 5,8$ |
| MEC1 | $30,3 \pm 7,5\%$ | $3,1 \pm 0,5$ |
| 1 | 25.8 | 3.6 |
| 2 | 42.1 | 3.1 |

| | | |
|-----------|------|------|
| 3 | 83.4 | 14.2 |
| 4 | 27.7 | 2.8 |
| 5 | 19.1 | 2.0 |
| 6 | 21.1 | 2.7 |
| 7 | 73.6 | 11.3 |
| 8 | 46.9 | 5.5 |
| 9 | 13.8 | 2.1 |
| 10 | 74.2 | 12.6 |
| 11 | 60.8 | 8.8 |

Tab. 5.1 Durchflußzytometrische Erfassung der eGFP Expression nach Transduktion unterschiedlicher Zelllinien und primärer B-CLL-Zellen. Die Überstände wurden durch Transfektion der Genvektorplasmide p1933 in die Helferzelllinie TR-2/293 gewonnen. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch als positiv erfasste Zellfraktion sowie die ermittelte MFIR (s.o.). Für die untersuchten Zelllinien wurde der Mittelwert und der Standardfehler aus jeweils fünf (Raji), drei (MEC1) bzw. zwei (Ramos) unabhängigen Experimenten berechnet. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Zellen derselben Linie bzw. desselben Patienten.

5.1.4 Neutralisation der Transduktion mittels eines anti-gp350 monoklonalen Antikörpers

Der neutralisierende, monoklonale Antikörper 72A1 richtet sich gegen gp350 (Hoffman *et al.*, 1980). In einem Vorversuch wurden verschiedene Antikörperverdünnungen zur Neutralisation von jeweils 100µl infektiösem Überstand getestet. 1µg des monoklonalen Antikörpers war ausreichend, um die Transduktionsrate in Raji-Zellen um mehr als 90% zu reduzieren. Die gleiche Menge eines unspezifischen Antikörpers vom gleichen Isotyp hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Transduktionsrate. In einem Folgeexperiment wurden jeweils 200µl Überstand durch Inkubation mit 20µg des monoklonalen Antikörpers 72A1 vor Transduktion neutralisiert. Abb. 5.5 zeigt die Auswertung eines Neutralisationsexperimentes mit Raji Zellen im Fluoreszenzmikroskop. Abb. 5.3 zeigt die jeweiligen Mittelwerte der untersuchten Zelllinien und Patientenproben im Diagramm. Die mittlere Transgenexpression durch die Zelllinie Raji reduzierte sich durch die Neutralisation nicht signifikant von $73,7 \pm 7,2\%$ auf $4,6 \pm 2,0\%$ ($p=0,08$ im T-Test für gepaarte Stichproben). In MEC1 Zellen wurde eine Reduktion der Transgenexpression von 44,4% auf 0,9% erzielt. Nach Neutralisation des Überstandes reduzierte sich der Mittelwert der detektierten Transgenexpression in den Proben der Patienten fünf bis sieben von $37,9 \pm 17,8\%$ auf $1,5 \pm 0,9\%$ ($p=0,1$), ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von $\rho = 0,99$ zeigt eine signifikante Reduktion der eGFP Expression durch Neutralisation ($p=0,04$).

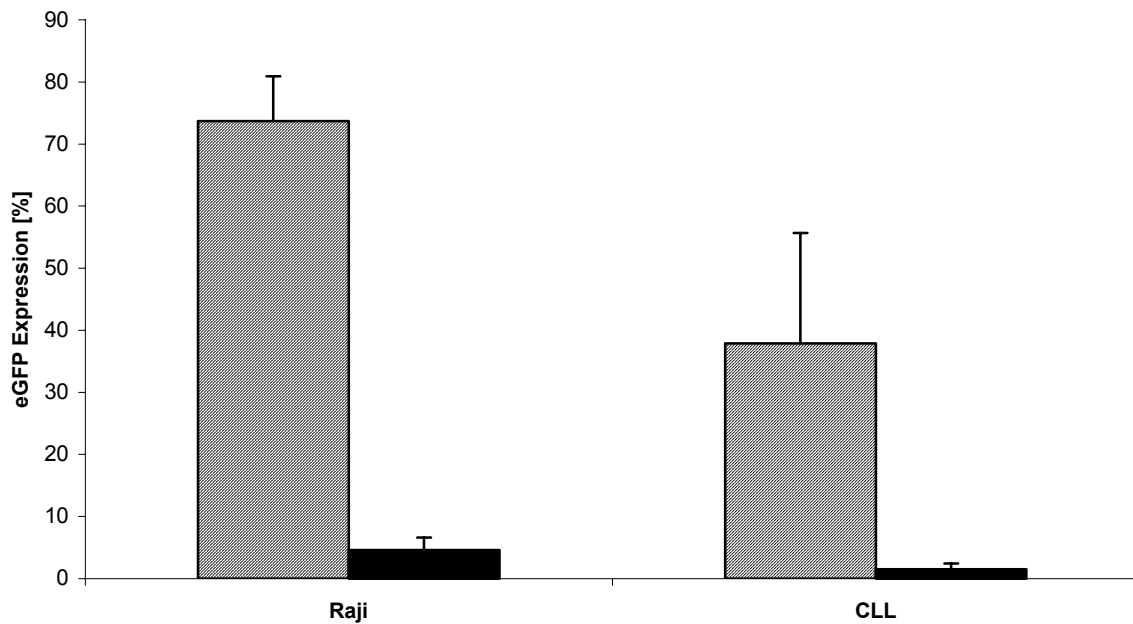


Abb. 5.3 Neutralisation des infektiösen Überstandes mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers. Die Transduktion von Raji-Zellen sowie drei verschiedener Patienten mit infektiösen (schraffiert) und neutralisierten Überständen (schwarz) wurden durchflußzytometrisch ausgewertet. Jeweils 200µl infektiöser Überstand wurden mit 20µg des monoklonalen Antikörpers ATCC 72A1 neutralisiert. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler aus den Experimenten.

5.1.5 EBV Genvektoren mit deletierten TR-Sequenzen

Parallel zum Reporterplasmid p1933 wurde das deletierte Plasmid p2122 zur Transfektion der Helferzelllinie eingesetzt. Dem Plasmid p2122 fehlen die für die Spaltung und Verpackung des Genvektors notwendigen TR-Sequenzen, infektiöse Virione werden dadurch nicht generiert. Die weiteren Elemente des Plasmids sind identisch mit denen des Genvektorplasmides p1933. Die mittels p2122 gewonnenen Überstände erlauben deshalb die Abschätzung eines nichtinfektiöser Gen- oder Molekültransfers. Gibt man den Überstand aus der Verpackung von p2122 auf die Zelllinien Raji oder MEC1, so reduziert sich die Transgenexpression auf Werte nahe der Detektionsschwelle. Für Raji Zellen wurde durchflußzytometrisch nach Transduktion mit p1933 eine mittlere Transgenexpression von $61,5 \pm 6,3\%$ erfasst, nach Transduktion mit p2122 von $3,6 \pm 1,2\%$ ($p=0,0012$). Für MEC1 Zellen reduzierte sich die mittlere Transgenexpression von $31,7 \pm 12,7\%$ auf $2,9 \pm 0,8\%$ ($p=0,24$). In sechs untersuchten Patientenproben (Patient 5, 6, 7, 8, 9, 11) verringerte sich der Anteil eGFP exprimierender Zellen im Mittel von $39,2 \pm 10,1\%$ auf $5,1 \pm 2,1\%$ ($p=0,009$) (vgl

Abb. 5.4, Abb. 5.5).

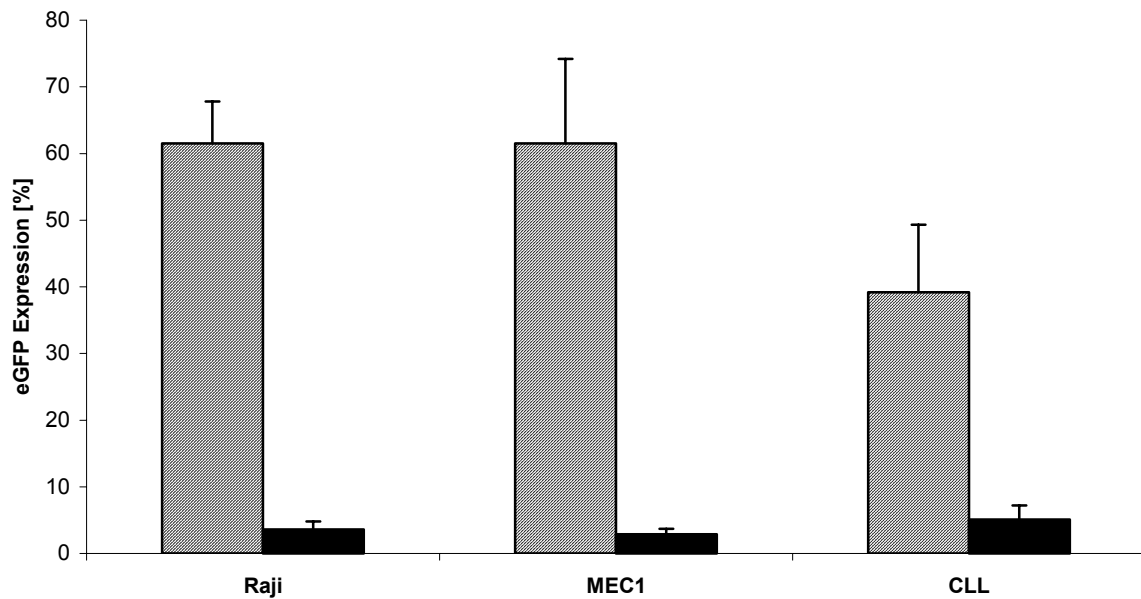


Abb. 5.4 Verpackung des TR deletierten Reporterplasmides p2122. Jeweils 200 μ l Überstand aus der Verpackung von p2122 (schwarz) und p1933 (schraffiert) wurden zur Transduktion der Zelllinien Raji, MEC1 und der Patientenproben eingesetzt. 48h nach Transduktion erfolgte die durchflußzytometrische Analyse. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und der Standardfehler aus mehreren Experimenten.

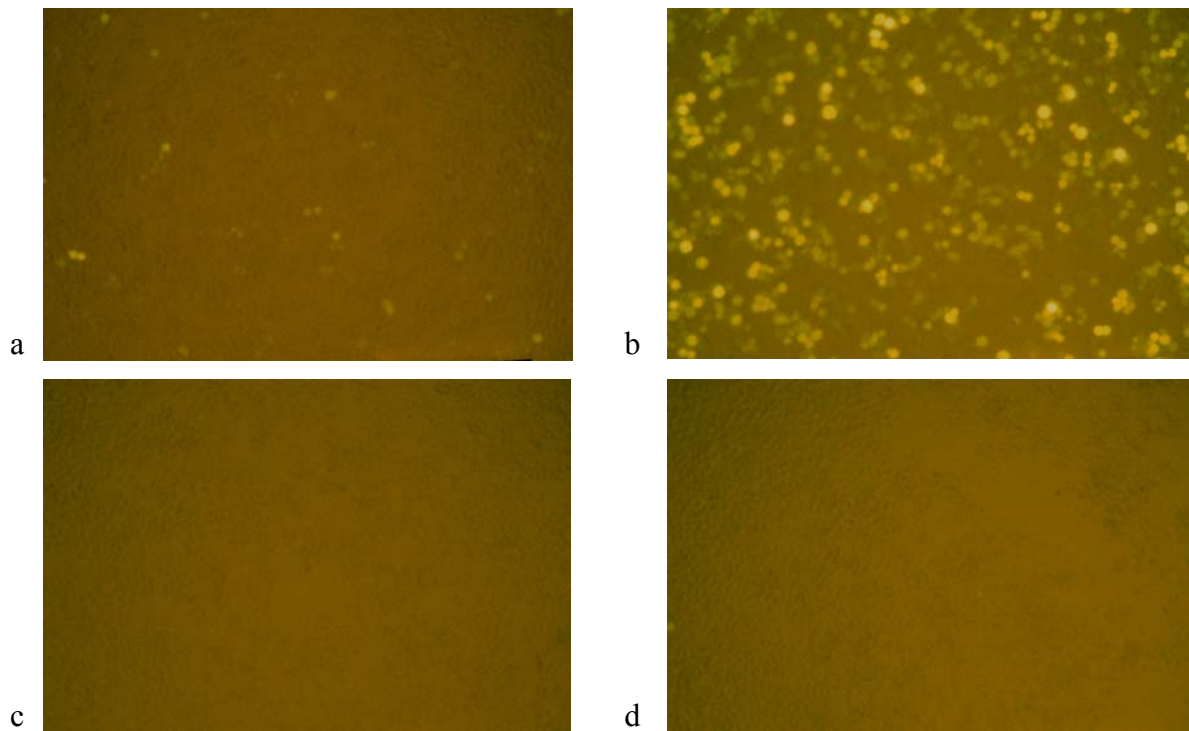


Abb. 5.5 Transduktion der Zelllinie Raji mit EBV-Genvektoren. 5×10^4 Raji Zellen wurden mit a) 10 μ l Überstand (p1933), b) 200 μ l Überstand (p1933), c) 200 μ l Überstand nach Inkubation mit 20 μ g des monoklonalen Antikörpers 72A1 d) 200 μ l des nicht infektiösen Überstandes (p2122) inkubiert und nach 48h im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

5.1.6 Transgenexpression im zeitlichen Verlauf

Die Aufrechterhaltung der Transgenexpression nach Transduktion wurde in Raji-Zellen und in primären B-CLL-Zellen eines Patienten (Patient 12) getestet. Sowohl Raji Zellen als auch primäre B-CLL-Zellen wurden 2, 5, und 8 Tage nach Transduktion mit GFP kodierenden Genvektorüberständen mittels Durchflußzytometer untersucht. Abb. 4.6 zeigt den prozentualen Anteil eGFP positiver-Zellen für die drei unterschiedlichen Messzeitpunkte. Der Anteil eGFP positiver Zellen unter den transduzierten Raji-Zellen nimmt im zeitlichen Verlauf von 90,3%, gemessen am Tag 2 nach Transduktion auf 73,1%, gemessen am Tag 8 ab, und reduziert sich damit auf ca. 81% der maximalen Transgenexpression. Die Transgenexpression durch die B-CLL-Zellen bleibt im gleichen Zeitfenster nahezu konstant, am Tag 2 nach Transduktion wurden 43,2% eGFP positive Zellen registriert, am Tag 8 noch 42,6%.

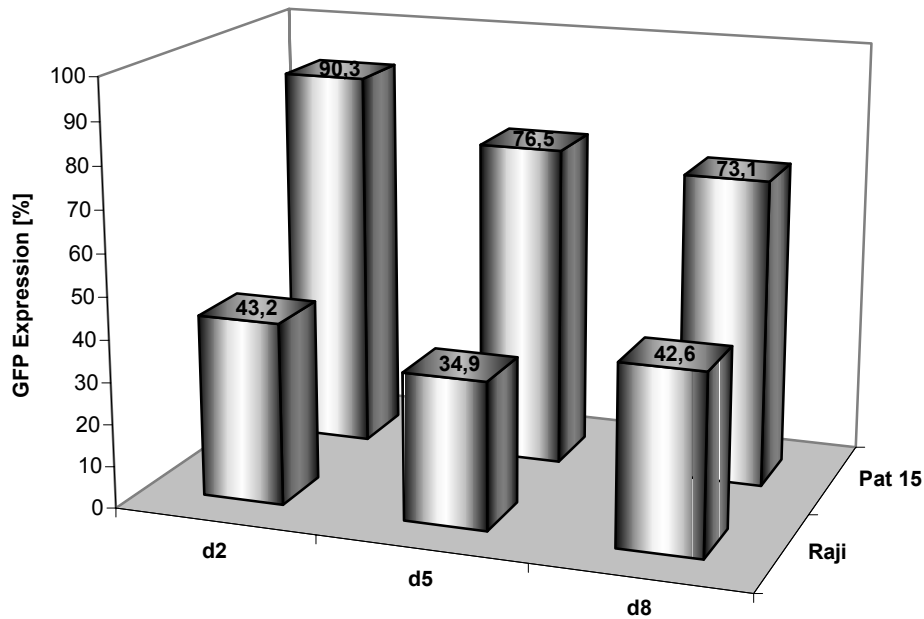


Abb. 5.6 eGFP Expression nach Transduktion mit EBV-Genvektorüberstand im zeitlichen Verlauf. 5×10^4 Raji Zellen (vordere Reihe) bzw. 5×10^5 B-CLL-Zellen (hintere Reihe) wurden mit $50\mu\text{l}$ Überstand (p1933) inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transduktion durchflusszytometrisch hinsichtlich der eGFP Expression analysiert.

5.1.7 Annexin Bindung nach Transduktion mit EBV-Genvektoren

Zur Detektion möglicher zytopathischer Effekte wurde nach Inkubation primärer B-CLL-Zellen mit infektiösem Überstand parallel zum zeitlichen Verlauf der Transgenexpression durchflußzytometrisch die Bindung von Annexin-V-Fitc bestimmt. Wie aus Abb. 5.7 am Beispiel primärer B-CLL-Zellen eines untersuchten Patienten (Patient 12) ersichtlich, nimmt die spontane Annexin-V Bindung von nicht-transduzierten B-CLL-Zellen unter in vitro Kulturbedingungen stetig und annähernd linear zu. Nach elf Tagen (Tag 8 nach Transduktion) waren bereits 22,6% der Zellen apoptotisch. B-CLL-Zellen des selben Patienten, die am dritten Tag nach Aufreinigung mit Überständen aus der Verpackung von p1933 infiziert wurden, zeigten 2 Tage später einen im Vergleich zu den nicht-transduzierten Zellen um 7,3% höheren Anteil Annexin bindender Zellen (vgl Abb. 5.7). Bis zum Tag 8 nach Transduktion war dieser Anteil auf 9,2% angestiegen. Relativ zum Anteil eGFP exprimierender Zellen lag der Anteil Annexin-V bindender Zellen nach Transduktion zwischen 16,9 und 21,6 % (vgl Abb. 5.6).

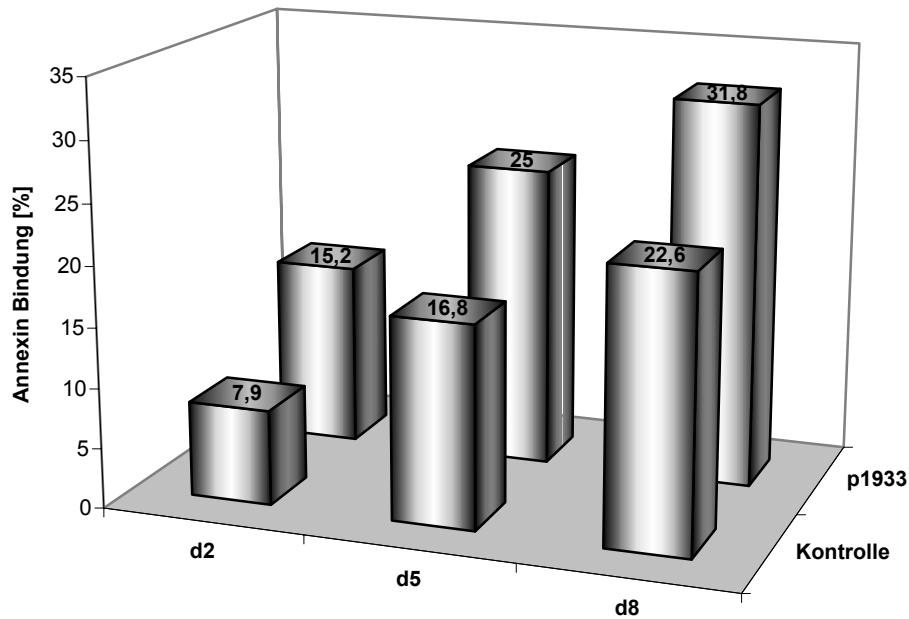


Abb. 5.7 Annexin V Bindung nach Transduktion mit EBV-Genvektorüberstand im zeitlichen Verlauf. 5×10^5 B-CLL-Zellen wurden mit 50 μ l Überstand (p1933) (hintere Reihe) oder 50 μ l Medium (vordere Reihe) inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transduktion durchflusszytometrisch hinsichtlich der Annexin-V Bindung analysiert.

5.1.8 Transduktion von CD40L-Feeder stimulierten B-CLL-Zellen

Zur Klärung der Frage, ob CD40-Stimulation die Suszeptibilität gegenüber Gentransfer mit EBV-Genvektoren erhöht, wurden in einem Parallelansatz sowohl CD40-L-Feeder stimulierte- (Abschnitt 4.5) als auch naive B-CLL-Zellen mit Überständen aus der Verpackung des Genvektorplasmids p1933 transduziert. Nach Transduktion von unstimulierten B-CLL-Zellen wurde im Mittel eine Transgenexpression in $45,0 \pm 17,5\%$ der Zellen detektiert, in CD40-L-stimulierten Zellen dagegen nur in $30,8 \pm 13,4\%$ der Zellen ($p=0,09$ im T-Test für gepaarte Stichproben).

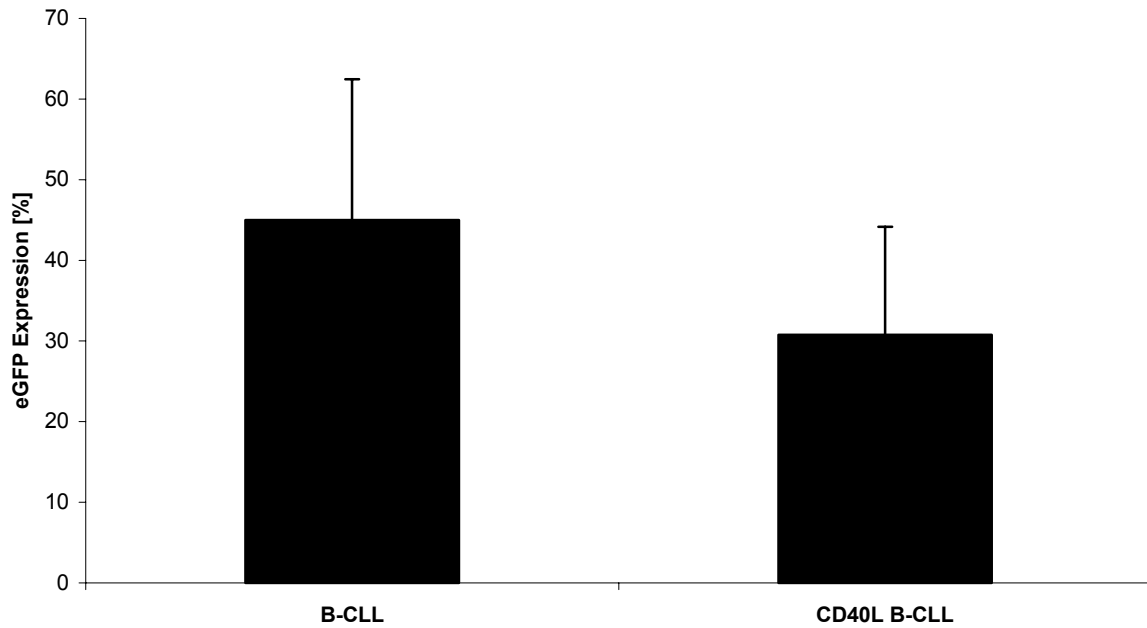


Abb. 5.8 Durchflußzytometrische Erfassung der eGFP Expression nach Transduktion naiver und CD40-L-stimulierter B-CLL-Zellen. Jeweils 5×10^5 naive und CD40-stimulierte B-CLL-Zellen wurden mit 100 μ l Überstand (p1933) inkubiert und 48Std. nach Transduktion durchflußzytometrisch hinsichtlich ihrer eGFP Expression analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert und der Standardfehler aus drei Experimenten.

5.2 EBV-abgeleitete Genvektoren, die für CD40-Ligand kodieren

5.2.1 Klonierung CD40-Ligand kodierender Genvektorplasmide

In einem zweiten Schritt sollte der Gentransfer eines membranständigen Moleküls mittels EBV-abgeleiteter Genvektoren realisiert werden. Dazu wurde der murine CD40-Ligand in das EBV Reporterplasmid p588 sowie das TR-deletierte Plasmid p562 kloniert (Abschnitt 3.3). Die Expression sowie die immunstimulierende Kapazität des murinen Liganden wurde nach Transfektion der Plasmide in HeLa-Zellen durch Feederstimulation von B-CLL-Zellen verifiziert.

5.2.2 Transduktion, Neutralisation und Genvektoren mit deletierten TR-Sequenzen

Die Generierung von Genvektorüberständen durch Verpackung der Reporterplasmide p588mCD40L und p562mCD40L erfolgt analog den eGFP-kodierenden Konstrukten durch Transfektion des EBV Genvektors in die Helferzelllinie TR-2/293 (Abb. 5.1).

Neben der Zelllinie Raji wurden B-CLL-Zellen von vier verschiedenen Patienten mit jeweils 200µl Genvektorüberstand inkubiert. Zur Neutralisation wurden jeweils 200µl Überstand mit 20µg des monoklonalen Antikörpers 72A1 inkubiert (Abschnitt 4.6.4). Im Parallelansatz erfolgte die Transduktion mit dem Überstand des TR-deletierten Konstruktes p562mCD40L. Wie in der Tabelle 5.3 dargestellt wurde nach Transduktion der Zelllinie Raji nur in $4,0 \pm 1,5\%$ der Zellen eine Expression von mCD40L detektiert bei einer MFIR von $1,8 \pm 0,15$. Neutralisationsexperimente mit dem monoklonalen Antikörper 72A1 und Transduktion mit TR-deletierten Konstrukten ergaben keine ersichtliche Reduktion der erzielten Transgenexpression, so dass von einer prozentual sehr geringen oder keiner nennenswerten Transgenexpression ausgegangen werden muss (auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet). Durch Transduktion von B-CLL-Zellen der Patienten 4 bis 7 wurde eine mittlere Transgenexpressionsrate von $13,9 \pm 3,5\%$ erzielt. Durch Neutralisation mit dem monoklonalen Antikörper 72A1 reduzierte sich diese Rate auf $7,7 \pm 2,1\%$ ($p=0,046$). Nach Inkubation der Proben von Patient 5 bis 7 mit Überstand des deletierten Reporterplasmids p562mCD40L reduzierte sich die mittlere Transduktionsrate von $11,0 \pm 2,7\%$ auf $5,6 \pm 1,9\%$ ($p=0,03$) (Abb. 5.9).

| <i>Zelllinie/Patient</i> | <i>Positiv</i> | <i>MFIR</i> |
|--------------------------|----------------|-------------|
| Raji | 4,0±1,5% | 1,8±0,15 |
| 4 | 22,7% | 2,6 |
| 5 | 7,9% | 1,7 |
| 6 | 8,6% | n.e. |
| 7 | 16,4% | 2,5 |

Tab. 5.3 Durchflußzytometrische Erfassung der Transgenexpression nach Transduktion von Raji-Zellen und Patientenproben mit mCD40-Ligand kodierenden Genvektorüberständen. Die Überstände wurden durch Transfektion der Genvektorplasmide p588mCD40L in die Helferzelllinie TR-2/293 gewonnen. Die Tabelle zeigt die durchflußzytometrisch detektierten Ergebnisse nach Transduktion mit dem Genvektorüberstand p588mCD40L. N.e. nicht erhoben.

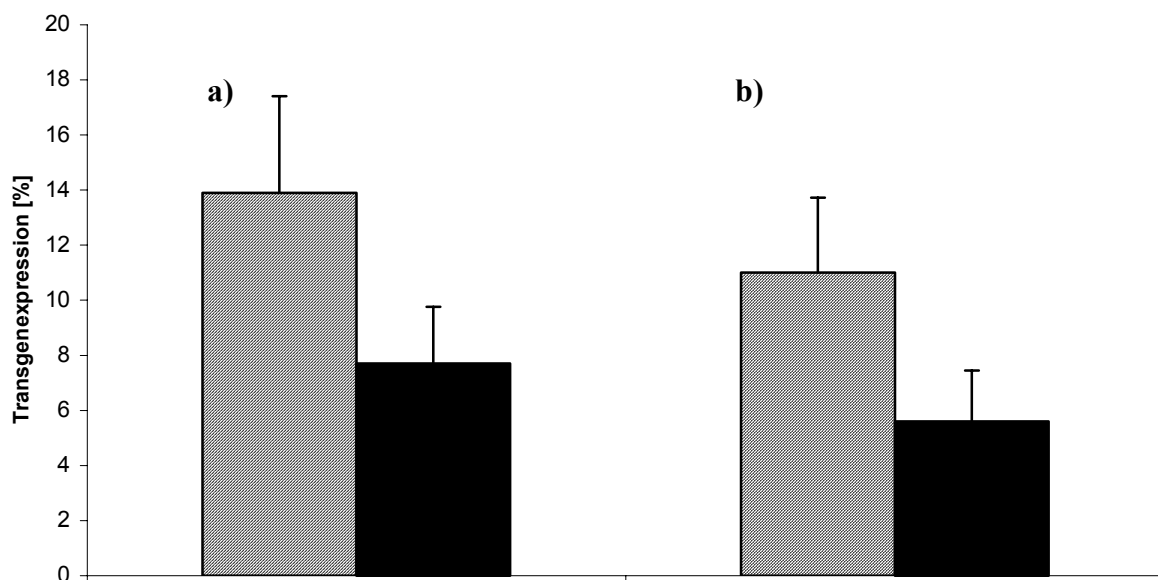


Abb. 5.9 a) Neutralisation des infektiösen Überstandes p588mCD40L mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers. Die Transduktion primärer B-CLL-Zellen mit infektiösen (p588mCD40L, schraffiert) und neutralisierten (p588mCD40L + mAB72A1, schwarz) wurde durchflußzytometrisch ausgewertet. Jeweils 200µl infektiöser Überstand wurden mit 20µg des monoklonalen Antikörpers ATCC 72A1 neutralisiert. Dargestellt ist der Mittelwert und der Standardfehler für die Patientenproben 4 bis 7. **b) Verpackung des TR-deletierten Reporterplasmides p562mCD40L.** Die Transduktion der Patientenproben 5 bis 7 mit jeweils 200µl infektiösen (schraffiert) bzw. nicht infektiösen Überstandes aus der Verpackung TR-deletierter Plasmide (p562mCD40L, schwarz) wurde durchflußzytometrisch erfasst.

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und kritische Würdigung

Ein entscheidendes Qualitätsmerkmal viraler Genvektoren ist der infektiöse Titer. Aufgrund der biologischen Eigenschaften von EBV lassen sich EBV-abgeleitete Genvektoren im Gegensatz zu den Vektorsystemen lytischer Herpesviren nur in vergleichsweise niedrigen Titern generieren. Voraussetzung für eine systematische Untersuchung der Gentransfereffizienz in primären B-CLL-Zellen ist deshalb ein standardisiertes Protokoll zur Generierung einer ausreichenden Konzentration an Genvektorpartikel. Ein hoher infektiöser Titer des Genvektorüberstandes erlaubt die Transduktion von B-CLL-Zellkulturen mit höherer Zelldichte und dies wirkt sich günstig auf die Viabilität der Zielzellen in Kultur aus und erleichtert die Detektion transduzierter Zellen. Durch Optimierung der Vektorverpackung konnte der bisher beschriebene infektiöse Titer des Helfervirus-freien Verpackungssystem um den Faktor 300 gesteigert werden. Die Bestimmung des infektiösen Titers erfolgte durchflusszytometrisch nach Transduktion von Raji-Zellen mit eGFP kodierenden Genvektoren. Durch einen Zentrifugationsschritt mit anschließender Volumenreduktion konnte der infektiöse Überstand um den Faktor 10 konzentriert werden, durch Kotransfektion des BALF-4 Expressionsplasmides gelang eine weitere Titersteigerung um den Faktor 5. Unklar ist derzeit warum BALF-4 für die Virionverpackung limitierend ist. Es ist eines der in der späten Phase der Virusreplikation am stärksten exprimierten viralen Proteine, für das eine Kernmembranlokalisation nachgewiesen werden konnte (Gong & Kieff, 1990). Insgesamt wurden so infektiöse Titer bis zu 2×10^6 infektiöse Partikel/ml erzielt.

Wildtyp-Epstein-Barr-Virus hat einen natürlichen Tropismus für B-Lymphozyten. Ein Epstein-Barr-Virus abgeleitetes Genvektorsystem sollte sich deshalb auch für den Gentransfer in B-CLL-Zellen eignen. Als wesentlicher Rezeptor für das Virus wurde der zellständige Rezeptor CD21 identifiziert. Das Virus bindet über den N-Terminus des Oberflächenglykoproteins BLLF-1 (gp350/220) an den Rezeptor CD21 (Nemerow *et al.*, 1989; Nemerow *et al.*, 1987) und vermittelt dabei nicht nur die Adsorption, sondern auch die Endozytose des Virus in B-Lymphozyten (Tanner *et al.*, 1987). Die Untersuchung dreier Patientenproben bestätigte die Expression des als Rezeptor für eine EBV-Infektion identifizierten Moleküls CD21 durch B-CLL-Zellen. Die Existenz weiterer Liganden, die einen Viruseintritt in B-Lymphozyten vermitteln gilt allerdings als wahrscheinlich, wie

Untersuchungen mit BLLF-1 Deletionsmutanten belegen (Janz *et al.*, 2000).

Der Gentransfer mittels der generierten Überstände aus p1933 bzw. der fehlende Gentransfer mittels der Überstände aus p2122, sowie die Neutralisation durch einen monoklonalen Antikörper wurden zunächst mikroskopisch und durchflusszytometrisch in Raji Zellen demonstriert. Die Auswertung der Transduktion primärer CLL-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Morphologisch zeichnen sich B-CLL-Zellen durch ein relativ großes Kern-Zytoplasmaverhältnis aus, möglicherweise gelang deshalb der mikroskopische eGFP Nachweis nur unbefriedigend. Unter Verwendung niedriger MOIs wurden in den B-Zell abgeleiteten Lymphomzelllinien Raji, Ramos und MEC-1 mittlere Transduktionsraten zwischen 30 und 62% erzielt. Die Zelllinie MEC-1 entstammt einem Patienten mit diagnostizierter B-CLL und weist deshalb phänotypisch die meisten Gemeinsamkeiten mit primären B-CLL-Zellen auf. Die erzielte Transduktionsrate in B-CLL-Zellen lag zwischen 13,8 und 83,4% und war damit individuell hoch variabel. Gemessen an der MFIR war die erzielte Transgenexpression in der Zelllinie Raji am größten. Raji Zellen tragen ein Wildtyp-EBV-Genom, möglicherweise verstärken dessen Elemente die Expression des vom Genvektor kodierten Transgens. Für EBNA-1 wurde eine transkriptionsverstärkende Wirkung auf oriP tragende Expressionsvektoren beschrieben (Kaneda *et al.*, 2000).

Wie sich in der Zeitkinetik nach Transduktion unstimulierter B-CLL-Zellen zeigt, bleibt die Transgenexpression über den Beobachtungszeitraum von acht Tagen nahezu konstant. Im gleichen Zeitraum reduziert sich die Transgenexpression in Raji Zellen um ca. 10%. Da Raji Zellen *in vitro* proliferieren, müssen sie den Genvektor nach Zellteilung an ihre Tochterzellen weitergeben, um den Anteil eGFP positiver Zellen aufrechtzuerhalten. Nach Transduktion mit EBNA-1 negativen, aber *oriP* tragenden Genvektorplasmiden ermöglicht wahrscheinlich eine Expression des endogenen EBV-Wildtyp-Genoms in Raji-Zellen eine Retention und Segregation dieser Genvektoren.

Aufgrund ihrer Abstammung müssen die von Herpesviren abgeleiteten Vektoren als potentiell pathogen betrachtet werden. Eine Zytolyse der Zielzellen durch den Genvektor oder durch virale Proteine, die möglicherweise im Genvektor enthalten sind, würde eine therapeutische Anwendung dieser Vektoren stark einschränken. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin und erfasst dadurch sowohl apoptotische, als auch nekrotische Zellen. Nach Transduktion mit den Genvektorüberständen war die Rate Annexin bindender Zellen um 9,2% erhöht. Sollte es sich

dabei um eine spezifische Apoptoseinduktion durch infektiöse Partikel handeln, dann lässt sich bei einer Transduktionsrate von 42,6% für die Apoptoseinduktion ein Maximalwert von 21,6% interpolieren. Kontrollexperimente mit aufgereinigten, konzentrierten Genvektorüberständen würde eine Abschätzung unspezifischer Effekte durch Übertragung von Debris aus dem Verpackungsprotokoll erlauben. Etablierte Methoden für eine effiziente Aufreinigung der Genvektorüberstände stehen derzeit jedoch nicht zur Verfügung. Aufgrund der biologischen Eigenschaften des Epstein-Barr-Virus und der Möglichkeit der helfervirusfreien Generierung der Genvektorüberstände gilt die Möglichkeit einer lytischen Infektion als unwahrscheinlich. Weiterführende Experimente, um die Rekombinationshäufigkeit des Genvektors mit dem deletierten Genom der Verpackungszelllinie abzuschätzen, sind notwendig.

Für den adenoviralen Gentransfer in primäre B-CLL-Zellen konnte gezeigt werden, dass durch Prästimulation der Zellen über das Rezeptormolekül CD40 die Effizienz des Gentransfers deutlich steigt (Cantwell *et al.*, 1996). Die Effizienz des Gentransfers mit EBV abgeleiteter Vektorsysteme scheint sich dagegen zu verringern. Ein signifikantes Ergebnis konnte jedoch mit drei untersuchten Patientenproben nicht erzielt werden. Die durch CD40-Stimulation getriggerten Effekte in niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen sind vielfältig, so beobachtet man neben morphologischen und immunphänotypischen Veränderungen auch einen Einfluss auf die Zellzyklusregulation in hämatopoetischen Zellen (Teoh *et al.*, 2000). Die Kokultivierung primärer B-CLL-Zellen mit CD40-Ligand transgenen Feederzellen führt zu einer deutlichen Vergrößerung des Anteils an Metaphasen (Buhmann *et al.*, 2002). Für die episomale Persistenz der Epstein-Barr viralen Genvektorplasmide in proliferierenden Zellen ist eine Aktivierung des Ursprungs der latenten Replikation *oriP* durch EBNA-1 notwendig. Den verwendeten Epstein-Barr viralen Genvektorplasmiden fehlt EBNA-1. Möglicherweise ist eine hohe Transduktionsrate deshalb nur in nicht-proliferierenden Zellen wie primären B-CLL-Zellen zu erzielen. Ein proliferativer Stimulus wie ein CD40-Ligand Feeder würde folglich die Transduktionseffizienz reduzieren.

In weiteren Experimenten konnte die Transduktion von B-CLL-Zellen mit CD40-Ligand kodierender Genvektorüberstände demonstriert werden. Die Wahl des murinen CD40-Liganden bietet gegenüber dem humanen Liganden den Vorteil, dass eine endogene Aufregulation des humanen Moleküls durch die B-CLL-Zellen die Transduktionsdaten nicht verfälschen kann. Ausserdem wurde berichtet dass eine Oberflächenexpression des humanen

Liganden nach Transfektion mit rekombinanten Adenoviren nicht zu erzielen war (Kato *et al.*, 1998). Zum Vergleich der biologischen Funktion beider Liganden wurden B-CLL-Zellen mit Feederzellen stimuliert die entweder den murinen oder den humanen Liganden exprimieren. Im direkten Vergleich konnte kein Unterschied hinsichtlich der immunphänotypischen Veränderungen durch Feederstimulation detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Expression des murinen CD40-Liganden in Raji Zellen gelang nicht oder nur in einer sehr kleinen Zellfraktion. Die erzielten Transgenexpressionsraten in den Patientenproben waren deutlich niedriger als nach Transduktion mit den eGFP-kodierenden Genvektorüberständen. Die Neutralisation mit dem monoklonalen Antikörper 72A1 war unvollständig und reduzierte die Transgenexpression um 46,5%. Die falsch-positiv Rate gemessen anhand der Ligandenexpression nach Inkubation mit dem nicht-infektiösen Überstand p562mCD40L betrug ca. 51%. Es ist deshalb davon auszugehen, dass ein erheblicher Teil der detektierten Transgenexpression auf einen Molekültransfer mit dem Überstand aus der Verpackungszelllinie beruht bzw. durch unspezifische Bindung des Antikörpers als falsch positiv im Durchflusszytometer detektiert wird. Zu etablierende Aufreinigungsmethoden könnten dazu beitragen die Übertragung von Debris und Membranfragmenten der CD40L exprimierenden Verpackungszellen zu reduzieren. Nicht auszuschließen sind auch eine rasche Herabregulierung, eine Abspaltung, oder eine Maskierung des transgenen Liganden durch lösliche Faktoren nach Transduktion. CD40-Ligand ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor Liganden Superfamilie, Liganden dieser Familie sind involviert in die Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Gruss & Dower, 1995), so dass eine selektive CD40-Ligand vermittelte Apoptose von Bystander Zellen nicht auszuschließen ist, ein Effekt, der möglicherweise bei Raji Zellen besonders zum tragen kommt. Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in Raji-Zellen vermittelt durch CD40L wurden allerdings nicht durchgeführt.

Letztlich gilt es die biologische Funktion des Transgens in einem System zu zeigen, dass sich an der geplanten klinischen Anwendung orientiert. Ein geeignetes Experiment wäre deshalb die Detektion immunphänotypischer Veränderungen auf transgenen B-CLL-Zellen oder Bystander Zellen ähnlich der Veränderungen nach Feederstimulation.

6.2 Diskussion der Methodik und Fehleranalyse

Die durch Verwendung von EBV abgeleiteter Genvektoren erzielte Gentransfereffizienz kann mit den erhobenen Daten nur ungenau abgeschätzt werden. Die experimentelle Planung spiegelt die stark limitierte Verfügbarkeit von frischen Patientenproben und die kleinen erzielten Volumina durch das verwendete Verpackungsprotokoll wieder. Zur Reduktion systematischer und zufälliger- bzw. methodischer Fehler müssten mehrere Wiederholungen der Experimente einer statistischen Auswertung zugeführt werden. Aufgrund der statistischen Mängel reflektieren die detektierten Unterschiede in den erzielten Transduktionsraten für die einzelnen Patientenproben nicht nur individuelle Unterschiede sondern auch eine unterschiedliche Qualität der verwendeten Genvektorüberstände sowie einen nicht statistisch erfassten nicht systematischen Fehler wieder. Gemessen an dem in Raji-Zellen erzielten infektiösen Titer waren die qualitativen Schwankungen der verwendeten Genvektorüberstände nach Optimierung des Verpackungsprotokolles jedoch gering (Daten nicht gezeigt). In mehreren Fällen konnte auch gezeigt werden, dass die mit dem Genvektorüberstand aus einer Verpackung erzielten Transduktionsergebnisse reproduzierbar sind.

Tabelle 6.1 zeigt verschiedene mögliche Ursachen einer überschätzten Gentransferrate bzw. eines nicht-viralen Gentransfers. Die Neutralisation der Genvektorüberstände mit dem monoklonalen Antikörper 72A1 und die Überstandgenerierung mit den TR-deletierten Genvektoren erlauben eine vorsichtige Abschätzung der echten EBV-viralen Gentransferrate, wenn auch unspezifische Effekte oder ein nicht-viraler Transfer von Genvektorplasmiden oder eGFP Molekülen nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden können. Eigene Untersuchungen mit wildtyp-Epstein-Barr-Virus haben gezeigt, dass sich das Fluoreszenzverhalten bei durchflusszytometrischen Analysen von Raji-Zellen durch Infektion nur geringfügig verändert. In den Zelllinien lässt sich die eGFP Expression auch im Fluoreszenzmikroskop demonstrieren.

| <i>Mechanismen der Pseudoinfektion</i> | <i>Beispiel</i> |
|--|--|
| Unspezifische zelluläre Effekte | Veränderung der Autofluoreszenz |
| Nicht-viraler Molekültransfer | Transfer von sezerniertem bzw. zytosolischem GFP |
| Nicht-viraler Transfer von plasmidischer DNA | Transfektion oder virusvermittelter Transfer des Genvektorplasmids |

Tab. 6.1 Mögliche Ursachen einer Überschätzung der Transgenexpression nach Transduktion mit Genvektorüberständen.

Das auf der Hülle von EBV-Virione am stärksten exprimierte Glykoprotein ist gp350, welches als Ligand für den Rezeptor CD21 fungiert. Gegen gp350 richtet sich der neutralisierende, monoklonale Antikörper 72A1 (Hoffman *et al.*, 1980). Er bindet an ein Epitop in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle und verhindert so die Infektion durch Epstein-Barr Viren. Durch Neutralisation des GFP-kodierenden Genvektorüberstandes reduziert sich die detektierte Transgenexpression in den untersuchten Zelllinien sowie den Patientenproben reproduzierbar auf unter 5% der transduzierten Zellfraktion. Die Existenz weiterer Rezeptoren neben CD21, die eine EBV-Infektion vermitteln können gilt als wahrscheinlich (s.o.), und erklärt eine verbleibende Resttransduktion nach Antikörperzugabe im Sättigungsbereich.

Bei der Überstandgewinnung mittels dem TR-deletierten Genvektorplasmids p2122 wird nach dem gleichen Protokoll verfahren, die gleiche Menge an Genvektor-DNA eingesetzt und die gleiche Verpackungszelllinie benutzt wie zur Generierung des infektiösen Überstandes mit dem TR-positiven Plasmid p1933. Das durch den Genvektor p2122 kodierte eGFP wird wie auch bei der Verpackung des Genvektorplasmides p1933 in der Verpackungszelllinie exprimiert. Das Genvektorgenom wird jedoch nicht in infektiöse Partikel verpackt. In der Zelllinie Raji reduziert sich die Transgenexpression statistisch signifikant von 61,5 auf 3,6%, in den untersuchten Patientenproben ebenfalls signifikant von 39,2% im Mittel auf 5,1%. Ein fälschlich gemessener nicht-viraler Transfer des löslichen eGFP Proteins oder eGFP kodierender plasmidischer DNA in den Patientenproben kann deshalb als kleiner 13% geschätzt werden.

6.3 Diskussion alternativer Genvektorsysteme im Kontext der Literatur

Voraussetzung für die Herstellung einer transgenen Tumorzellvakzine ist die Verfügbarkeit eines effizienten und sicheren Gentransfersystems. Die unbefriedigende Effizienz derzeit verfügbarer Gentransfersysteme stellt heute eine wesentliche Hürde für die Entwicklung genterapeutischer Therapieansätze bei der Behandlung hämatologischer Neoplasien dar. Der Gentransfer in B-Lymphozyten und deren maligne Korrelate mittels nicht-viraler Methoden ist bisher jedoch nur mit extrem geringer Effizienz möglich. Bei der Elektroporation sollen Perturbationen der Zellmembran bzw. Porenbildungen unter der Entladung eines elektrischen Feldes den Eintritt von exogener DNA in die Zielzelle ermöglichen. Der erfolgreiche Gentransfer mit dieser Methode in B-Lymphozyten und primären B-CLL-Zellen wurde 1990 erstmals publiziert (Buschle *et al.*, 1990). Durch Optimierung der Methode konnte eine Transfereffizienz von 5 bis 10% erzielt werden, allerdings gelang der Gentransfer in B-CLL-Zellen nur nach vorheriger Stimulation mit TPA, einem Phorbolster, das u.a. eine Zellzyklusprogression induziert (Drexler *et al.*, 1987).

Höhere Transfereffizienzen erhoffte man sich durch die Verwendung viraler Genvektoren. Zu den viralen Vektorsystemen, die seit mehreren Jahren hinsichtlich ihrer klinischen Eignung für den Gentransfer in B-CLL-Zellen weiterentwickelt wurden, zählen Adenoviren, Herpesviren, und Adeno-Assoziiertes Virus (AAV). Aufgrund einer hohen Transduktionseffizienz lentiviraler Vektoren in Leukämie-Zelllinien und Lymphozytenpräparationen aus Blut (Bai *et al.*, 2003), (Bovia *et al.*, 2003) wird eine Eignung für den Gentransfer in B-CLL-Zellen vermutet. Systematische Untersuchungen zum retroviralen Gentransfer in B-CLL-Zellen konnten nicht recherchiert werden. Wichtige Kriterien für die klinische Eignung eines viralen Genvektorsystems sind neben der Effizienz des erzielten Gentransfers u.a. auch der Herstellungsaufwand und seine Sicherheitsmerkmale. Klinische Studien zur Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie wurden bisher nur mit adenoviralen Genvektoren durchgeführt (Wierda *et al.*, 2000). Tabelle 6.2 fasst die biologischen Eigenschaften der aufgeführten viralen Genvektorsysteme zusammen.

| | t | | | Zellen | |
|--------------------|--------|-----------|---------------------------------------|------------------------------|-----|
| AAV | gering | 4,7kb | nicht in Abwesenheit des AAV rep Gens | abhängig von Zellstimulation | von |
| Adenoviren | gering | 7,5kb | nein | abhängig von Zellstimulation | von |
| Retroviren | gering | 10kb | zufällig | unbekannt | |
| Herpesviren | gering | 140-160kb | nein | hoch | |
| EBV | hoch | 140-160kb | nein | möglicherweise hoch | |

Tab. 6.2 Eigenschaften potentieller und verwendeter viraler Genvektoren für den Gentransfer in B-CLL-Zellen

Das Adeno-Assoziierte Virus ist ein einzelsträngiges, nicht humanpathogenes DNA Virus, welches einen Helfervirus für seine Replikation benötigt. AAV Genvektorüberstände können mittlerweile frei von Helferviren generiert werden und zu hohen Titern aufgereinigt werden (Grimm *et al.*, 1998) (Xiao *et al.*, 1998). Während das wildtyp AAV spezifisch ins Genom von Chromosom 19 integriert bildet das rekombinante AAV überwiegend episomale Konkatomere, eine unspezifische Integration erfolgt mit sehr geringer Frequenz. Aufgrund der seltenen Integration von rekombinantem AAV, und fehlender viraler Produkte, die als Werkzeug für eine genomische Integration dienen können, wird das Risiko einer malignen Transformation durch Insertionsmutagenese durch rekombinantes AAV im Vergleich zu Retroviren als sehr gering eingestuft (Tenenbaum *et al.*, 2003). Die Kapazität für das zu kodierende Transgen ist bei AAV Genvektoren mit 4,7kb sehr gering. Eine hohe Transduktionseffizienz wurde durch Transduktion von B-CLL-Zellen mit AAV-Genvektoren erzielt (Wendtner *et al.*, 2002), allerdings war nach ex vivo Transduktion eine Stimulation der CLL-Zellen auf CD40-Ligand exprimierender Feederzellen notwendig. Durch Einfügen von Peptidliganden in das Viruskapsid ist es möglich den Tropismus von AAV-Genvektoren gezielt zu verändern (Girod *et al.*, 1999). Durch ein spezielles Screeningverfahren konnten Kapsidmutanten mit einer sehr hohen Gentransfereffizienz für B-CLL-Zellen aus einer Bibliothek von Viruskapsiden mit zufälligen Peptidsequenzen an einer Position selektiert werden (Perabo *et al.*, 2003).

Aus der Familie der Retroviren finden v.a. die C-Typ-Retroviren der Säuger und Vögel sowie Lentiviren Verwendung für die Entwicklung von Genvektoren. Retrovirale Genvektorstocks können frei von replikationskompetenten Viren hergestellt werden und wurden bereits erfolgreich zur Therapie von SCID-X1 (severe combined immunodeficiency), einer genetisch

bedingten Immunschwäche eingesetzt. Den Patienten wurden dabei nach korrektivem *ex vivo* Gentransfer autologe hämatopoietische Vorläuferzellen reinfundiert. Unerwartet entwickelten die beiden jüngsten Patienten jedoch aufgrund einer Insertion des Genvektors in der Nähe eines Proto-Onkogens eine T-Zell Leukämie (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Höhere Transduktionseffizienzen für B-CLL-Zellen erwartet man durch Verwendung lentiviraler Vektorsysteme, welche aufgrund spezifischer nukleärer Importmechanismen (Zennou *et al.*, 2000) fähig zur Transduktion nicht proliferierender Zellen sind. Durch Entwicklung neuerer Vektorgenerationen wird versucht das Risiko einer Freisetzung replikationsfähiger Rekombinanten zu minimieren. Ziel ist eine möglichst vollständige Elimination nicht essentieller viraler Genabschnitte aus den Verpackungskonstrukten bzw. homologer Sequenzen aus den Genvektoren (Schweizer *et al.*, 2001). Die beträchtliche Pathogenität der den Vektorsystemen zugrunde liegenden Viren, und das derzeit ungelöste Problem der Insertionsmutagenese erschweren die zukünftige Verwendung lentiviraler Vektoren in klinischen Studien.

Ähnlich wie die getesteten EBV-Genvektoren zeichnen sich Herpes simplex Virus abgeleitete Genvektoren durch eine hohe Kapazität für zu verpackende Transgene und eine potentielle episodale Genvektorpersistenz aus. Aufgrund der stark toxischen Eigenschaften der viralen Genprodukte und ungeklärter Sicherheitsfragen finden HSV Genvektoren bisher keine Verwendung in klinischen Studien. Helfervirusfreie HSV Amplikon Genvektoren zeigten *in vitro* eine sehr hohe Gentransfereffizienz nach Transduktion von B-CLL-Zellen (Tolba *et al.*, 2001). Durch HSV Amplikon vermittelten Gentransfer von LIGHT, einem Mitglied der TNF-Superfamilie konnte wie auch durch Transfer von CD40-Ligand in B-CLL-Zellen eine autologe zytotoxische T-Zell Reaktion *in vitro* nachgewiesen werden (Tolba *et al.*, 2002).

Eines der für klinische Anwendungen heute am weitesten verbreiteten viralen Vektorsysteme sind rekombinante Adenoviren. Diese Vektoren zeichnen sich durch Deletion von einzelnen oder mehreren Genen, die in der frühen Phase nach Infektion exprimiert werden, sogenannter "immediate-early genes", aus. Eine Replikation in den Zielzellen soll dadurch weitgehend unterdrückt werden (Graham & Prevec, 1992). Aufgrund ihrer Fähigkeit, nicht-replizierende Zellen zu infizieren und der Möglichkeit, diese Vektoren in hohen Titern zu generieren, war ihre Applikation für den Gentransfer in B-CLL-Zellen naheliegend. Durch die Verwendung sehr hoher Partikelzahlen eines E1/E3 deletierten Vektors (1000 infektiöse Partikel/Zelle) konnte für 8 aus 10 Patientenproben im Mittel eine Transduktion von 21% der Zellen erzielt

werden (Cantwell *et al.*, 1996). Für die Transduktion mit Adenovirus war jedoch eine Prästimulation der CLL-Zellen über CD40 erforderlich. Es konnte gezeigt werden, dass unstimulierte CLL-Zellen die für die Virusinternalisation in die Zelle notwendigen alpha-V-Integrine kaum exprimieren. Durch CD40-Stimulation kommt es zu einer Aufregulation dieser Integrine; in der Folge steigt die Empfänglichkeit für eine adenovirale Infektion (Wickham *et al.*, 1993). Im Gegensatz zur Transduktion von B-Lymphozyten wurde nach Transduktion von B-CLL-Zellen eine erhebliche Zytotoxizität für verschiedene adenovirale Deletionsmutanten beobachtet (Medina *et al.*, 1999). Neben direkter zytotoxischer und apoptotischer Effekte vermittelt durch adenovirale Genprodukte vermutet man, dass der maligne Genotyp von CLL die adenoviralen Deletionsmutanten komplementiert und so möglicherweise zu einer produktiven, lytischen Infektion führt.

Eine charakteristische Eigenschaft des Epstein-Barr Virus besteht in seiner Fähigkeit, ruhende B-Zellen zu immortalisieren. *In vitro* bewirkt eine EBV-Infektion die Umwandlung primärer B-Zellen zu lymphoblastoiden Zelllinien (LCL). LCL Zellen exprimieren die latenten viralen Proteine EBNA-(1-6) und LMP-(1-2) (Rogers *et al.*, 1992). Durch Induktion antiapoptotischer Gene in der latent infizierten Zelle stellt die Expression von LMP-1 für die Immortalisation möglicherweise einen notwendigen Schritt dar (Henderson *et al.*, 1991). B-CLL-Zellen lassen sich durch das Epstein-Barr Virus infizieren, gegenüber einer Immortalisation durch das transformierende Virus sind sie jedoch refraktär (Klein *et al.*, 1975; Rickinson *et al.*, 1982). So lässt sich nach Infektion zwar die Expression der viralen Proteine des EBNA Komplexes nachweisen, nicht jedoch von LMP-1. Eine blastoide Transformation unterbleibt. Erst durch Prästimulation mit Lymphokinen vor der Infektion gelingt die Umwandlung zu permanent proliferierenden B-CLL-Zelllinien (Wendel-Hansen *et al.*, 1994).

Die mit dem doppelsträngigen EBV-Vektorsystem erzielten Ergebnisse legen nahe, dass die Transduktionseffizienz möglicherweise unabhängig vom Replikationsapparat der Zielzellen ist und auf eine Stimulation der B-CLL-Zellen deshalb verzichtet werden kann. Mit den Helfervirus-freien Überständen Epstein-Barr Virus abgeleiteter Genvektoren wurde unter Verwendung sehr geringer Partikelzahlen ($MOI < 0,3$) in 11 Patientenproben im Mittel eine Transduktion von 33,5% der Zellen erzielt.

6.4 Ausblick für die klinische Applikation EBV-abgeleiteter Genvektoren

Das Epstein-Barr-Virus ist ein humanpathogenes und potentiell onkogenes Virus, ein wesentlicher Fortschritt für die Entwicklung eines klinisch-therapeutischen Vektorsystems war deshalb die Klonierung eines Helferplasmides, das eine Generierung Epstein-Barr-Virus abgeleiteter Genvektoren ohne Freisetzung von Helferviruspartikel erlaubt. Die verwendeten EBV-abgeleiteten Genvektoren wurden mittels einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie generiert. Anstelle eines Helfervirus enthält sie ein deletiertes, rekombinantes EBV-Plasmid, dem die zur Verpackung des Helfervirus notwendigen TR-Sequenzen fehlen. Diese Helferzelllinie erlaubt die Verpackung von rekombinanten Genvektorplasmiden, welche die Verpackungssignale TR und den Replikationsorigin oriLyt tragen. Sofern es nicht zur Rekombination zwischen Helferplasmid und Genvektorplasmid kommt, ist eine Freisetzung von Wildtyp-EBV unwahrscheinlich.

Infektiöse mini-EBV Vektoren basierend auf oriP, orilyt und den TR-Sequenzen wurden bereits *in vitro* untersucht. Dabei konnte ein korrekativer Gentransfers in lymphoblastoide Zellen eines an Fanconi Anämie der Gruppe C (FA-C) erkrankten Patienten (Banerjee *et al.*, 1995), sowie in B-Lymphoblasten eines an Typ 1 Diabetes erkrankten Patienten (Korrektur einer TAP-1 und -2 Defizienz) (Wang *et al.*, 1995) demonstriert werden. Ein klinischer Einsatz der verwendeten EBV-Amplicon Vektorsysteme verbietet sich jedoch aufgrund der Freisetzung replikationskompetenter Epstein-Barr-Viren durch die Helferzellen sowie aufgrund potentieller transaktivierender Effekte durch EBNA-1 auf das Zellwachstum. Die verwendete Verpackungszelllinie TR-2/293 trägt ein deletiertes EBV-Genom welches zwar die Enkapsidierung des Helfervirus verhindert, aber dennoch alle potentiell onkogenen EBV-Sequenzen enthält. Homologe Genabschnitte auf den Genvektorplasmiden begünstigen zudem Rekombinationsereignisse zwischen Genvektor und Helfervirus. Zukünftige Entwicklungen werden deshalb die Deletion dispensabler Genabschnitte des Helfervirus sowie des Genvektors zum Ziel haben. Möglicherweise gelingt es auch essentielle Genvektorsequenzen durch analoge Sequenzen, z.B. nicht-humaner Viren, zu ersetzen. Weitere Anstrengungen nicht nur zur Verbesserung der Effizienz sondern auch der Sicherheit des Gentransfers sind nötig um zukünftig einen klinischen Einsatz zu ermöglichen.

6.5 Ausblick für die Immuntherapie der chronisch lymphatischen Leukämie

Immuntherapeutische Ansätze zur Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie sind vielversprechend. Einerseits sind die Zellen des malignen Klons durch ihre Akkumulation im Blut in ständigem Kontakt mit Immuneffektorzellen, andererseits können B-CLL-Zellen nach Aktivierung selbst verschiedene Funktionen Antigen-präsentierender Zellen übernehmen. CD40-Ligand scheint für die Immuntherapie der chronischen lymphatischen Leukämie aufgrund seiner stimulatorischen Kapazität gegenüber dendritischen Zellen und B-CLL-Zellen ein besonders geeignetes Molekül zu sein. Durch die progrediente Akkumulation von B-CLL-Zellen im vaskulären Kompartiment mit fortschreitender Erkrankung lassen sich ausreichende Zahlen an B-CLL-Zellen für den Gentransfer unkompliziert durch Venipunktion gewinnen. Ergebnisse aus einer klinischen Phase I Studie mit *ex vivo* transduzierten B-CLL-Zellen sind vielversprechend. Die Mechanismen, die der beobachteten Reduktion der Tumorlast zugrunde liegen sind allerdings noch weitgehend unverstanden. Ob sich durch eine Vakzinierung mit autologen, CD40-Ligand transgenen B-CLL-Zellen eine ausreichende CLL-Zell spezifische zytotoxische und therapeutisch wirksame Immunreaktion generieren lässt ist allerdings noch unklar. Ebenfalls unklar ist inwieweit eine Downregulation von CD40-Ligand durch aktivierte T-Helfer Zellen eine kausale Rolle für die Ausbildung des B-CLL charakteristischen Immundefektes spielt, der möglicherweise einer Korrektur durch Gentherapie zugänglich ist. CD40-Ligand stellt nur eines mehrerer therapeutisch relevanter Gene für die B-CLL dar. Zukünftige Immuntherapien könnten sich synergistische Wirkungen mehrerer Zielgene zu Nutze machen, auch eine Kombination mit einer Vakzinierungsstrategie basierend auf spezifischen Tumorantigenen könnten weitere Fortschritte bringen.

7 Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie ist die häufigste Leukämie im Erwachsenenalter in den westlichen Ländern. Erkenntnisse der letzten Jahre haben das Spektrum verfügbarer Therapien deutlich erweitert, kurativ ist bisher nur die allogene Knochenmarkstransplantation. Im Blut der betroffenen Patienten treten die Zellen des malignen Klons in Kontakt mit autologen Immuneffektorzellen. Genterapeutische Strategien basierend auf dem Transfer immunstimulatorischer Moleküle eröffnen deshalb neue Perspektiven für die Therapie der B-CLL.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Eignung eines Helfervirus-freien EBV-Genvektorsystems für den Gentransfer in primäre B-CLL-Zellen beschrieben. Durch Optimierung der Vektorverpackung für ein eGFP kodierendes Plasmid konnte gezeigt werden, dass sich mit Hilfe einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie infektiöse Titer bis zu 2×10^6 infektiöse Partikel/ml generieren lassen. Das untersuchte Vektorsystem eignet sich für einen effizienten Gentransfer in primäre B-CLL-Zellen. Auf eine CD40L-Stimulation, wie sie zur Verbesserung der Transfereffizienz von Adenoviren zur Anwendung kommt, kann dabei verzichtet werden. Der Gentransfer lässt sich mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen CD21 weitgehend neutralisieren. In Kontrollexperimenten mit Überständen aus der Verpackung TR-deletierter Genvektorplasmide sinkt die Gentransferrate auf Werte nahe der Nachweisgrenze. Nach Verpackung des therapeutischen Moleküls CD40L sinkt die Transfereffizienz gegenüber dem eGFP kodierenden Genvektor und vermehrt unspezifische Effekte werden beobachtet.

Zu den charakteristischen Eigenschaften EBV abgeleiteter Genvektoren zählen ein Tropismus für B-Lymphozyten und eine grosse Verpackungskapazität, die den Transfer von Gensequenzen bis zu einer Grösse von 160 kb erlaubt. Als essentielle EBV-Elemente enthalten die Genvektoren nur die Verpackungssignale TR und den lytischen Replikationsorigin *oriLyt*. Zukünftige Entwicklungen des Vektorsystems haben zum Ziel das Risiko von Rekombinationsereignissen zu reduzieren, die zur Freisetzung replikationsfähiger Virusmutanten oder potentiell onkogener viraler Gene führen könnten.

8 Literaturverzeichnis

- Albert, M.L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, **392**, 86-9.
- Andersen, N.S., Larsen, J.K., Christiansen, J., Pedersen, L.B., Christophersen, N.S., Geisler, C.H. & Jurlander, J. (2000). Soluble CD40 ligand induces selective proliferation of lymphoma cells in primary mantle cell lymphoma cell cultures. *Blood*, **96**, 2219-25.
- Bai, Y., Soda, Y., Izawa, K., Tanabe, T., Kang, X., Tojo, A., Hoshino, H., Miyoshi, H., Asano, S. & Tani, K. (2003). Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector. *Gene Ther*, **10**, 1446-57.
- Banerjee, S., Livanos, E. & Vos, J.M. (1995). Therapeutic gene delivery in human B-lymphoblastoid cells by engineered non-transforming infectious Epstein-Barr virus. *Nat Med*, **1**, 1303-8.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F. & Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, **393**, 478-80.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbès, S. & Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, **48**, 198-206.
- Bovia, F., Salmon, P., Matthes, T., Kvell, K., Nguyen, T.H., Werner-Favre, C., Barnet, M., Nagy, M., Leuba, F., Arrighi, J.F., Piguët, V., Trono, D. & Zubler, R.H. (2003). Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood*, **101**, 1727-33. Epub 2002 Oct 24.
- Buhmann, R., Kurzeder, C., Rehklaue, J., Westhaus, D., Bursch, S., Hiddemann, W., Haferlach, T., Hallek, M. & Schoch, C. (2002). CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*, **118**, 968-75.
- Buhmann, R., Nolte, A., Westhaus, D., Emmerich, B. & Hallek, M. (1999). CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood*, **93**, 1992-2002.

- Buschle, M., Brenner, M.K., Chen, I.S., Drexler, H.G., Gignac, S.M. & Rooney, C.M. (1990). Transfection and gene expression in normal and malignant primary B lymphocytes. *J Immunol Methods*, **133**, 77-85.
- Caligaris-Cappio, F. & Hamblin, T.J. (1999). B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*, **17**, 399-408.
- Callard, R.E., Armitage, R.J., Fanslow, W.C. & Spriggs, M.K. (1993). CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today*, **14**, 559-64.
- Cantwell, M., Hua, T., Pappas, J. & Kipps, T.J. (1997). Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*, **3**, 984-9.
- Cantwell, M.J., Sharma, S., Friedmann, T. & Kipps, T.J. (1996). Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, **88**, 4676-83.
- Cardin, R.D., Brooks, J.W., Sarawar, S.R. & Doherty, P.C. (1996). Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med*, **184**, 863-71.
- Casamayor-Palleja, M., Khan, M. & MacLennan, I.C. (1995). A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J Exp Med*, **181**, 1293-301.
- Castle, B.E., Kishimoto, K., Stearns, C., Brown, M.L. & Kehry, M.R. (1993). Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J Immunol*, **151**, 1777-88.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I. & Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*, **180**, 1263-72.
- Cheson, B.D., Bennett, J.M., Grever, M., Kay, N., Keating, M.J., O'Brien, S. & Rai, K.R. (1996). National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, **87**, 4990-7.
- Chu, P., Deforce, D., Pedersen, I.M., Kim, Y., Kitada, S., Reed, J.C. & Kipps, T.J. (2002). Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3854-9. Epub 2002 Mar 12.
- Cohen, J.I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, **343**, 481-92.
- Countryman, J. & 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**, 4085-9.
- Delecluse, H.J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. & 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**, 8245-50.
- Delecluse, H.J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. & Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5188-93.
- Dilloo, D., Brown, M., Roskrow, M., Zhong, W., Holladay, M., Holden, W. & Brenner, M. (1997). CD40 ligand induces an antileukemia immune response in vivo. *Blood*, **90**, 1927-33.
- Drexler, H.G., Brenner, M.K., Coustan-Smith, E., Wickremasinghe, R.G. & Hoffbrand, A.V. (1987). Synergistic action of calcium ionophore A23187 and phorbol ester TPA on B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, **70**, 1536-42.
- Eynon, E.E. & Parker, D.C. (1992). Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med*, **175**, 131-8.
- French, R.R., Chan, H.T., Tutt, A.L. & Glennie, M.J. (1999). CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med*, **5**, 548-53.
- Geary, W.A., Frierson, H.F., Innes, D.J. & Normansell, D.E. (1993). Quantitative criteria for clonality in the diagnosis of B-cell non-Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. *Mod Pathol*, **6**, 155-61.
- George, A.J., Foreman, R.C. & Stevenson, F.K. (1991). Characterisation of a light chain loss variant of the BCL1 lymphoma. *Mol Immunol*, **28**, 789-99.
- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G. & Hallek, M. (1999). Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med*, **5**, 1052-6.
- Gong, M. & Kieff, E. (1990). Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110. *J Virol*, **64**, 1507-16.
- Graham, F.L. & Prevec, L. (1992). Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology*, **20**, 363-90.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M. & Caligaris-Cappio, F. (2001). Survivin is expressed on CD40

- stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **97**, 2777-83.
- Grewal, I.S. & Flavell, R.A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*, **16**, 111-35.
- Grewal, I.S., Xu, J. & Flavell, R.A. (1995). Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*, **378**, 617-20.
- Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. & Kleinschmidt, J.A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther*, **9**, 2745-60.
- Gruss, H.J. & Dower, S.K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*, **85**, 3378-404.
- Guerder, S. & Matzinger, P. (1992). A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med*, **176**, 553-64.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, **302**, 415-9.
- Hallek, M., Bergmann, M., Brittinger, G., Dohner, H., Dreger, P., Herold, M., Hopfinger, G., Jager, U., Knauf, W., Nerl, C., Rummel, M., Schmitt, B., Wendtner, C.M. & Emmerich, B. (2002). [Chronic lymphatic leukemia. Current therapy concepts]. *Internist (Berl)*, **43**, 1245-54.
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E. & Emmerich, B. (1999). Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **93**, 1732-7.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson, F.K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 1848-54.
- Hammerschmidt, W. & Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*, **55**, 427-33.

- Hammerschmidt, W. & Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature*, **340**, 393-7.
- Hanahan, D. & Meselson, M. (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*, **100**, 333-42.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E. & 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**, 1107-15.
- Hoffman, G.J., Lazarowitz, S.G. & Hayward, S.D. (1980). Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 2979-83.
- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W. & Delecluse, H.J. (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol*, **74**, 10142-52.
- Jenkins, M.K. (1994). The ups and downs of T cell costimulation. *Immunity*, **1**, 443-6.
- Jenkins, M.K., Pardoll, D.M., Mizuguchi, J., Chused, T.M. & Schwartz, R.H. (1987). Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 5409-13.
- Kaneda, Y., Saeki, Y., Nakabayashi, M., Zhou, W.Z., Kaneda, M.W. & Morishita, R. (2000). Enhancement of transgene expression by cotransfection of oriP plasmid with EBNA-1 expression vector. *Hum Gene Ther*, **11**, 471-9.
- Kato, K., Cantwell, M.J., Sharma, S. & Kipps, T.J. (1998). Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*, **101**, 1133-41.
- Kay, N.E. & Kaplan, M.E. (1986). Defective T cell responsiveness in chronic lymphocytic leukemia: analysis of activation events. *Blood*, **67**, 578-81.
- Keating, M.J., Flinn, I., Jain, V., Binet, J.L., Hillmen, P., Byrd, J., Albitar, M., Brettman, L., Santabarbara, P., Wacker, B. & Rai, K.R. (2002). Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*, **99**, 3554-61.
- Keene, J.A. & Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, **155**, 768-82.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B. & Hammerschmidt, W. (1995).

- Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol*, **69**, 231-8.
- Kieff, E. (1996). *Fields Virology*. Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (eds). Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, pp 2343-2436.
- Kipps, T.J. & Carson, D.A. (1993). Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood*, **81**, 2475-87.
- Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J.S. & Mumford, D. (1975). An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology*, **5**, 319-34.
- Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*, **267**, 243-6.
- Mavromatis, B. & Cheson, B.D. (2003). Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, **21**, 1874-81.
- Medina, D.J., Sheay, W., Goodell, L., Kidd, P., White, E., Rabson, A.B. & Strair, R.K. (1999). Adenovirus-mediated cytotoxicity of chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, **94**, 3499-508.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, **267**, 1449-56.
- Nelson, E.L., Li, X., Hsu, F.J., Kwak, L.W., Levy, R., Clayberger, C. & Krensky, A.M. (1996). Tumor-specific, cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **88**, 580-9.
- Nemerow, G.R., Houghten, R.A., Moore, M.D. & Cooper, N.R. (1989). Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell*, **56**, 369-77.
- Nemerow, G.R., Mold, C., Schwend, V.K., Tollefson, V. & Cooper, N.R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol*, **61**, 1416-20.
- Notarangelo, L.D., Duse, M. & Ugazio, A.G. (1992). Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodefic Rev*, **3**, 101-21.
- Perabo, L., Buning, H., Kofler, D.M., Ried, M.U., Girod, A., Wendtner, C.M., Enssle, J. & Hallek, M. (2003). In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther*, **8**, 151-7.
- Pulvertaft, R.J.V. (1964). Cytology of Burkitt's tumour. *Lancet*, **1**, 238-240.

- Ramesh, N., Fuleihan, R. & Geha, R. (1994). Molecular pathology of X-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM (HIGMX-1). *Immunol Rev*, **138**, 87-104.
- Ranheim, E.A. & Kipps, T.J. (1993). Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med*, **177**, 925-35.
- Reed, J.C. (1998). Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, **25**, 11-8.
- Ribera, J.M., Vinolas, N., Urbano-Ispizua, A., Gallart, T., Montserrat, E. & Rozman, C. (1987). "Spontaneous" complete remissions in chronic lymphocytic leukemia: report of three cases and review of the literature. *Blood Cells*, **12**, 471-83.
- Rickinson, A.B., Finerty, S. & 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**, 347-54.
- Rogers, R.P., Strominger, J.L. & Speck, S.H. (1992). Epstein-Barr virus in B lymphocytes: viral gene expression and function in latency. *Adv Cancer Res*, **58**, 1-26.
- Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava, D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K. & Heslop, H.E. (1998). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*, **92**, 1549-55.
- Rosen, F.S., Cooper, M.D. & Wedgwood, R.J. (1995). The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med*, **333**, 431-40.
- Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J.C., Grever, M.R., Cheson, B.D., Chiorazzi, N., Wilson, W.H., Kipps, T.J., Brown, P.O. & Staudt, L.M. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, **194**, 1639-47.
- Roy, M., Aruffo, A., Ledbetter, J., Linsley, P., Kehry, M. & Noelle, R. (1995). Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *Eur J Immunol*, **25**, 596-603.
- Sambrook, A. & Russell, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schattner, E.J., Elkon, K.B., Yoo, D.H., Tumang, J., Krammer, P.H., Crow, M.K. & Friedman, S.M. (1995). CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B

- lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med*, **182**, 1557-65.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R. & Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, **393**, 480-3.
- Schultze, J.L., Seamon, M.J., Michalak, S., Gribben, J.G. & Nadler, L.M. (1997). Autologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro. *Blood*, **89**, 3806-16.
- Schweizer, M., Flory, E., Buchholz, C.J. & Cichutek, K. (2001). Retroviral Vectors. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, **44**, 1038-1046.
- Stacchini, A., Aragno, M., Vallario, A., Alfarano, A., Circosta, P., Gottardi, D., Faldella, A., Rege-Cambrin, G., Thunberg, U., Nilsson, K. & Caligaris-Cappio, F. (1999). MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polyclonal transformation. *Leuk Res*, **23**, 127-36.
- Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Lichter, P. & Dohner, H. (2002). Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*, **16**, 993-1007.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y. & Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell*, **50**, 203-13.
- Tenenbaum, L., Lehtonen, E. & Monahan, P.E. (2003). Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther*, **3**, 545-65.
- Teoh, G., Tai, Y.T., Urashima, M., Shirahama, S., Matsuzaki, M., Chauhan, D., Treon, S.P., Raje, N., Hideshima, T., Shima, Y. & Anderson, K.C. (2000). CD40 activation mediates p53-dependent cell cycle regulation in human multiple myeloma cell lines. *Blood*, **95**, 1039-46.
- Tolba, K.A., Bowers, W.J., Eling, D.J., Casey, A.E., Kipps, T.J., Federoff, H.J. & Rosenblatt, J.D. (2002). HSV amplicon-mediated delivery of LIGHT enhances the antigen-presenting capacity of chronic lymphocytic leukemia. *Mol Ther*, **6**, 455-63.
- Tolba, K.A., Bowers, W.J., Hilchey, S.P., Halterman, M.W., Howard, D.F., Giuliano, R.E., Federoff, H.J. & Rosenblatt, J.D. (2001). Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **98**, 287-95.
- Trojan, A., Schultze, J.L., Witzens, M., Vonderheide, R.H., Ladetto, M., Donovan, J.W. & Gribben, J.G. (2000). Immunoglobulin framework-derived peptides function as

- cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies. *Nat Med*, **6**, 667-72.
- von Bergwelt-Baildon, M.S., Vonderheide, R.H., Maecker, B., Hirano, N., Anderson, K.S., Butler, M.O., Xia, Z., Zeng, W.Y., Wucherpennig, K.W., Nadler, L.M. & Schultze, J.L. (2002). Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen- presenting cells: potential for clinical application. *Blood*, **99**, 3319-25.
- Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L. & Nadler, L.M. (1999). The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, **10**, 673-9.
- Wang, D., Freeman, G.J., Levine, H., Ritz, J. & Robertson, M.J. (1997). Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *Br J Haematol*, **97**, 409-17.
- Wang, F., Li, X., Annis, B. & Faustman, D.L. (1995). Tap-1 and Tap-2 gene therapy selectively restores conformationally dependent HLA Class I expression in type I diabetic cells. *Hum Gene Ther*, **6**, 1005-17.
- Weiss, S. & Bogen, B. (1989). B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 282-6.
- Wendel-Hansen, V., Sallstrom, J., De Campos-Lima, P.O., Kjellstrom, G., Sandlund, A., Siegbahn, A., Carlsson, M., Nilsson, K. & Rosen, A. (1994). Epstein-Barr virus (EBV) can immortalize B-cell cells activated by cytokines. *Leukemia*, **8**, 476-84.
- Wendtner, C.M., Kofler, D.M., Theiss, H.D., Kurzeder, C., Buhmann, R., Schweighofer, C., Perabo, L., Danhauser-Riedl, S., Baumert, J., Hiddemann, W., Hallek, M. & Buning, H. (2002). Efficient gene transfer of CD40 ligand into primary B-CLL cells using recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Blood*, **100**, 1655-61.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A. & Nemerow, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, **73**, 309-19.
- Wierda, W.G., Cantwell, M.J., Woods, S.J., Rassenti, L.Z., Prussak, C.E. & Kipps, T.J. (2000). CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **96**, 2917-24.
- Xiao, X., Li, J. & Samulski, R.J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, **72**, 2224-32.

-
- Xue, C.S., Dong, Y. & Yu, M.X. (1994). [The abnormalities of the cellular immunity in rheumatoid synovium]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, **33**, 601-4.
- Zelenetz, A.D., Chen, T.T. & Levy, R. (1991). Histologic transformation of follicular lymphoma to diffuse lymphoma represents tumor progression by a single malignant B cell. *J Exp Med*, **173**, 197-207.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. & Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, **101**, 173-85.
- Zimmermann, J. & Hammerschmidt, W. (1995). Structure and role of the terminal repeats of Epstein-Barr virus in processing and packaging of virion DNA. *J Virol*, **69**, 3147-55.

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-----------|---|
| °C | Grad Celsius |
| AAV | Adeno-assoziiertes Virus |
| Abb. | Abbildung |
| APC | Antigen präsentierende Zelle |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BALB/c | Bagg Albinos, Genotype c/c at the Colour Locus |
| BALF | BamHI A Fragment third leftward Reading Frame |
| BBS | BES-gepuffertes Salz |
| BES | <i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserum Albumin |
| CD | Cluster of differentiation |
| CLL | Chronische Lymphatische Leukämie |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CTLA | Cytotoxic T-cell Antigen |
| Da | Dalton |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EBNA | EBV-nukleäres-Antigen |
| EBV | Epstein Barr Virus |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FCS | Foetales Kälberserum |
| FISH | Fluorescence In Situ Hybridisation |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| g | Gramm |
| GM-CSF | Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor |
| Gy | Gray |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt Solution |
| ICAM | Intercellular Adhesion Molecule |
| IL | Interleukin |
| INF | Interferon |
| kb | Kilobasen |
| LFA | Lymphocyte Function Associated Antigen |
| LMP | Latent Membrane Protein |
| MCS | Multiple Klonierungsstelle |
| MFIR | Mean Fluorescence Intensity Ratio |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| MOI | Multiplicity of Infection |
| NK-Zellen | Natural Killer Zellen |
| nm | Nanometer |
| oriP | Origin of Plasmid Replication Protein |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |

| | |
|------|--|
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration |
| rAAV | rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| sec | Sekunde |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-Zell Rezeptor |
| TERT | Telomerase Reverse Transcriptase |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TR | Terminal Repeats |
| U | Einheit der Enzymaktivität |
| VCA | Viral Capsid Antigen |

9.2 Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

- Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael Hallek, der als Arzt, Wissenschaftler ein Vorbild für mich ist, für die Möglichkeit ein interessantes molekularbiologisches/immunologisches Thema mit klinischem Bezug zu bearbeiten, für seine kontinuierliche Betreuung und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für die vielen Anregungen und den wissenschaftlichen Freiraum, den er mir geboten hat.
- Herrn PD Dr. Clemens Wendtner, für die Einführung in das Thema, für die vielen interessanten fachlichen Diskussionen, seine vielen Anregungen und dafür, daß er bei Fragen und Problemen jederzeit zur Verfügung stand.
- Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Hallek danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und für die gute Laune. Von dem professionellen Arbeitsumfeld und der sehr kollegialen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe habe ich viel profitiert.
- Herrn Professor Dr. Wolfgang Hammerschmidt danke ich für die Überlassung seines Vektorsystems und für seine Expertise.
- Herrn Dr. Henri Jaques Delecluse und Dr. Annette Janz aus der Arbeitsgruppe Hammerschmidt, die mich bei meiner Arbeit ebenfalls sehr unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Kurzeder
Geburtsdatum: 29. Juni 1969
Geburtsort: Rosenheim
Nationalität: Deutsch

Ausbildung

1979-1988 Ludwig Thoma Gymnasium Prien, Abitur 06/1988
1988-1989 Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
1989-1991 Ludwig-Maximilians-Universität München, Grundstudium Physik, Vordiplom in Physik 05/1991
1991-1998 Technische Universität München, University College London Medical School, Ludwig-Maximilians Universität München, Studium der Medizin, Ärztliche Prüfung 12/1998
1999-2001 Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, Arzt im Praktikum, Approbation 04/2001
2001-2004 Universitätsfrauenklinik Ulm, Assistenzarzt