

**Aus der Klinik für Kinder-Onkologie,
-Hämatologie und -Immunologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. U. Göbel**

**Gentransfer in hämatopoetische Zellen, die Leber und Muskulatur:
HSV-1 Amplikonvektoren zur Erzeugung einer Leukämievakzine
und für die Genersatztherapie**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Vorgelegt von

Lars Müller

2004

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: Priv. Doz. Dr. med. Dagmar Dilloo

Korreferent: Priv. Doz. Dr. med. Ortwin Adams

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Virale Gentransfektoren	5-6
1.2 Herpes Simplex Virus Typ-1 Gentransfektoren	6
1.3 HSV-1 Amplikonvektoren	6-9
1.4 HSV-1 Hybridvektoren	10-11
1.5 HSV-1 Amplikonvektoren zur Erzeugung einer Leukämievakzine	12-13
1.6 HSV-1 Amplikonvektoren für die Gensatztherapie: Leber- und Muskelgerichteter Gentransfer	14
2. Ziele der Arbeit	
2.1 Gentransfer in hämatopoetische Zellen mit HSV-1 Amplikonvektoren	15
2.2 Gentransfer in die Leber und die Muskulatur mit HSV-1 Amplikonvektoren	15
3. Material & Methoden	
3.1 Herstellung von Amplikonvektoren mit dem Helfervirus-abhängigen System	16-19
3.2 Herstellung von Amplikonvektoren mit dem Helfervirus-freien System	20-21
3.3 Übersicht der Zelllinien	22
3.4 Ficollgradient zur Isolation mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark	23
3.5 Standardkulturbedingungen	23
3.6 Infektion von Zelllinien und primären Zellen mit HSV-1 Amplikonvektoren	23
3.7 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen	23
3.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)	24
3.9 Beurteilung der vektorbedingten Zytotoxizität mittels Durchflusszytometrie	25
3.10 Primäre Zellen	26
3.11 Tiere und Tierversuche	26
3.12 Vektorinjektion / Blutentnahme	26
3.13 Aufbereitung der Proben und SEAP-Chemilumineszenz Messung	26
3.14 Analyse von Plasmid DNA in Agarosegelen	27
3.15 Isolierung von DNA nach Restriktionsspaltung aus Agarosegelen	27
3.16 Ligation von DNA	27

3.17	Dephosphorylierung von DNA	28
3.18	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA	28
3.19	DNA Präparation in analytischer Menge („Miniprep“ durch alkalische Lyse)	28
3.20	Kulturmedien, Zusätze und molekularbiologische Agentien	29
4.	Ergebnisse	
4.1	Vorversuche zum Gentransfer mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren	30-31
4.2	Gentransfer in normale und neoplastischer Zellen der Hämatopoese	
4.2.1	Gentransfer mononukleärer Zellen aus humanen Knochenmark	32-34
4.2.2	Gentransfer in selektionierte humane CD34 positiver Zellen	35-37
4.2.3	Gentransfer in primärer akuter leukämischer Blasten	38-39
4.2.4	Gentransfer in die murine Lymphomzelllinie A20 und Untersuchung der Modulation der MHC Klasse I Expression durch HSV-1 Amplikonvektoren	40-41
4.3	Helfervirus-frei HSV-1 Amplikons für den Gentransfer in die Leber und Muskulatur	
4.3.1	Vektorkonstrukte	42-43
4.3.2	Gentransfer in die Hepatozyten Zelllinie NPLC	44
4.3.3	Gentransfer in die Leber von BALB/c Mäusen	45
4.3.4	Gentransfer in die Muskulatur von BALB/c Mäusen	46
	Diskussion	47-52
	Abkürzungen	53
	Literatur	54-57
	Zusammenfassung	58
	Lebenslauf	59
	Danksagung	60

Einleitung

Die somatische Gentherapie ist ein vergleichsweise junger Zweig der Medizin, mit dessen Hilfe Krankheitsprozesse durch die Einführung fremder Gene in Körperzellen beeinflusst werden sollen. Der effiziente und sichere Transfer der therapeutischen Gene in die Körperzellen hat sich als eine der größten Herausforderungen der Gentherapie erwiesen.

Gentransfer wird heute durch verschiedene virale und nicht-virale Vehikel (Vektoren) erreicht. Virale Vektoren bedienen sich der infektiösen Hülle der Wildtyp-Viren, um fremde (therapeutische) DNA in den Nukleus eukaryontischer Zellen zu befördern.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung des Gentransfers mit Hilfe von Vektoren, die sich von Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) ableiten. Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Gentransfer in hämatopoetische Zellen und zielt auf die Erzeugung einer Immuntherapie zur Behandlung akuter Leukämien ab. Der zweite Teil der Arbeit untersucht den Gentransfer in die Leber und Muskulatur und hat die Gensatztherapie zum Ziel.

1.1 Virale Gentransfervektoren

Viren sind obligate Parasiten, die sehr effiziente Strategien besitzen, um in die Wirtszelle einzudringen und ihren Metabolismus zu manipulieren. Diese Eigenschaften wurden für die Entwicklung viraler Gentransfervektoren ausgenutzt. Gentransfer ist mit verschiedenen genetisch veränderten Viren möglich. Dabei gibt es sowohl Vektoren, die ihre genetische Information in das Genom der Wirtszelle integrieren, als auch solche, deren DNA in der Wirtszelle in episomaler (extrachromosomaler) Form vorliegt. Allgemein gilt, dass integrierende Vektoren eine stabilere (langfristigere) Genexpression vermitteln als nicht-integrierende Vektoren.

Zu den integrierenden Vektoren zählen u.a. die Moloney Murine Leukemia Viren (MoMLV), die als Veteranen der Gentherapie gelten ¹. Seit einigen Jahren stehen auch Lentiviren, d.h. Verwandte des AIDS Erregers, als integrierende Vektoren zur Verfügung ². Im Gegensatz zu den MoMLV und den Lentiviren, die sich durch unspezifische Integration kennzeichnen, besitzen die Adeno-Assoziierten Viren (AAV) die Fähigkeit zur spezifischen Integration auf einem definierten Locus des menschlichen Chromosom 19 ³.

Dadurch wird die Gefahr der Insertionsmutagenese, d.h. der Dysregulation körpereigener Gene durch unspezifisch integrierende Vektorsequenzen, vermindert ⁴.

Die Adenoviren zählen zu den gebräuchlichsten nicht-integrierenden Vektoren ⁵. In der vorliegenden Arbeit wurden Gentransfervektoren, die sich von Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) ableiten, verwendet. Bei den klassischen HSV-1 Vektoren handelt es sich ebenfalls um nicht-integrierende Vektoren.

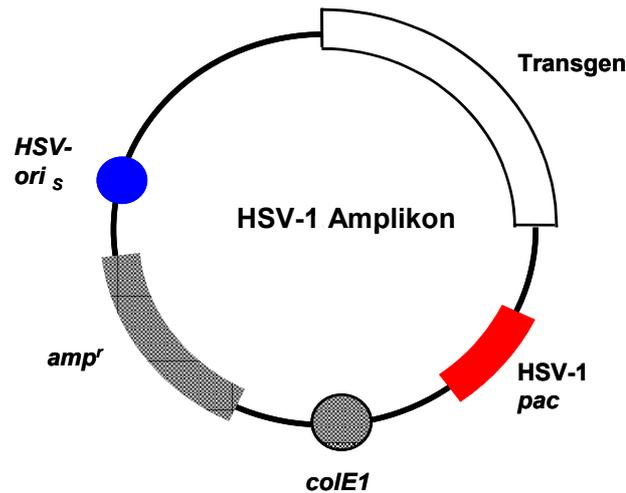
1.2 Herpes Simplex Virus Typ-1 Gentransfervektoren

Obwohl HSV-1 Vektoren bisher vergleichsweise wenig Anwendung in der Klinik finden, haben die biologischen Eigenschaften der HSV-1 die Entwicklung vielseitiger Gentransfervektoren ermöglicht ⁶. HSV-1 ist im wesentlichen pantropisch und infiziert sowohl teilende wie auch nicht-teilende Zellen. Aufgrund ihres Neurotropismus wurden HSV-1 Gentransfervektoren ursprünglich zur Transduktion neuronaler Zellen verwendet ⁷. Später konnte dann der Gentransfer in weitere Wirtszellen, wie z.B. leukämische Blasten ⁸, Hepatozyten ⁹ und Myozyten ¹⁰ gezeigt werden. Das HSV-1 Genom (~ 152 kb) kodiert für mehr als 75 Gene, von denen 38 nicht-essentiell für die Virusreplikation sind ¹¹. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, große Teile des viralen Genoms durch Fremd-DNA zu ersetzen und ein oder mehrere therapeutische Gene von theoretisch bis zu 150 kb Grösse einzufügen ⁶.

1.3 HSV-1 Amplikonvektoren

Die HSV-1 Amplikonvektoren bilden eine eigene Entität in der Gruppe der herpesviralen Gentransfervektoren. Im Gegensatz zu den rekombinanten HSV-Vektoren, bei denen einzelne Virusgene durch Transgene ersetzt werden, basieren die Amplikonvektoren auf einem bakteriellen Plasmid, das neben den Transgenen zwei nicht kodierende HSV-1 Sequenzen, den Replikationsursprung *ori_s*, und das DNA-Verpackungssignal *pac* enthält ¹² (Abb.1.3 A). Durch die Interaktion des Amplikonplasmides mit HSV-1 Strukturproteinen und Enzymen (sog. Helferfunktionen) entstehen Vektorpartikel, die multiple End-zu-End Kopien (Konkatemere) der Plasmid-DNA enthalten - eine Tatsache, die zur Bezeichnung „Amplikon“ führte ¹².

Abb. 1.3 A: Das Amplikonplasmid besteht aus folgenden genetischen Elementen: (a) zwei HSV-1 Sequenzen, den Replikationsursprung (*ori_s*) und das Verpackungssignal (*pac*); (b) eine Transgenkassette; und (c) bakterielle Sequenzen wie den Replikationsursprung (*colE1*) und eine Antibiotikaresistenz (*amp^r*), welche die Propagation des Plasmides in *E. coli* Bakterien ermöglichen.



Um die nötigen Helferfunktionen zur Vektorverpackung bereitzustellen, wurden ursprünglich replikationsdefekte HSV-1 Helferviren verwendet. Diese Helferviren weisen Deletionen essentieller Replikationsgene, wie z.B. des *infected cell protein 4* (ICP4), auf. Dadurch wird eine Replikation der Helferviren in menschlichen Körperzellen, die das entsprechende Gen nicht aufweisen, verhindert und somit die biologische Sicherheit des Vektorsystems gewährleistet. Zur Erzeugung von Vektorpartikeln mit dem Helfervirus-abhängigen System wird das Amplikonplasmid in Verpackungszellen transfiziert, die dann mit den Helferviren infiziert werden (Abb. 1.3 B). Die Verpackungszellen komplementieren die Deletionen der Helferviren und ermöglichen dadurch sowohl die Verpackung des Amplikonplasmides zu Vektorpartikeln als auch die Vermehrung der Helferviren¹³. Wesentlicher Nachteil dieses Systems ist die unvermeidbare Koexistenz von Amplikonvektoren und Helferviren in der Vektorpräparation, wobei letztere stark toxisch auf die Wirtszelle wirken können. Verantwortlich für die Zytotoxizität der Helferviren sind in erster Linie herpesvirale Gene und Proteine, die in der Wirtszelle unabhängig von einer Virusreplikation eine toxische Wirkung entfalten¹⁴.

Eine wesentliche Verbesserung der Amplikonvektoren gelang durch die Klonierung des HSV-1 Genoms als ein bakterielles artifizielles Chromosom (BAC). Dieses Konstrukt kann die Rolle der Helferviren übernehmen, indem es alle erforderlichen HSV-1 Proteine *in trans* bereitstellt¹⁵. Da diesem Konstrukt das Verpackungssignal *pac* fehlt, kommt es nicht zur Bildung von *wt*-HSV-1 (Abb.1.3 C). Vielmehr wird die Verpackung reiner Amplikonvektoren ohne Kontamination durch Helferviren möglich. Durch die Einführung dieses Helfervirus-freien Vektorsystems wurde die Zytotoxizität der Amplikonvektoren deutlich reduziert.

Abb. 1.3 B: Helfervirus-abhängiges Amplikonsystem. Die Verpackungszellen werden mit dem Amplikonplasmid transfiziert und mit replikationsdefekten (z.B. ICP4-negativen) Helferviren infiziert. Die Verpackungszellen komplementieren ICP4 und ermöglichen dadurch die Replikation der Helferviren und die Verpackung des Amplikonplasmids. In der Vektorpräparation lassen sich die Vektorpartikel nicht von den zytotoxischen Helferviren trennen.

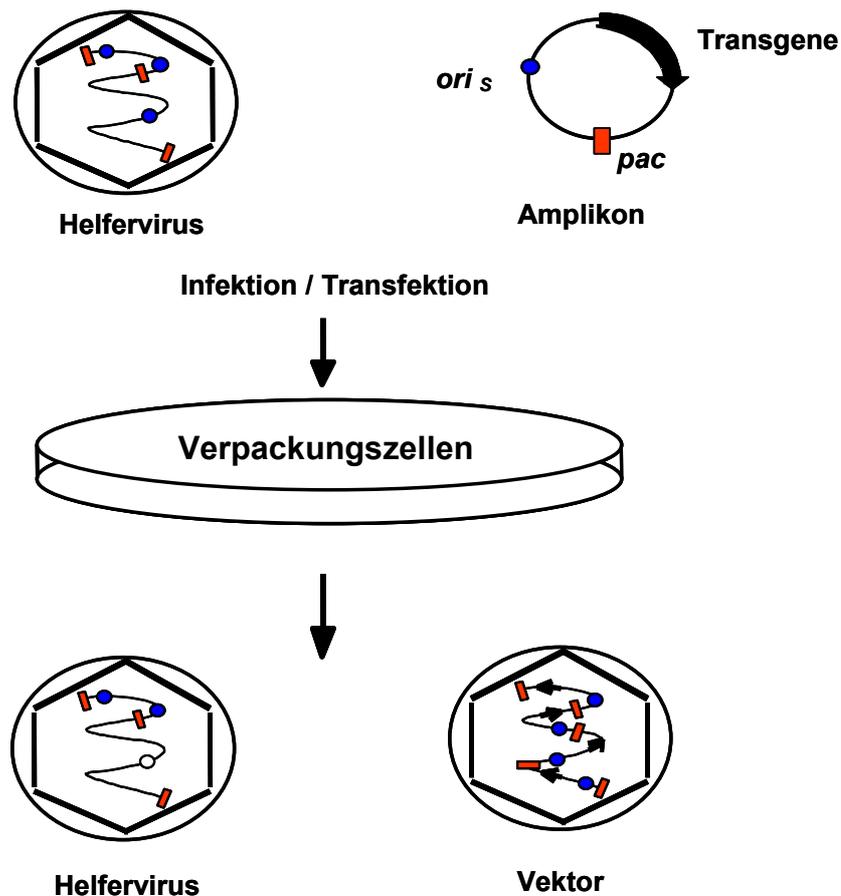
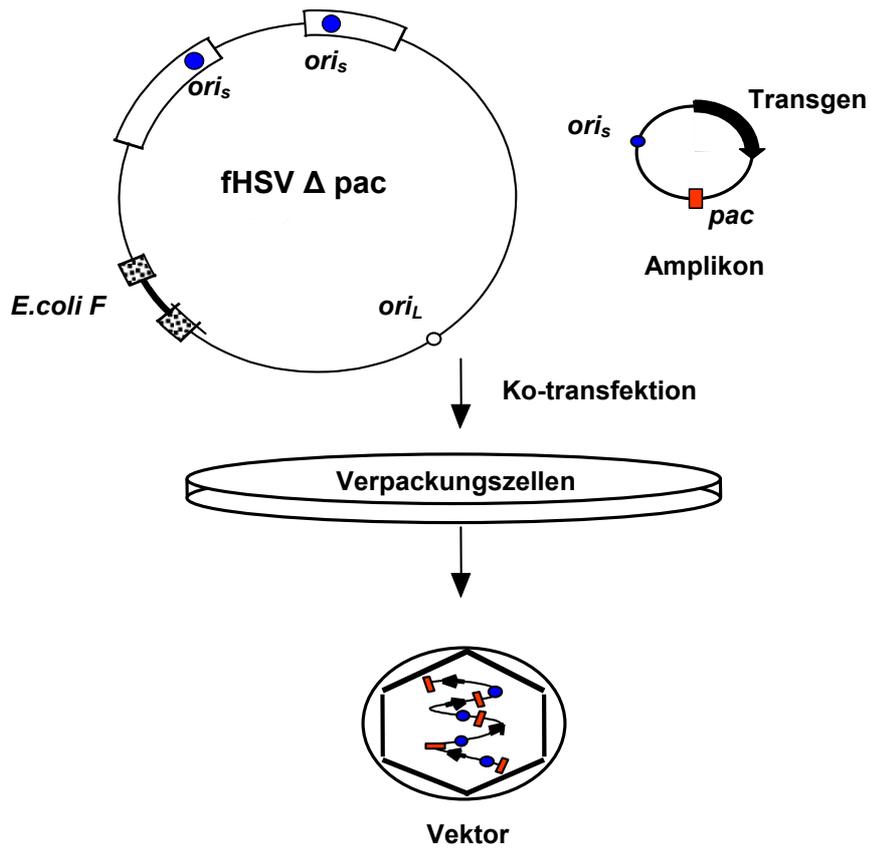


Abb. 1.3 C: Helfervirus-freies Amplikonsystem. Das Amplikonplasmid wird mit der BAC-DNA fHSV Δ pac ko-transfiziert. Die HSV-1 Helferfunktionen werden *in trans* von der BAC-DNA bereitgestellt. Es entstehen reine Amplikonvektoren ohne Kontamination durch Helferviren.

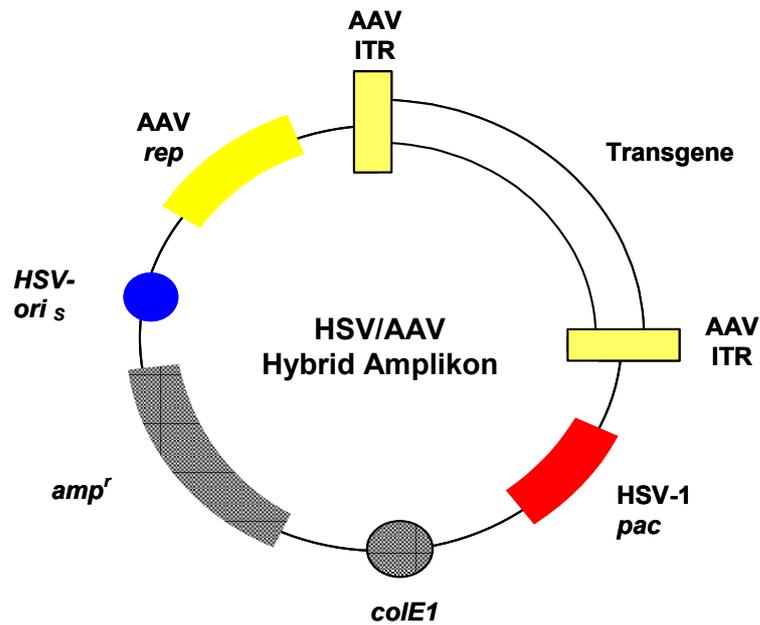


1.4 HSV-1 Hybridvektoren

Das Genom konventioneller HSV-1 Amplikonvektoren liegt in der Wirtszelle in episomaler (extrachromosomaler) Form vor. Da keine Integration in das Wirtsgenom erfolgt, ist die Dauer der Transgenexpression meist auf einige Tage bis Wochen begrenzt¹⁶. Dieser Zeitrahmen kann für verschiedene Anwendungen, wie z.B. Tumormimmuntherapie, ausreichend sein. Wesentlicher Vorteil eines solchen Systems ist auch das reduzierte Risiko der Insertionsmutagenese.

Andere Anwendungen, wie z.B. die Gensatztherapie, erfordern allerdings eine stabile Genexpression. Um die Dauer der Genexpression durch HSV-1 Amplikonvektoren zu verlängern, wurden sog. Hybridvektoren generiert. Das Prinzip der HSV-1 Hybridvektoren besteht darin, die Stabilität des Transgens durch genomische Integration oder episomale Retention des Vektorgenoms zu erhöhen¹⁶. Dies gelingt durch die Einführung spezifischer genetischer Elemente anderer Viren in das HSV-1 Amplikonplasmid (Abb. 1.4). So ermöglichen z.B. die „inverted terminal repeats“ (ITR) und die rep-Gene der Adeno-Assoziierten Viren (AAV) die genomische Integration des Transgens an einem spezifischen Locus auf Chromosom 19 (19q13.3, AAVS1)¹⁶. Alternativ kann z.B. auch die Verwendung des EBNA1 Gens der Epstein-Barr-Viren (EBV) zusammen mit dem Replikationsursprung oriP die episomale Retention des Vektors verlängern¹⁷.

Abb. 1.4: HSV-1/AAV Hybridvektor. Zusätzlich zu den genetischen Elementen von HSV-1, *ori_s* und *pac*, die in Anwesenheit von HSV-1 Helferfunktionen die Replikation und Verpackung der Amplikon-DNA in Viruspartikel vermitteln, enthält dieser Vektor die AAV *rep* Gene und eine Transgenkassette, die von den AAV „inverted terminal repeats“ (ITR) flankiert wird. Diese AAV Gene ermöglichen die spezifische Integration der Transgenkassette im Bereich des AAVS1 Locus auf Chromosom 19 der Wirtszelle und tragen somit dazu bei, die Dauer der Genexpression zu verlängern.



1.5 HSV-1 Amplikonvektoren zur Erzeugung einer Leukämievakzine

Akute Leukämien sind die häufigsten bösartigen Erkrankungen im Kindesalter. Obwohl in den letzten dreißig Jahren große Fortschritte bei der Behandlung von Kindern mit akuter Leukämie erzielt worden sind, ist die Prognose für Patienten mit primär therapieresistenter oder rezidivierter akuter Leukämie weiterhin ungünstig ⁽⁴¹⁻⁴³⁾. Da die allogene Stammzelltransplantation (SZT) nicht bei allen Patienten möglich ist und therapeutische Optionen im Falle eines Rezidives nach allogener SZT stark eingeschränkt sind, besteht dringend der Bedarf für alternative therapeutische Strategien.

Die Annahme, dass immunologische Effektormechanismen zur Kontrolle der akuten Leukämie herangezogen werden können, wird durch die biologischen Eigenschaften dieser Neoplasie unterstützt. Dies wird insbesondere durch die klinische Beobachtung untermauert, dass immunologische Effektormechanismen einen wichtigen Beitrag zur Elimination leukämischer Blasten nach allogener SZT im Sinne einer „Graft-versus-Leukemia“ Reaktion leisten können ¹⁸. Das Prinzip der Leukämievakzine besteht darin, die Immunogenität der Leukämiezellen durch den Transfer immunstimulatorischer Gene *ex vivo* zu verstärken. Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass sich durch die parakrine Sekretion von immunologisch wirksamen Zytokinen wie dem Interleukin-2 (IL-2) eine antineoplastische T-Zellantwort induzieren lässt ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. *In vivo* führt die Injektion solcher *ex vivo* modifizierten Tumor- / Leukämiezellen nicht nur zur Stimulation einer lokalen Immunreaktion am Vakzinationsort selbst, sondern auch zu einer systemischen, tumor- / leukämiespezifischen Immunantwort, die sich gegen unmodifizierte, an anderer Stelle des Organismus befindliche Tumor- / Leukämiezellen richtet. Die Validität dieses Konzeptes wurde anhand verschiedener Malignome sowohl in murinen Modellen als auch durch die ersten Ergebnisse klinischer Phase I Studien belegt ⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾.

Die Erstellung einer Leukämievakzine für klinische Behandlungen wurde bisher vor allem durch die Resistenz primärer ALL Blasten gegenüber der meisten für die klinische Anwendung zugelassenen Gentransfervektoren behindert ¹⁹. Gute Transduktionsraten von ALL Blasten wurden bisher vor allem für die HIV-basierenden Lentiviren und rekombinante HSV-2 disabled infectious single cycle (DISC) Vektoren beschrieben ^(49,50). HSV-1 Amplikonvektoren bieten möglicherweise eine interessante Alternative zu diesen Vektorsystemen. Ein wichtiger Vorteil der Amplikonvektoren ist die Möglichkeit der technisch unkomplizierten Erzeugung verschiedener Vektorkonstrukte durch Klonierung des Amplikonplasmides.

Dies ermöglicht die rasche Erprobung der Wirksamkeit verschiedener immunmodulatorischer Gene bzw. verschiedener Kombinationen dieser Gene. Dabei hat sich insbesondere die Kombination verschiedener Immunmodulatoren, wie z.B. die Kombination von Chemokinen und Zytokinen, als vielversprechend erwiesen ²⁷. Die große Insertionskapazität der HSV-1 Amplikonvektoren ermöglicht es, Kombinationen verschiedener Gene mit einem einzigen Vektorpartikel in die Zielzelle zu befördern.

1.6 HSV-1 Amplikonvektoren für die Gensatztherapie: Leber- und Muskel-gerichteter Gentransfer

Zahlreiche monogenetische Erkrankungen lassen sich auf die verminderte Konzentration bzw. Aktivität einzelner Proteine zurückführen. Die Bluterkrankheit Hämophilie, die durch die verminderte Aktivität einzelner Gerinnungsfaktoren im Blut verursacht wird, gilt als gutes Beispiel einer monogenetischen Erkrankung, die durch Gensatztherapie positiv beeinflusst werden könnte. Verschiedene Vektorsysteme, wie die MoMLV, Lentiviren und Adeno-Assoziierte-Viren werden in Grossterversuchen bzw. klinischen Studien verwendet, um den genetischen Defekt der Hämophilie zu korrigieren ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾.

Obwohl sich erfolgreiche Strategien bei der Genthherapie monogenetischer Erkrankungen abzeichnen, besteht weiterhin der Bedarf zur Optimierung der Gentransfertechnik. Insbesondere fehlen bisher Vektorsysteme, die eine ausreichend große Insertionskapazität aufweisen, um nicht nur die komplementäre (cDNA), sondern auch die genomische DNA Sequenz wichtiger Proteine aufzunehmen. Die genomische DNA Sequenz enthält im Gegensatz zur cDNA wichtige regulatorische Elemente und den nativen Promoter des jeweiligen Gens und könnte daher im Kontext der Gensatztherapie den konventionellen cDNA Konstrukten überlegen sein ²⁰.

HSV-1 Amplikonvektoren haben sich aufgrund ihrer großen Insertionskapazität in dieser Hinsicht als vielversprechend erwiesen. Die Einführung der Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren und verschiedener HSV-1 Hybridvektoren hat neue Perspektiven für die Verwendung der Amplikons im Rahmen der Gensatztherapie eröffnet. Insbesondere wurde die Zytotoxizität des Vektorsystems durch die Einführung des Helfervirus-freien Vektorsystems nachhaltig reduziert und die Stabilität der Transgenexpression durch die Verwendung von HSV-1/AAV und HSV-1/EBV Hybridvektoren deutlich verlängert ^{9,21}. Dank ihres breiten Tropismus im menschlichen Körper stellen die HSV-1 Amplikonvektoren vielversprechende Kandidaten für den korrektiven Gentransfer in diverse Gewebe, wie z.B. die Leber und die Muskulatur dar ^{9, 10, 22}.

Ziele der Arbeit

2.1 Gentransfer in hämatopoetische Zellen mit HSV-1 Amplikonvektoren

Im Hinblick auf die Herstellung einer Leukämievakzine soll untersucht werden, mit welcher Effizienz humane hämatopoetische Zellen mit HSV-1 Amplikonvektoren transduziert werden. Zunächst soll der Gentransfer in unreife (CD34+) und reife (mononukleäre) Zellen der normalen menschlichen Blutbildung untersucht werden. In einem zweiten Schritt soll der Gentransfer in maligne Zellen der Hämatopoese (akute leukämische Blasten) charakterisiert werden. In Vorbereitung auf ein Tiermodell zur Leukämievakzination wird die Gentransfereffizienz in eine murine lymphoblastische Zelllinie untersucht.

2.2 Gentransfer in die Leber und die Muskulatur mit HSV-1 Amplikonvektoren

Im Hinblick auf die Etablierung eines Modells der Gentransfertherapie soll der Gentransfer in die Leber und die Muskulatur untersucht werden. Zielsetzung ist zunächst die Klonierung verschiedener Vektorkonstrukte, die ein Reporterogen (Sekretierte Alkalische Phosphatase, SEAP) enthalten. Anhand dieser Konstrukte soll geprüft werden, wie effizient HSV-1 Amplikonvektoren Hepato- und Myozyten infizieren und ob die Verwendung von HSV-1/AAV bzw. HSV-1/EBV Hybridvektoren die Dauer der Genexpression in der Leber bzw. der Muskulatur positiv beeinflusst.

Material & Methoden

3.1 Herstellung von Amplikonvektoren mit dem Helfervirus-abhängiges System

Transfektion des Amplikonplasmids in die Verpackungszelllinie RR1

Als Verpackungszelllinie dienen RR1 Zellen, die das herpesvirale Protein ICP4 exprimieren und somit die entsprechende Deletion der HSV-1 d120 Helferviren komplementieren. Die Zellen werden unter Standardkulturbedingungen in DMEM Medium (10% FBS, 1% P/S) kultiviert. Am Tag vor der Transfektion werden 0,8 bis $1,0 \times 10^6$ RR1 Zellen auf einer 60-mm² Zellkulturplatte ausgesät. Pro 60-mm² Zellkulturplatte werden je 150 µl Opti-MEM I in zwei 15-ml Röhrchen gegeben. In eines dieser Röhrchen wird 5 µg des Amplikonplasmides, in das zweite 15 µl Lipofectamin pipettiert. Der Inhalt der beiden Röhrchen wird dann zusammengeführt, vorsichtig gemischt und für 45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden pro 60-mm² Zellkulturplatte 0,9 ml Opti-MEM I zu der Opti-MEM I / Lipofectaminmischung gegeben und vorsichtig gemischt. Die RR1 Zellen werden durch zweimaliges Waschen mit DMEM Medium (ohne FBS) auf die Transfektion vorbereitet. Das DMEM Medium wird von den Zellen abgesaugt und je 1,3 ml Opti-MEM I / Lipofektaminmischung zu den Zellen pipettiert. Die Zellen inkubieren für 5 Stunden unter Standardkulturbedingungen bei 37°C. Danach wird die Opti-MEM I / Lipofektaminmischung abgesaugt und durch 3,5 ml DMEM Medium (10% FBS, 1% P/S) ersetzt. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, kann ein Teil der transfizierten Zellen am Tag nach der Transfektion durchflusszytometrisch auf die Expression des Reportergens untersucht werden.

Infektion mit HSV-1 d120 Helferviren

Die HSV-1 d120 Helferviren weisen eine Deletion für das *immediate early* Gen 3 (IE3) auf, das für das Protein ICP4 (140 kD) kodiert ²³. ICP4 fungiert als ein Transaktivator der Genexpression und ist essentiell für die Virusreplikation. Die Deletion verhindert eine Replikation der d120 Viren in menschlichen Körperzellen, die ICP4 nicht komplementieren und trägt damit zur biologischen Sicherheit des Vektorsystems bei.

Die RR1 Zellen werden 24 Stunden nach der Transfektion mit HSV-1 d120 Helferviren infiziert. Die Infektion wird mit einer moi von 0,2 durchgeführt. Die Helferviren werden dazu in 500 µl DMEM Medium (ohne FBS) verdünnt. Das Medium wird von den Zellen abgesaugt und die Virusverdünnung wird zu den Zellen gegeben. Während der einstündigen Inkubation bei 37°C wird die Zellkulturplatte alle 12 Minuten geschwenkt. Am Ende der Inkubationszeit werden 4 ml DMEM Medium (10% FBS, 1% P/S) zugegeben. Die Zellkulturplatte wird nun für 48 Stunden bei 34°C inkubiert. Nach dieser Inkubation zeigt die lichtmikroskopisch beobachtete Vakuolisierung und Abrundung der Zellen einen zytopathischer Effekt an. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die erste Virusernte.

Erste Virusernte

Die Zellen werden mit Hilfe eines Schabers von der Zellkulturplatte gelöst und in ein verschließbares 15-ml Röhrchen überführt. Zunächst werden die Zellen dreimal in einem Trockeneis-/Ethanolbad schockgefroren und in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Anschliessend wird die Zellsuspension 5 mal für je 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 450, Branson, Danbury, USA). Die Leistung des Ultraschallgeräts wird dabei auf 80% der maximalen Leistung eingestellt. Das Schockfrieren und Auftauen sowie die Einwirkung des Ultraschalls auf die Zellsuspension fördert die Freisetzung der Virionen aus den Zellen.

Zwischen den Beschallungen wird die Probe auf Eis gehalten, um ein Überwärmen zu verhindern. Abschließend werden die Zelltrümmer bei 1500 rpm und 4°C für 15 Minuten (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert. Die Viruspartikel befinden sich nach der Zentrifugation im Überstand. Der Überstand kann bis zur Vermehrungsrunde bei -80 ° C gelagert werden.

Virusvermehrung

Zur Virusvermehrung werden am Vortag $4,5 \times 10^6$ RR1 Zellen auf einer 60-mm² Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden ist der Zellrasen mehr als 100% konfluent. Eine hohe Zelldichte wirkt sich positiv auf den Virustiter aus.

Zunächst wird das DMEM Medium von den Zellen abgesaugt, dann wird der virushaltige Überstand aus der ersten Virusernte (ca. 4 ml) auf die Platte pipettiert. Zusätzlich wird noch 1 ml DMEM Medium (10% FBS, 1% P/S) auf die Platte gegeben.

Die Inkubation erfolgt bei 34°C für 48 Stunden. Danach zeigt ein vollständiger zytopathischer Effekt an, dass die zweite Virusernte erfolgen kann.

Ultrazentrifugation zur Virusanreicherung der zweiten Virusernte

Zur Vorbereitung wird die Ultrazentrifuge (Beckman L8–70M, Unterschleissheim-Lohhof, Deutschland) mit dem SW 41 Rotor auf 4°C vorgekühlt. Die Zentrifugenröhrchen werden mit je 2 ml einer 25% Sucroselösung (gelöst in PBS) gefüllt. Der Überstand der zweiten Virusernte (ca. 5 ml) wird vorsichtig auf die Sucrose aufgetragen (ähnlich wie bei einem Ficollgradienten). Die Ultrazentrifugation erfolgt für zwei Stunden bei 24.000 rpm. Anschließend wird der Überstand dekantiert. Die Viruspartikel befinden sich im Pellet. Das Pellet wird in 100 µl PBS aufgenommen. Das Viruskonzentrat kann je nach Bedarf aliquotiert werden und wird dann in einem Trockeneis-/ Ethanolbad schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei –80°C.

„Plaque Assay“ zur Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des Titers der d120 Helferviren in der Vektorpräparation wird die 7B Zelllinie verwendet. Der tatsächliche Gehalt an Amplikonpartikeln in der Vektorpräparation wird dabei nicht erfasst. Erfahrungsgemäss kann höchstens mit einem Amplikonpartikel pro 100 Helferviren gerechnet werden.

Am Vortag werden 7×10^5 Zellen/Well auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Zur Titerbestimmung wird eine Verdünnungsreihe der Viren in PBS hergestellt. Es werden sechs verschiedene Verdünnungen im Bereich von 10^{-2} bis 10^{-7} angesetzt. Dann wird 1 ml der jeweiligen Virusverdünnung auf die Zellen gegeben. Während der einstündigen Inkubationsphase bei 37°C wird die 6-Well-Platte alle 12 Minuten geschwenkt. Es wird ein Overlay-Medium aus 2% low melting-point Agarose (LMP Agarose) hergestellt. Die LMP Agarose wird ca. 10 min vor Ende der Inkubationszeit aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 42°C 1:1 mit DMEM Medium (2x, 10% FBS, 1% P/S) gemischt. Nach Ende der Inkubationszeit wird der Virusüberstand abgesaugt. Der Zellrasen wird mit je 2 ml des warmen Overlay-Medium (ca. 37°C) überschichtet. Die Zellen inkubieren für 48 Stunden unter Standardkulturbedingungen bei 37°C . Zur Auswertung wird die gefestigte Agarose vorsichtig mit einem Spatel vom Zellrasen entfernt. Nach Anfärben mit 500 μl Gram-Kristallviolett Farbstoff, kann der Virustiter („plaque forming units“ (pfu)/ml) durch Auszählen der Plaques bestimmt werden. Es können regelmäßig Amplikonviren mit einem Titer der Größenordnung 1×10^8 pfu/ml hergestellt werden.

3.2 Herstellung von Amplikonvektoren mit dem Helfervirus-freien System

Transfektion der 2-2 Verpackungszelllinie

Die Herstellung von Helfervirus-freien Amplikonvektoren kann in verschiedenen permissiven Zellen erfolgen. Das Transfektionsprotokoll wurde für 2-2 Verozellen²⁴ optimiert, da sich mit dieser Zelllinie die beste Ausbeute erzielen lässt²⁵. Die 2-2 Zellen werden unter Standardkulturbedingungen in DMEM Medium kultiviert. Am Tag vor der Transfektion werden $1,2 \times 10^6$ 2-2 Zellen auf einer 60-mm² Zellkulturplatte ausgesät. Pro 60-mm² Zellkulturplatte werden je 150 µl Opti-MEM I in zwei 15-ml Röhren gegeben. In eines dieser Röhren werden 2 µg BAC-DNA (fHSVΔpacΔICP27), 0,6 µg Amplikonplasmid und 0,2 µg pEBH ICP27 plaziert. In das zweite Röhren werden 15 µl Lipofectamin pipettiert. Der Inhalt der beiden Röhren wird zusammengeführt und vorsichtig gemischt. Das Gemisch inkubiert für 45 min. bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden pro 60-mm² Zellkulturplatte 0,9 ml Opti-MEM I mit der Opti-MEM I / Lipofectaminmischung gemischt.

Die 2-2 Zellen werden durch zweimaliges Waschen mit Opti-MEN I auf die Transfektion vorbereitet. Das Opti-MEN I Medium wird von den Zellen abgesaugt und je 1,3 ml Lipofectaminmischung wird zu den Zellen gegeben. Die Zellen inkubieren für 5 Stunden bei 37°C. Danach wird die Lipofectaminmischung abgesaugt und die Zellen werden dreimal mit DMEM Medium (ohne FBS) gewaschen. Nach dem letzten Waschen werden 3,5 ml DMEM Medium (10% FBS, 1% P/S) zugegeben. Die Zellen inkubieren für drei Tage unter Standardkulturbedingungen bei 37°C.

Virusernte

Die Zellen werden mit Hilfe eines Schabers von der Zellkulturplatte gelöst und in ein verschließbares 15-ml Röhren überführt. Das Röhren wird dreimal in einem Trockeneis-/Ethanolbad schockgefroren und in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Danach wird die Zellsuspension einmal für 20 sec bei 20% der maximalen Leistung (Branson Sonifier 450, Branson, Danbury, USA) behandelt. Die Einwirkung des Schockfrierens und des Ultraschalls auf die Zellsuspension fördert die Freisetzung der Virionen aus den Zellen. Abschließend werden die Zelltrümmer bei 1500 rpm und 4°C für 15 Minuten (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments) abzentrifugiert. Die Viruspartikel befinden sich nach der Zentrifugation im Überstand.

Zentrifugation zur Virusanreicherung

Der Virusüberstand wird in ein 30-ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 2 Stunden bei 4° C und 13.000 rpm zentrifugiert (Sorvall SS34 Rotor). Das Pellet wird in 300 µl PBS (10% Saccharose) aufgenommen und je nach Bedarf aliquotiert. Die Aliquots werden in einem Trockeneis-/Ethanolbad schockgefroren und bei - 80° C gelagert.

3.3 Übersicht der Zelllinien

Zelllinie (Beschreibung)	Kulturmedium	Verwendungszweck
RR 1 ¹⁴ (ICP4 positives BHK-1 Derivat)	DMEM (1x) 100U/ml P/S G418 (400 µg/ml) Glutamin Na-Pyruvat 10% FBS	Verpackungszelllinie für das Helfervirus-abhängige Amplikonsystem
2-2 Verozellen ²⁴ (ICP27 positive Verpackungszelllinie)	DMEM (1x) 100U/ml P/S G418 (500 µg/ml) 2mM L-Glutamin 10% FBS	Verpackungszelllinie für das Helfervirus-freie Amplikonsystem
7B (ICP4 positives Vero Derivat)	DMEM (1x) 100 U/ml P/S 2 mM L-Glutamin 10% FBS	Plaque Assay zur Titerbestimmung
NIH 3T3 (Maus Fibroblasten, ATCC, Rockville, USA)	DMEM (1x) 100 U/ml P/S 2 mM L-Glutamin 10% FBS	Expressionsstudien zur Etablierung des Vektorsystems
A20 (murines B- Zell Lymphom, ATCC, Rockville, USA)	RPMI 1640 100 U/ml P/S 2 mM L-Glutamin 10% FBS 0,05 mM β-Mercaptoethanol	Expressionsstudien zur Vorbereitung von <i>in vivo</i> Experimenten zur Leukämievakzination
NPLC ⁹ (humane Hepatozyten)	DMEM (1x) 100 U/ml P/S 2 mM L-Glutamin 10% FBS	Expressionsstudien zur Vorbereitung von <i>in vivo</i> Experimenten zum Leber- Gentransfer

3.4 Ficollgradient zur Isolation mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark

Die Gewinnung von mononukleären Zellen (MNZ) aus menschlichem Knochenmark wird mittels Ficoll-Dichtegradient durchgeführt. Dazu wird heparinisiertes Knochenmark 1:1 mit PBS verdünnt und in einem 50-ml Röhrchen über 15 ml Ficoll-Hypaque geschichtet. Die Probe wird 15 min bei 2100 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments). Die MNZ können nach der Zentrifugation aus der Interphase zwischen der Ficoll-Lösung und dem Plasma aspiriert werden. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und werden dann in das entsprechende Kulturmedium aufgenommen.

3.5 Standardkulturbedingungen

37°C, 5% CO₂, 98% Luftfeuchtigkeit, (21 % O₂)

3.6 Infektion von Zelllinien und primären Zellen mit HSV-1 Amplikonvektoren

Um Zelllinien und primäre Zellen auf die Infektion mit HSV-1 Amplikonvektoren vorzubereiten, werden diese zunächst mit Kulturmedium (ohne FBS) gewaschen. Die Infektion der Zellen erfolgt dann in einem möglichst geringen Volumen des entsprechenden Kulturmediums. Die Zellen werden 1 Stunde bei 37 °C mit dem Vektor inkubiert, dann zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit dem entsprechendem Kulturmedium versorgt.

3.7 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Nachdem ca. 4×10^6 Zellen durch Zentrifugation (1400 rpm, 5 min, Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments) sedimentiert worden sind, werden sie in Einfriermedium (70% des jeweiligen Kulturmediums, 20% FBS, 10% DMSO) resuspendiert und auf eine geeignete Anzahl von Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen werden anschließend sofort in eine Einfrierbox überführt und bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitaufbewahrung können die Zellen nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt werden. Zum Auftauen werden die Röhrchen schnell auf 37°C erwärmt und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Unter ständigem Schütteln werden 10 ml Kulturmedium tropfenweise zugegeben. Die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation sedimentiert und ausgesät.

3.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)

Die Durchflusszytometrie wird mit dem FACScan Durchflusszytometer der Fa. Becton-Dickinson (San Jose, CA, USA) durchgeführt. Die Zellen werden in ein FACS-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (1400 rpm, 5 min, Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments) pelletiert. Der Überstand wird dekantiert. Das Pellet wird in 250-500 µl FACS-Puffer (PBS, 5% FBS, 0,1% NaN₃) resuspendiert. Die Hälfte dieses Volumens wird zur Erstellung einer Isotypkontrolle in ein zweites Röhrchen überführt. Die Isotypkontrolle diente der Bestimmung des „Background“ durch unspezifische Antikörperbindung sowie der entsprechenden Justierung des Durchflusszytometers. Es erfolgt die Färbung mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper. Tab. 3.8 zeigt eine Übersicht der verwendeten Antikörper. Nach 30 min Inkubation bei 4°C werden nicht- gebundene Antikörper durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer und anschließende Zentrifugation herausgewaschen. Die Zellen werden für 30 min bei 4°C mit einer Fixierlösung (PBS, 0,02% Paraformaldehyd, 0,1% NaN₃) inkubiert. Die Fixierung dient der Inaktivierung der HSV-1. Zur Messung werden die Zellen in ca. 350 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Tab. 3.8: FACS-Antikörper

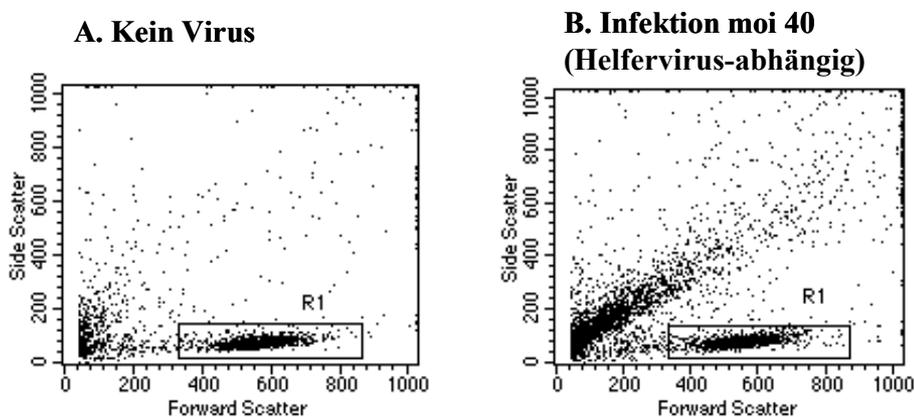
Antikörper	Isotypkontrolle	Herstellerfirma
CD 3 FITC	IgG 1	Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD10 FITC	IgG 1	Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD 14 FITC	IgG 1	Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD 19 FITC	IgG 1	Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD 33 FITC	IgG1	Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD66B FITC	IgG1	Immunotech, Krefeld, Deutschland
mCD70 PE, murin	IgG2b	Pharmingen, San Diego, USA
H-2KD FITC	IgG2a	Pharmingen, San Diego, USA

3.9 Beurteilung der vektorbedingten Zytotoxizität mittels Durchflusszytometrie

Die Beurteilung der vektorbedingten Zytotoxizität erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Da ausschliesslich Paraformaldehyd-fixierte Zellen verwendet werden, ist die Beurteilung der Zellvitalität mittels Propidiumjodid nicht möglich. Stattdessen wird die Vitalität anhand der FACS-Morphologie der Zellen beurteilt: In der „forward vs. side scatter“ Darstellung werden die Einzelzellen aufgrund ihrer Größe („forward scatter“) und ihrer Granularität („side scatter“) abgebildet. Mit Hilfe dieser Darstellungsweise lassen sich morphologisch homogene Zellpopulationen, wie z.B. Lymphozyten oder Granulozyten identifizieren (s. Abb. 3.9). Diese Zellpopulationen können durch die Plazierung eines sog. „gates“ im dot-plot quantifiziert werden. Auch abgestorbene Zellen bzw. Zellrümpfer kommen in einer charakteristischen Weise zur Darstellung.

Um die zytotoxische Wirkung der Amplikonvektoren auf die infizierten Zellen zu quantifizieren, wird mit Hilfe der „forward vs. side scatter“ Darstellung der Anteil der vitalen Zellen der Negativkontrolle (native Zellen, keine Infektion) mit dem Anteil der vitalen Zellen der infizierten Probe verglichen und folgende Gleichung aufgestellt: (% vitale Zellen i.d. Negativkontrolle.) – (% vitale Zellen i.d. infizierten Probe) = vektorbedingte Zytotoxizität.

Abb. 3.9: Abschätzung der vektorbedingten Zytotoxizität mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist die „forward vs. side scatter“ Auswertung einer ALL Probe: **(A)** Negativkontrolle (native Zellen, keine Infektion); **(B)** Infektion mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren (moi 40). In (A) befinden sich 61% der Zellen in der Region R1 und werden daher als vitale Zellen gewertet. In (B) befinden sich 28% der Zellen in der Region R1. Die vektorbedingte Zytotoxizität liegt in diesem Beispiel daher bei $61\% - 28\% = 33\%$.



3.10 Primäre Zellen

Die Genehmigung für die Verwendung geringer Mengen primärer Zellen zu Forschungszwecken liegt an der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und – Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor.

3.11 Tiere und Tierversuche

Sechs Wochen alte männliche BALB/C Mäuse werden von der Firma Harlan Nederland (Horst, Niederlande) bezogen. Die Tierversuche zum Leber- und Muskelgentransfer werden am Virologischen Institut der Universität Zürich (Schweiz) durchgeführt. Eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung liegt vor.

3.12 Vektorinjektion / Blutentnahme

Die Tiere werden jeweils durch Methoxyfluran- (Metofane, Schering-Plough Animal Health, USA) Inhalation anästhesiert. Je 100 µl Vektorpräparation werden in die Schwanzvene bzw. die Muskulatur der hinteren Extremität der Tiere aus den Versuchsgruppen injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppen erhalten analog 100 µl PBS i.v bzw. i.m.. Die Blutentnahme (ca. 30 µl) erfolgt an den Tagen 1, 3, 5 und 8 durch retrobulbäre Punktion. Das Blut wird in einem 1,5-ml Eppendorf Gefäß aufgefangen.

3.13 Aufbereitung der Proben und SEAP-Chemilumineszenz Messung

Unmittelbar nach der Blutentnahme wird das Serum durch zweifache Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus Instruments, 5000 rpm, 2 min) isoliert. Es folgt eine Inaktivierung des Serums bei 65°C für 30 min. Die SEAP ist nach den Angaben des Hersteller (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) bei dieser Temperatur stabil. Anschließend werden die Proben bei –20°C bis zur SEAP Messung gelagert. Die SEAP-Chemilumineszenz Reaktion erfolgt mit dem „Great EscAPe SEAP Kid“ (Clontech Laboratories). Die Chemilumineszenz Messung erfolgt mit dem MicroLumat Plus LB 96 V (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Deutschland).

Molekularbiologie

3.14 Analyse von Plasmid DNA in Agarosegelen

Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wird ein 0,5-2 % Agarosegel verwendet. Agarose wird in entsprechender Konzentration in TAE-Puffer durch Kochen gelöst und mit Ethidiumbromidlösung versetzt (Endkonzentration 1 µg/ml). Man gießt die auf etwa 60° C abgekühlte Lösung in eine Gelapparatur und setzt einen Taschenformer in das noch flüssige Gel. Als Elektrophoresepuffer dient TAE-Puffer. Die zu analysierenden DNA-Proben werden mit einem Loading-Buffer versetzt und in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Stromstärke von 80 mA. Die nach ihrer Größe aufgetrennten DNA-Fragmente werden im UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert (z.B. Fluor-S Multimanager, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

3.15 Isolierung von DNA nach Restriktionsspaltung aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes nach einer Restriktionsspaltung wird das DNA-Gemisch (ca. 2 µg DNA) in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese erfolgt die Exzision der gewünschten Bande unter UV Licht. Die Elution der DNA aus dem Gelstück erfolgt mit dem NucleoSpin Kid (Fa. Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wird in 50 µl Aqua dest aufgenommen.

3.16 Ligation von DNA

Die Ligation der Fragment- und Vektor DNA erfolgt in einem Verhältnis von 2:1 bis 4:1.

Die Ligation wird durch 1 µl T4 - DNA Ligase (New England BioLabs, 200 U/µl) katalysiert und erfolgt unter Zugabe von 2 µl T4-DNA Ligase Puffer (New England BioLabs, 10x konzentriert). Der Ligationsansatz inkubiert bei 16°C über Nacht. Anschließend werden 100 µl kompetente Bakterien (z.B. E. coli DH10B) mit 2 µl des Ligationsansatzes transformiert.

3.17 Dephosphorylierung von DNA

Um eine intramolekulare Ligation von Plasmidvektoren zu vermeiden, werden deren 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu werden 20 µl einer DNA-Restriktionsreaktion (ca. 2 µg DNA) mit 2 µl Phosphatase Puffer (z.B. NEB 3, New England BioLabs) und 1,6 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (New England BioLabs, 10 U/ml) versetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Reinigung der DNA mittels Phenol/Chloroformextraktion.

3.18 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA

100 µl kompetente Bakterien (z.B. DH10B, Invitrogen life technologies) werden auf Eis aufgetaut, mit Plasmid DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz für 2 Minuten auf 42°C erwärmt und wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0,5 ml SOC-Medium wird die Bakteriensuspension 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubation werden die Bakterien durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (1400 rpm, 5 min) sedimentiert, der Überstand wird dekantiert. Die Bakterien werden in den verbleibenden ca. 100 µl Medium resuspendiert und der gesamte Transformationsansatz auf einer Selektions-Agarplatte (z.B. Ampicillin, 50 µg/ml) ausgestrichen. Die Platte inkubiert über Nacht bei 37°C.

3.19 DNA Präparation in analytischer Menge („Miniprep“ durch alkalische Lyse)

Es werden 10 bis 20 Kolonien von der Selektions-Agarplatte gepickt, um Vorkulturen in je 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C und 200 rpm zu inkubieren. Jeweils 1,5 ml der Vorkulturen werden in ein 2-ml Eppendorf-Cup überführt. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 30 Sekunden pelletiert.

Der Überstand wird vollständig dekantiert, die Bakterien werden durch alkalische Lyse unter Verwendung der Puffer 1, 2 und 3 der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) lysiert. Der Lysedebris wird durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (1500 rpm, 5 min) pelletiert, die DNA befindet sich im Überstand und wird in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Es werden je 1-ml Isopropanol zugegeben, um die DNA zu präzipitieren. Die DNA wird durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (10 min, 10.000 rpm) pelletiert, das Isopropanol wird behutsam abgesaugt. Es schließt sich ein letzter Waschvorgang mit 80% Ethanol an. Anschließend wird die DNA in 30 µl Aquadest aufgenommen.

3.20 Kulturmedien, Zusätze und molekularbiologische Agentien

Dulbecco's MEM (1x)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's MEM (2x)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 (1x)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Iscove's modified Dulbecco's Medium	Sigma, Gillingham, GB
Opti-MEN I reduced-serum medium	Life Technologies, Paisley, GB
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S, 10000E/ml)	Gibco, Paisley, GB
Neomycin (G418)	Gibco, Paisley, GB
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Na – Pyruvat	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Trypsin EDTA	PAA Laboratories, Österreich
β – Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA
DMSO	Sigma, Gillingham, GB
Gram-Kristallviolett	Sigma, Gillingham, GB
Low melting point (LMP) -Agarose	Sigma, Gillingham, GB
Lipofectamine	Gibco-BRL, Paisley, GB
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
LB - Medium	Sigma, Gillingham, GB
Gram Kristall Violett Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bakterien	DH10B (Invitrogen life technologies, Carlsbad, USA)
DNA–Fragmentlängenstandard	1 kb DNA ladder (Invitrogen life technologies, USA)
Enzyme	New England BioLabs, Beverly, USA, Boehringer, Mannheim, Deutschland
TAE – Puffer	20 mM Tris - HCl, 10 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
Ficoll-Hypaque	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden

Ergebnisse

4.1 Vorversuche zum Gentransfer mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren

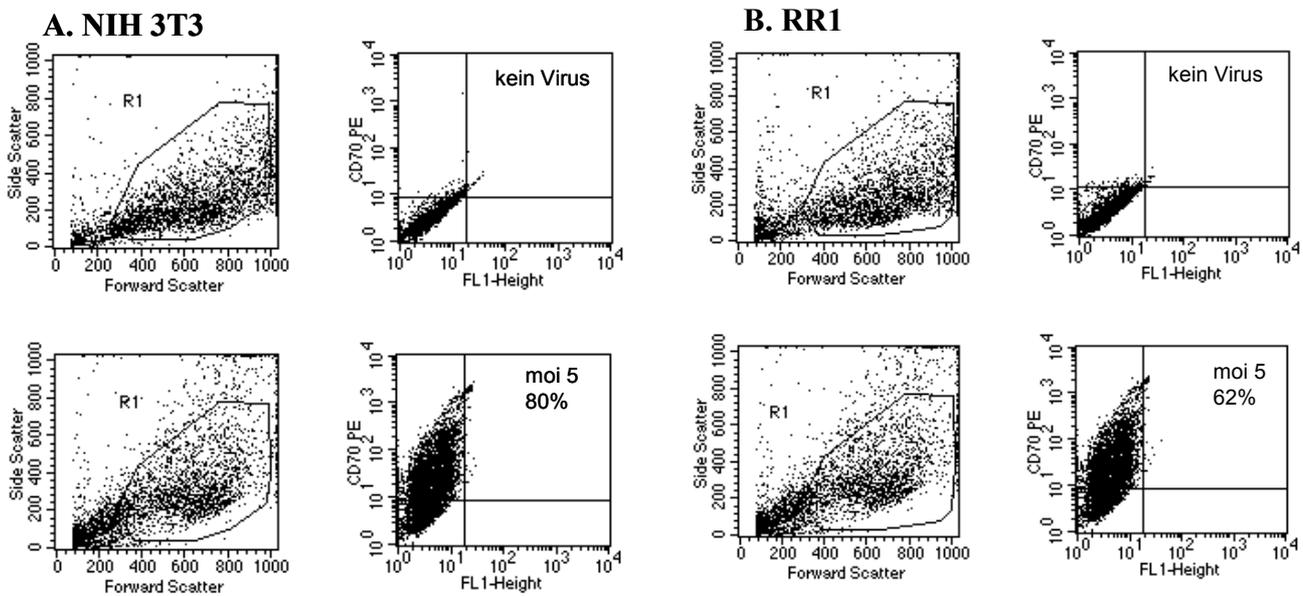
Um die Funktionsfähigkeit des Vektorsystems in permissiven Zelllinien zu dokumentieren, wurden NIH 3T3 Zellen und RR1 Zellen mit Amplikonvektoren infiziert, welche das murine CD70 Gen enthielten. Beim CD70 handelt es sich um einen immunologischen Kostimulator, der nach der Infektion als Reporterprotein an der Zelloberfläche exprimiert wird und durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann.

Es wurden je 1×10^5 Zellen mit drei verschiedenen *multiplicities of infection* (moi) infiziert. Die CD70 Expression wurde 24 Stunden nach der Infektion durchflusszytometrisch untersucht. Dabei dienten native (nicht mit Amplikonvektor infizierte) NIH 3T3 bzw. RR1 Zellen als Negativkontrolle (Abb. 4.1). Eine moi von 1 lieferte 20% (NIH 3T3) bzw. 50% (RR1) CD70 positive Zellen. Eine moi von 5 lieferte 80% (NIH 3T3) bzw. 62% (RR1) CD70 positive Zellen (Tab.4.1).

Tabelle 4.1: NIH 3T3 und RR1 Zellen wurden mit Amplikonvektoren infiziert, die das murine CD70 Gen enthalten. Die Tabelle zeigt den durchflusszytometrisch ermittelten Anteil der CD70 positiven Zellen 24 Stunden nach der Infektion.

moi	NIH 3T3 Zellen % CD70 pos. Zellen	RR1 Zellen % CD70 pos. Zellen
kein Virus	0	0
0,1	3	5
1	20	50
5	80	62

Abbildung 4.1: Repräsentative FACS-Analysen 24 Stunden nach der Infektion. Bei der gewählten „dot blot“-Darstellung repräsentieren die Punkte jeweils Einzelzellen. In der linken Spalte der Abbildung A. und B. ist der sog. „forward vs. side scatter“ dargestellt, der die Morphologie (Größe und Granularität) der Zellen wiedergibt. Die rechte Spalte zeigt jeweils einen „dot blot“, bei dem die Zellen / Punkte umso höher auf der Ordinate wandern, je mehr CD70 Moleküle auf ihrer Oberfläche vorhanden sind. **(A)** Infektion von NIH 3T3 **(B)** RR1 Zellen mit moi 5. Die obere Reihe zeigt native Zellen (Negativkontrolle, „kein Virus“). Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der CD70 positiven Zellen.



4.2 Gentransfer in normale und neoplastische Zellen der Hämatopoese

Der erste Teil der Arbeit hat die genetische Modifikation hämatopoetischer Zellen im Hinblick auf die Erzeugung einer Leukämievakzine zum Ziel. Zunächst wurde der Gentransfer in reife (mononukleäre) und unreife (CD34+) Zellen untersucht. In einem zweiten Schritt erfolgte der Gentransfer in primäre akute leukämische Blasten. Vorbereitend auf ein Tiermodell der Leukämievakzination wurde abschließend der Gentransfer in die murine Lymphomzelllinie A20 untersucht.

4.2.1 Gentransfer in mononukleäre Zellen aus humanem Knochenmark

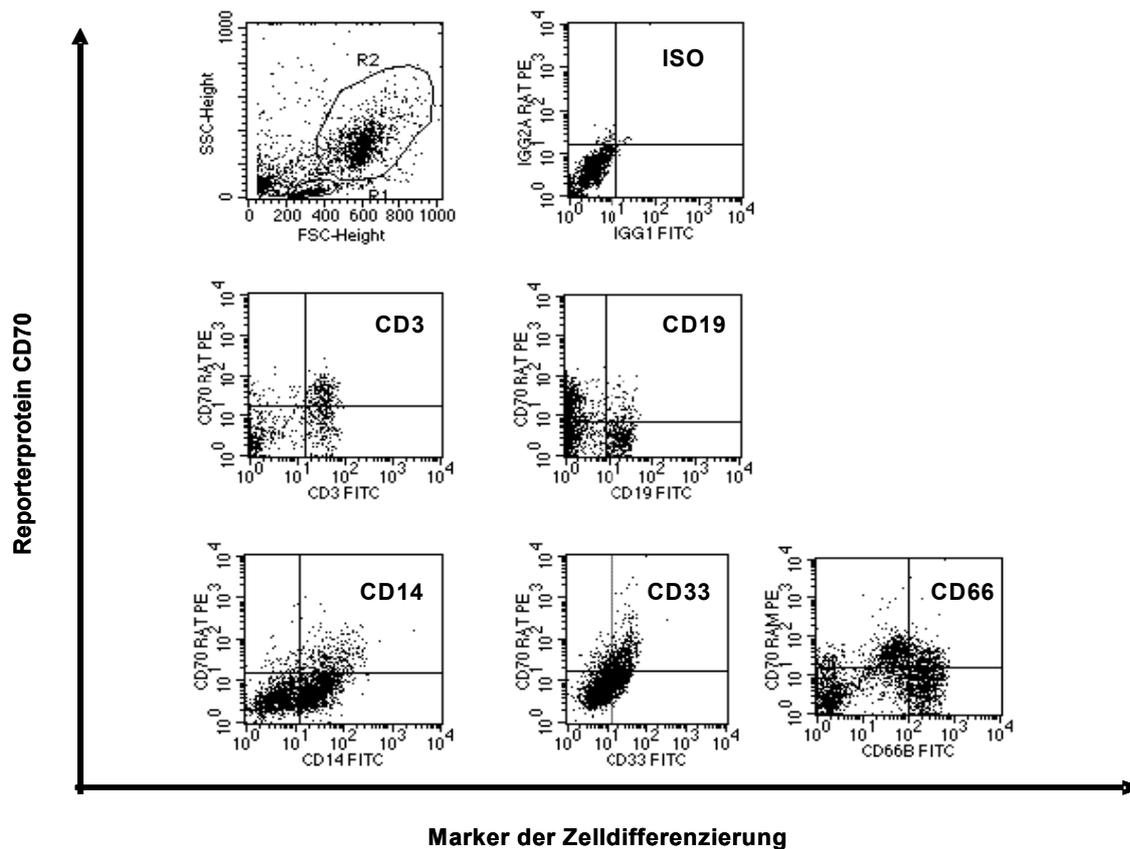
Um das Spektrum permissiver Zellen in der normalen menschlichen Hämatopoese zu charakterisieren, wurden mononukleäre Zellen (MNZ) aus dem Knochenmark von 6 gesunden Spendern mit Hilfe eines Ficollgradienten isoliert und mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren infiziert. Je 5×10^5 MNZ wurden mit einer MOI 5 infiziert und 24 bzw. 48 Stunden nach der Infektion auf die Expression des Reportergens CD70 untersucht. Um zwischen den verschiedenen Zellpopulationen des Knochenmarks unterscheiden zu können, wurden die Zellen vor der Auswertung aliquotiert und je 1×10^5 Zellen einer Doppelfärbung mit dem Anti-CD70 Antikörper und einem Antikörper gegen einen Marker der Zelldifferenzierung (s. Tab. und Abb. 4.2.1) unterzogen.

Die Zusammenstellung der Ergebnisse in Tabelle 4.2.1 verdeutlicht, dass von den untersuchten Zellpopulationen die CD3 positiven T-Zellen am empfänglichsten für den Amplikon vermittelten Gentransfer sind. Die Auswertung der vektorbedingten Zytotoxizität (hier nicht dargestellt) ergab Werte zwischen 0–19% Zytotoxizität (bei einer Probe 34%).

Tabelle 4.2.1: Transduktion humaner MNZ. Dargestellt ist der Anteil der CD70 positiven MNZ 24 h und 48 h nach der Infektion. Es erfolgte eine Doppelfärbung auf CD70 und einen Marker der Zelldifferenzierung.

Marker	erkannte Zelldifferenzierung	% der CD70 pos. Zellen (Median / Spannweite) 24 Stunden nach Infektion	% der CD70 pos. Zellen (Median / Spannweite) 48 Stunden nach Infektion
CD3	T-Zellen	39 / 29-67 (n=4)	38 / 28-48 (n=4)
CD14	Monozyten	21 / 11-52 (n=3)	36 / 18-44 (n=4)
CD19	B-Zellen	23 / 18-31 (n=3)	9 / 7-22 (n=3)
CD33	Myelomonozytäre Zellen	18 / 15-44 (n=4)	36 / 24-48 (n=3)
CD66B	Granulozyten	19 / 16-22 (n=2)	22 / 8-44 (n=4)

Abb. 4.2.1: Transduktion mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark. Dargestellt ist der „forward vs. side scatter“ (FSC/SSC), die Isotypkontrolle (ISO, IgG1 FITC) und die Doppelfärbungen, die das Reporterprotein CD70 und einen Marker der Zelldifferenzierung zeigen.



4.2.2 Gentransfer in selektionierte humane CD34 positive Zellen

Humane CD34 positive hämatopoetische Stammzellen (CD34+ Zellen) bieten ein interessantes Ziel für die Gentherapie verschiedener angeborener und erworbener Erkrankungen. Gegenwärtig werden diverse Vektorsysteme zur optimalen genetischen Manipulation dieser Zellen erprobt ²⁶.

Hier wurde untersucht, mit welcher Effizienz HSV-1 Amplikonvektoren humane CD34+ Zellen transduzieren können. Dazu wurden CD34+ Zellen aus dem peripheren Blut bzw. dem Knochenmark von 6 Spendern/Patienten isoliert. Der Anteil der CD34+ Zellen nach der Isolation wurde durchflusszytometrisch bestimmt und betrug zwischen 94,6 und 99,1% (bei einem Spender /Patient betrug die Reinheit nur 60%). Die Zellen wurden kurzfristig (1-2 Tage) kultiviert und mit verschiedenen moi (5, 10, 20, 30) infiziert. Zwei Proben wurden mit Helfervirus-freien Amplikonvektoren infiziert.

Die erreichte Transduktionsrate und die vektorbedingte Zytotoxizität sind in Tabelle 4.2.2 zusammengefasst. Dabei zeigte sich, dass die CD34+ Zellen besonders empfindlich gegenüber der vektorbedingten Zytotoxizität sind. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Infektion mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren starben 13-61% der CD34+ Zellen durch die Einwirkung der Amplikonvektoren ab.

Da die genetische Modifikation der CD34+ Zellen i.d.R. eine langfristige Genexpression zum Ziel hat, ist eine möglichst geringe Zytotoxizität erstrebenswert. Aus diesem Grund wurde bei zwei Spendern/Patienten die Transduktion mittels Helfervirus-freier Amplikonvektoren untersucht (Spendern/Patienten 6 und 7, Abb. 4.2.2). Das Experiment verdeutlicht, dass die Helfervirus-freien Amplikonvektoren die CD34+ Zellen mit annähernd gleicher Effizienz und deutlich geringerer Zytotoxizität transduzieren.

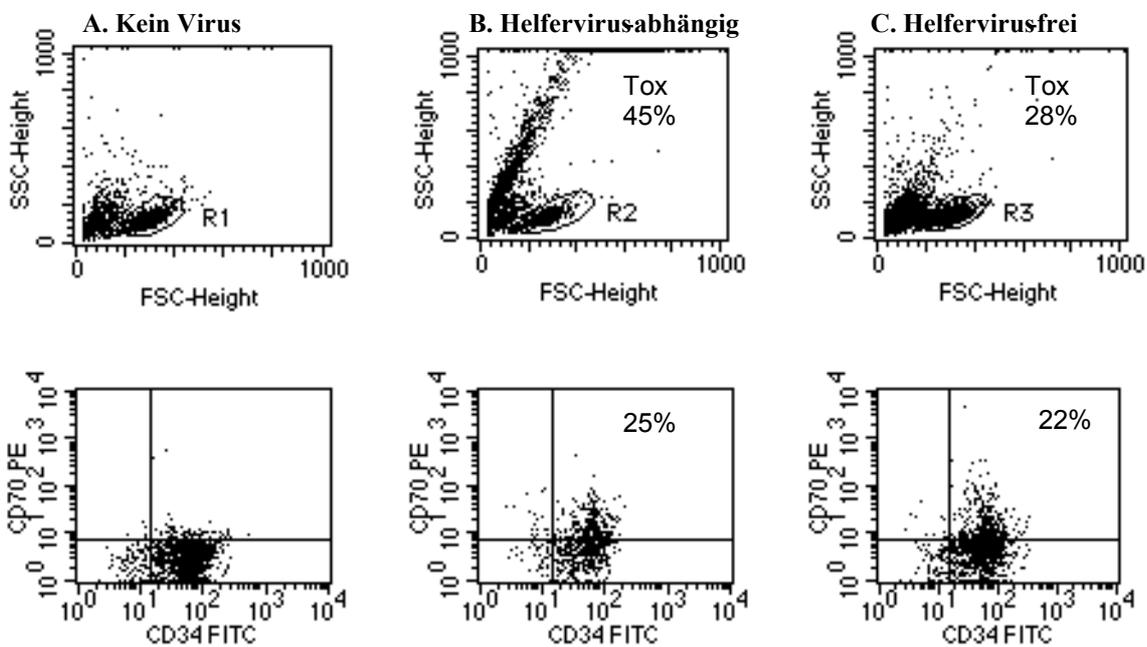
Tab. 4.2.2: Transduktion selektionierter humaner CD34+ Zellen mit Helfervirus-abhängigen (Spender/Patient 1-6) und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (Spender/Patient 5 und 6).

Spender / Patient	moi	Zeitpunkt der Messung	% CD70 positiven Zellen	% vektor-bedingte Zytotoxizität
1	5	24 h	6	20
	10		6	25
	20		8	30
2	20	20 h	8	13
3	5	20 h	10	25
	10		16	28
	20		37	48
4	30	24 h	6	41
5	30	20 h	25	45
	BAC*		22	28
6	30	20 h	24	61
	BAC**		26	45

* 90 µl Helfervirus-freie Vektorpräparation.

** 60 µl Helfervirus-freie Vektorpräparation.

Abbildung 4.2.2: Transduktion selektionierter humaner CD34+ Zellen. Dargestellt ist die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten des Spender/Patienten 5. **(A)** Negativkontrolle (native Zellen, „Kein Virus“). **(B)** CD34+ Zellen 20 Stunden nach der Infektion mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren (moi 30). Die vektorbedingte Zytotoxizität von 45% spiegelt sich im „forward vs. side scatter“ (FSC/SCC) anhand der Abnahme der Zellen in der Region R2 und der Zunahme der Zellrümmer wieder. **(C)** CD34+ Zellen 20 Stunden nach Infektion mit Helfervirus-freien Amplikonvektoren (90 µl). Die vektorbedingte Zytotoxizität beträgt bei vergleichbarer Transduktionsrate lediglich 28%.



4.2.3 Gentransfer in primäre akute leukämische Blasten

Bei der Erstellung einer Leukämievakzine soll die geringe Immunogenität der leukämischen Blasten durch die Einführung von Genen, die für Immunmodulatoren kodieren, verstärkt werden²⁷. Da sich akute lymphatische Blasten bisher weitgehend resistent gegenüber der Transduktion mit klinisch zugelassenen Vektoren erwiesen haben¹⁹, wurde hier untersucht, mit welcher Effizienz HSV-1 Amplikonvektoren primäre akute lymphatische und myeloische leukämische Blasten transduzieren können.

Dazu wurden leukämische Blasten von 10 Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und 4 Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) durch einen Ficollgradienten aufgereinigt und je 1×10^5 Zellen mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren (moi 5, 20, 30-50) infiziert. Alle Patienten hatten zum Zeitpunkt der Probengewinnung einen hohen Blastenanteil (>80%) im peripheren Blut bzw. im Knochenmark.

Um die Blasten von nicht-neoplastischen Zellen unterscheiden zu können, erfolgte eine Doppelfärbung (ALL: Reporterprotein CD70 und B-Zellmarker CD19 bzw. CD10. AML: CD70 und Myeloblastenmarker CD33 bzw. CD34; siehe Abb. 4.2.4 I).

Bei den ALL Blasten wurde nach 24 Stunden eine Transduktionsrate von $10 \pm 3\%$ (moi 5) bis $42\% \pm 14\%$ (moi 30-50) erreicht. Die vektorbedingte Toxizität variierte 24 Stunden nach der Infektion zwischen 6 % - 26 % (moi 5) bzw. 3 % - 43% (moi 30 - 50).

Die Transduktion der AML Blasten mit moi 20 lieferte 24 Stunden nach der Infektion $21\% \pm 13\%$ CD70 positive Zellen. Mit moi 30-50 wurde eine Transduktionseffizienz von $29 \pm 10\%$ erreicht (Abb. 4.2.3 II). Die vektorbedingte Toxizität variierte im Fall der AML Proben zwischen 11% – 39%.

Abbildung 4.2.3 I: Transduktion akuter leukämischer Blasten. Gezeigt ist die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten von zwei Patientenproben. Die Auswertung bezieht sich auf das „Lymphozytengate“ (Region R1). Die obere Reihe zeigt die Negativkontrolle (native Zellen, „kein Virus“). **(A) ALL.** Der hohe Blastenanteil der Proben wird durch die CD10 Färbung verdeutlicht. Infektion mit moi 40 resultierte in 48% CD70 positive Blasten. **(B) AML.** Die Blasten exprimieren den myeloischen Marker CD33. Infektion mit moi 30 lieferte 16% CD70 positive Blasten.

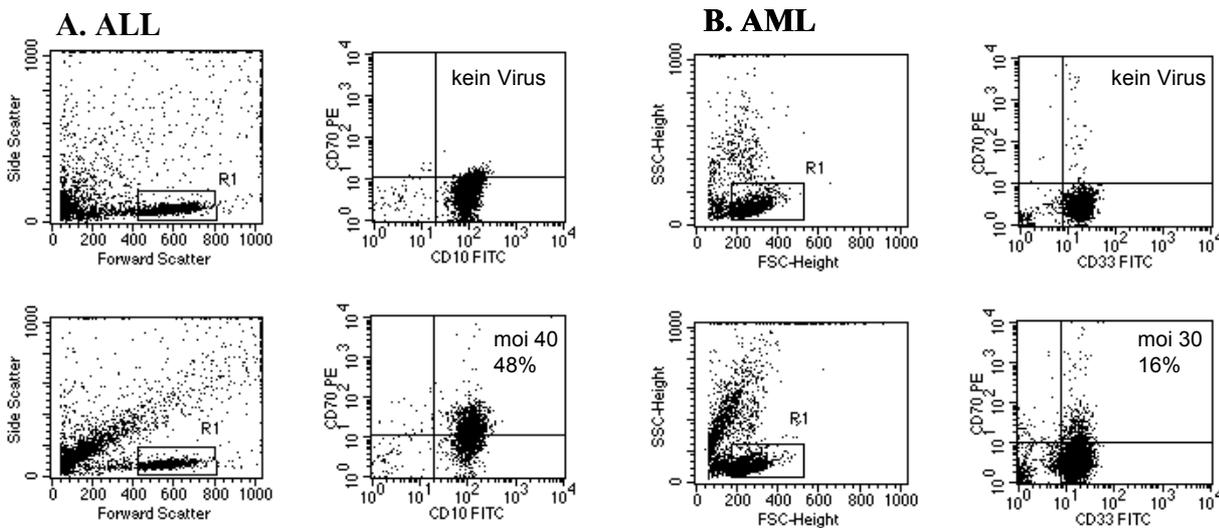
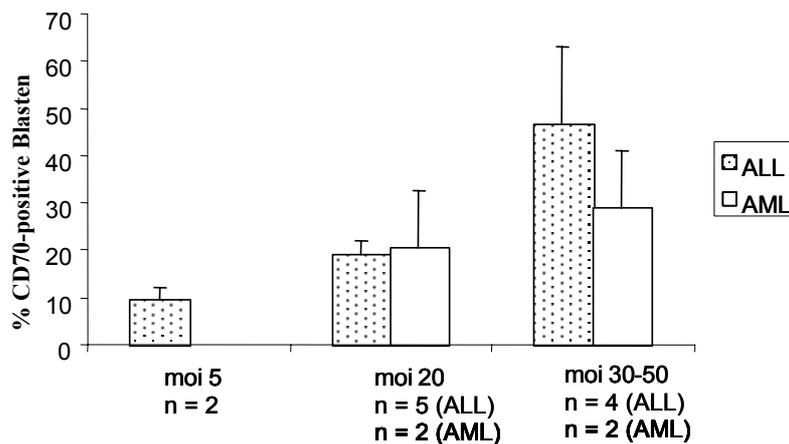


Abb. 4.2.3 II: Gentransfer in ALL und AML Blasten. Dargestellt ist der Anteil der CD70 positiven Blasten 24 Stunden nach der Transduktion mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren (moi 5, 20, 30-50).



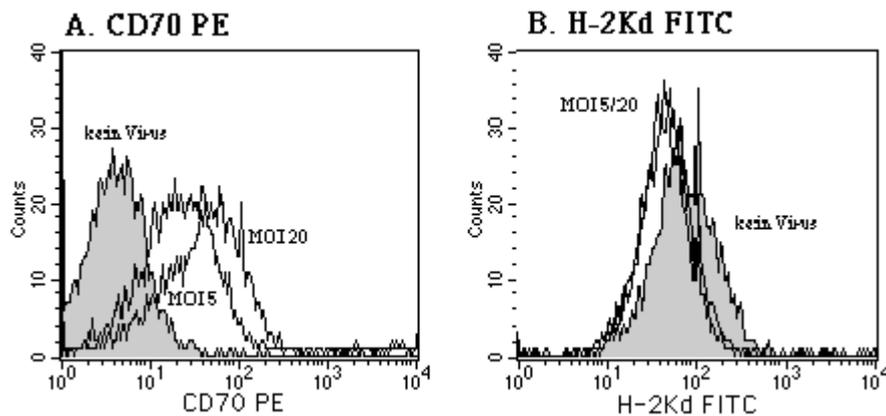
4.2.4 Gentransfer in die murine Lymphomzelllinie A20 und Untersuchung der Modulation der MHC Klasse I Expression durch HSV-1 Amplikonvektoren

In Vorbereitung auf ein murines Modell der Leukämievakzination wurde der Gentransfer in die murine prä-B lymphoblastische Zelllinie A20 untersucht.

Für eine erfolgreiche Tumorimmunantwort durch zytotoxische T-Zellen ist die spezifische Erkennung eines Antigens notwendig. Zytotoxische T-Zellen erkennen jedoch keine intakten Proteinantigene, sondern Peptide aus intrazellulären Molekülen (z.B. tumorassoziierte Antigene), die von MHC-I Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Mehrere Autoren haben berichtet, dass nach einer Infektion mit HSV-1 Viren das herpesvirale Protein ICP47 die Synthese von MHC Klasse I Molekülen im endoplasmatischen Retikulum und deren Transport zur Zelloberfläche hemmt ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. Eine MHC I Herabregulation infolge einer Infektion mit Amplikonvektoren wäre demnach ein potentiell Hindernis für die Erzeugung einer wirksamen Leukämievakzine. Hier wurde anhand der prä-B lymphoblastischen Zelllinie A20 untersucht, wie ausgeprägt die Modulation der MHC Klasse I Moleküle durch HSV-1 Amplikonvektoren auf rasch proliferierenden hämatopoetischen Zellen ist. Anhand einer Doppelfärbung des Reportermoleküls CD70 und der MHC Klasse I Moleküle (H-2Kd bei der Maus) wurden sowohl die Gentransfereffizienz als auch die Modulation der MHC Klasse I Expression nach Infektion mit HSV-1 Amplikonvektoren untersucht.

Dazu wurden je 1×10^5 A20 Zellen mit einer moi 5 infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden sowohl die MHC I Expression als auch die CD70 Expression durchflusszytometrisch untersucht. Die Abbildung 4.2.4 A zeigt eine CD70 Expression von 70 % (moi 5) bzw. 90% (moi 20). In der Abb. 4.2.4 B ist die Veränderung der MHC I (H-2Kd) Fluoreszenzintensität der infizierten Zellen im Vergleich zu einer nicht-infizierten Negativkontrolle dargestellt. Sowohl bei der Infektion mit moi 5 als auch bei moi 20 lässt sich lediglich eine marginale Reduktion der H-2Kd Fluoreszenzintensität erkennen.

Abbildung 4.2.4: Untersuchung des Gentransfers und der Modulation der MHC Klasse I (H-2Kd) Expression nach Infektion der A20 Zellen mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren. Dargestellt ist eine Histogramm-Auswertung. Dabei wird die Anzahl der Ereignisse (Zellen) auf der Ordinate aufgetragen. Je stärker die Fluoreszenzaktivität der gebundenen CD70 bzw. H-2Kd Antikörper ausgeprägt ist, umso weiter verlagert sich die Verteilungskurve auf der Abszisse nach rechts. **(A)** Die Infektion der A20 Zellen mit HSV-1 Amplikonvektoren führt zu 70% (moi 5) bzw. 90% (moi 20) CD70 positiven A20 Zellen 24 Stunden nach der Infektion. **(B)** Dieselbe Probe wurde auch auf MHC Klasse I (H-2Kd) Expression untersucht. Im Vergleich zu den nativen A20 Zellen (Negativkontrolle, „kein Virus“) ist bei den infizierten Zellen nur eine marginale Abnahme der H-2Kd Fluoreszenzintensität zu beobachten.



4.3 Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren für den Gentransfer in die Leber und Muskulatur

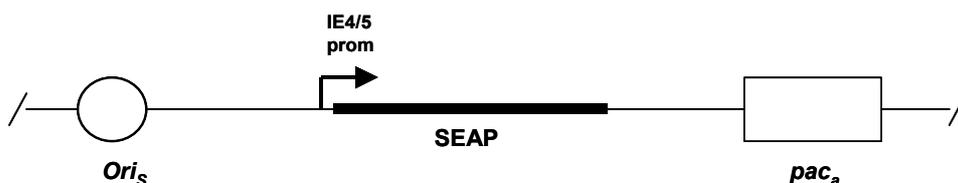
Der zweite Teil der Arbeit hatte die Etablierung eines Modells der Gentransfertherapie zum Ziel. Insbesondere wurde der Leber- und Muskel-gerichtete Gentransfer mit HSV-1 Amplikonvektoren untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene HSV-1 Vektorkonstrukte, die ein Reportergen enthalten, erzeugt.

4.3.1 Vektorkonstrukte

Die Sekretierte Alkalische Phosphatase (SEAP) hat sich als sensitives Reportermolekül für die Untersuchung von Expressionsvektoren bewährt²⁸. Das hier vorgestellte Modell der Gentransfertherapie bedient sich dieses sekretierten Moleküls als Reporter für die Genexpression *in vitro* und *in vivo*. Der Gentransfer des SEAP Reportergens erfolgte sowohl mit konventionellen HSV-1 Amplikonvektoren als auch mit HSV-1/AAV und HSV-1/EBV Hybridvektoren.

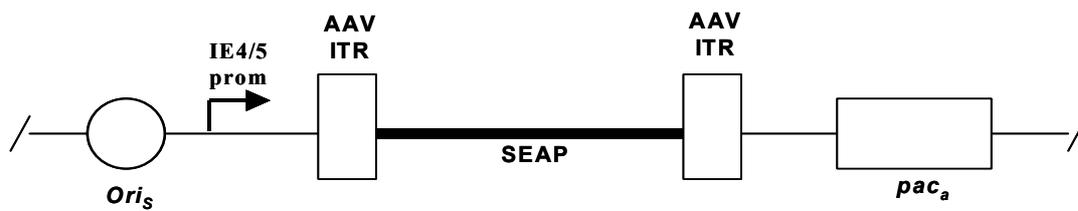
pHSVSEAP

Bei diesem Konstrukt handelt es sich um einen konventionellen HSV-1 Amplikonvektor, bei dem das Transgen unter der Kontrolle des HSV-1 IE4/5 Promoters steht. Konstrukte dieser Art vermitteln i.d.R. eine kurzfristige Überexpression. Klonierung: Der Vektor pHSVPrPUC wurde mit *HinD* III linearisiert und alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert. Das SEAP Gen (1,8 kb) wurde durch einen *Kpn* I / *HinD* III Verdau aus pCMVSEAP isoliert und in den Vektor ligiert.



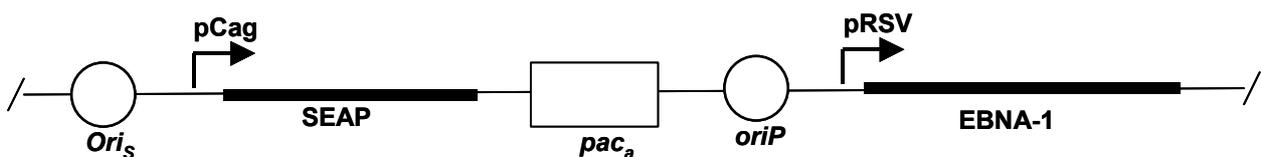
pHySEAP

Hierbei handelt es sich um ein HSV-1/AAV Hybridkonstrukt. Das Transgen wird von den „inverted terminal repeats“ (ITRs) der Adeno-Assoziierten-Viren (AAV) flankiert. Die Verwendung dieser Sequenz soll die Stabilität der Genexpression in der Wirtszelle durch episodale (extrachromosomale) Retention bzw. Integration in das Wirtszellgenom erhöhen. Klonierung: Der Vektor pHyGFPa wurde mit Pme I verdaut und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert. Das Insert wurde durch Verdau von pCMVSEAP mit Kpn I / HinD III präpariert. Zur Erzeugung eines „blunt end“ wurde das Fragment mit T4-Polymerase behandelt.



pREHZcag-aSEAP

Das Konstrukt wurde freundlicher Weise von Yoshinaga Saeki (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen HSV-1/EBV Hybridvektor, der das EBV Gen EBNA-1 und den EBV Replikationsursprung oriP enthält. Das SEAP Gen wird vom cag Promoter angetrieben. Dabei handelt es sich um eine Kombination des „chicken beta-actin“ Promoter und des CMV „immediately-early enhancers“. Der cag Promoter wurde gewählt, da er langfristige Genexpression in der Leber von Ratten vermitteln kann²⁹.

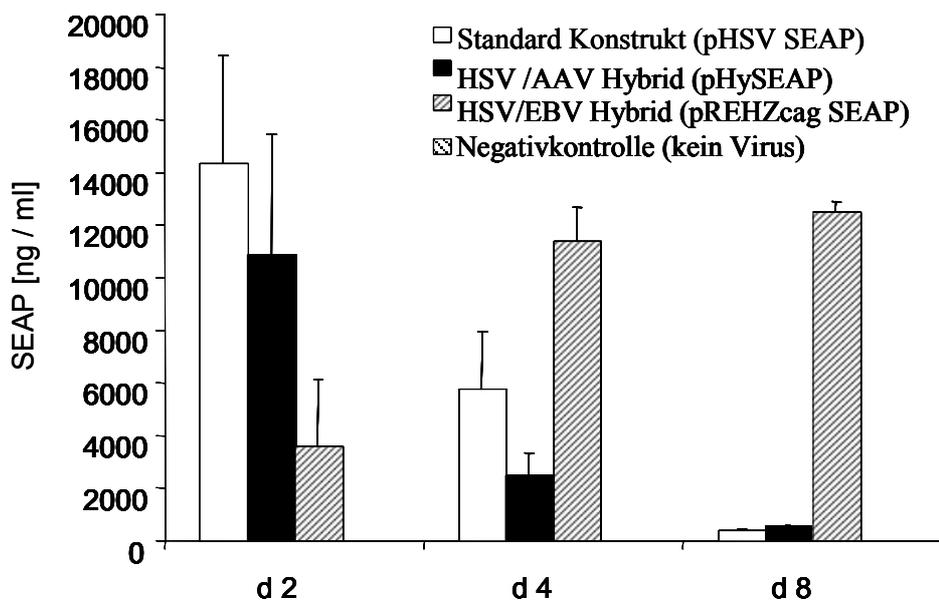


4.3.2 Gentransfer in die Hepatozyten Zelllinie NPLC

Zunächst wurde die Funktionsfähigkeit der Vektorkonstrukte *in vitro* untersucht und erste Hinweise auf die Kinetik der Genexpression in Hepatozyten gewonnen. Insbesondere galt es zu prüfen, ob mit Hilfe der Hybridvektoren die Dauer der Genexpression verlängert werden kann.

Je 1×10^5 NPLC Zellen wurden mit $1 \mu\text{l}$ Vektorpräparation infiziert. Die SEAP Konzentration im Zellkulturüberstand wurde an den Tagen 2, 4 und 8 bestimmt (Abb. 4.3.2). Am Tag zwei war zunächst bei allen Konstrukten eine hohe SEAP Konzentration nachweisbar (pHSVSEAP: 14.317 ± 4.126 ng/ml; pREHZcag-aSEAP: 3.563 ± 2.562 ng/ml; pHySEAP: 10.891 ± 4.582 ng/ml). Im weiteren Verlauf nahm die Genexpression des Standardkonstruktes pHSVSEAP und des HSV-1/AAV Hybridkonstruktes pHySEAP jedoch ab und näherte sich dem Hintergrundniveau. Dagegen nahm die Expression des HSV-1/EBV Hybridkonstruktes pREHZcag-aSEAP auf 12.465 ± 455 ng/ml am Tag 8 zu.

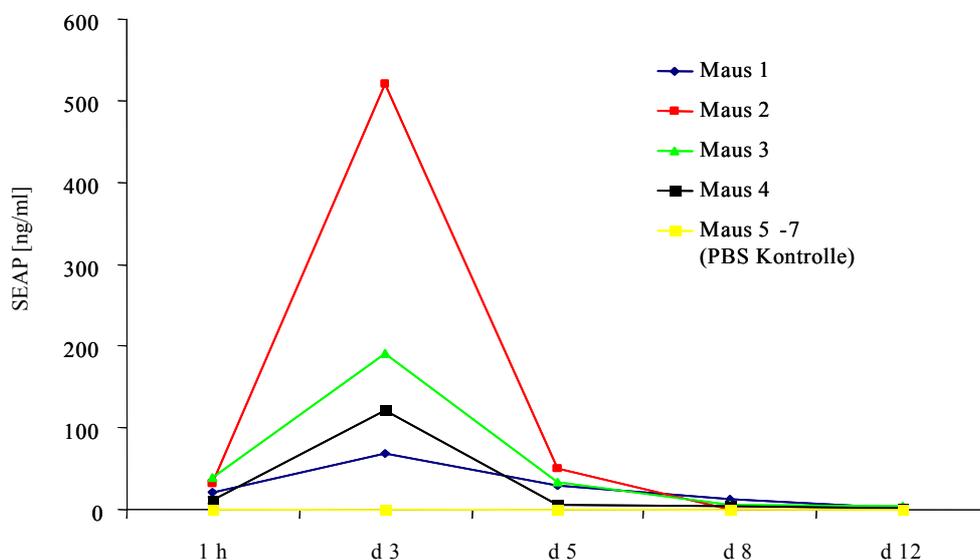
Abbildung 4.3.2: Infektion von NPLC Hepatozyten mit SEAP kodierenden Amplikonvektoren (n=3). Die Werte der Negativkontrolle („kein Virus“) waren vergleichsweise so gering, dass sie bei dem hier gewählten Maßstab nicht zur Darstellung kommen.



4.3.3 Gentransfer in die Leber von BALB/c Mäusen

Die Leber ist das natürliche Organ der Synthese vieler plasmatischer Proteine, einschließlich der Gerinnungsfaktoren, und eignet sich daher als Zielorgan für die Gensatztherapie monogenetischer Erkrankungen. In dieser Arbeit wurde ein Tiermodell zur Untersuchung des Gentransfers in die Leber etabliert. Je 100 μl einer Helfervirus-freien Vektorpräparation des Konstruktes pHSVSEAP wurden mittels Schwanzveneninjektion in die Leber von BALB/c Mäusen injiziert. Die Versuchsgruppe umfasste 4 BALB/c Mäuse. Die Kontrollgruppe, bestehend aus drei BALB/c Mäusen, erhielt eine Injektion von je 100 μl PBS Lösung. Nach der Vektorinjektion wurden den Tieren Blutproben durch retro-orbitale Punktion entnommen. Die erste Probe wurde bereits eine Stunde nach der Vektorinjektion entnommen, um sicherzustellen, dass die gemessene SEAP Aktivität nicht ausschliesslich durch das Vektorinokulum in das Tier gelangt ist, sondern vielmehr *de novo* im Tier synthetisiert wurde. Weitere Blutproben wurden an den Tagen 3, 5, 8 und 12 entnommen. Die Abbildung 4.3.3 zeigt den Verlauf der SEAP Konzentration im Serum der Versuchstiere. Erwartungsgemäß wurde die maximale SEAP Konzentration von 223 ± 201 ng/ml bereits zu einem frühen Zeitpunkt, am dritten Tag, gemessen. Im weiteren Verlauf kam es dann zu einer Abnahme der SEAP Konzentration, die zwischen dem 5. bis 8. Tag das Hintergrundniveau erreichte.

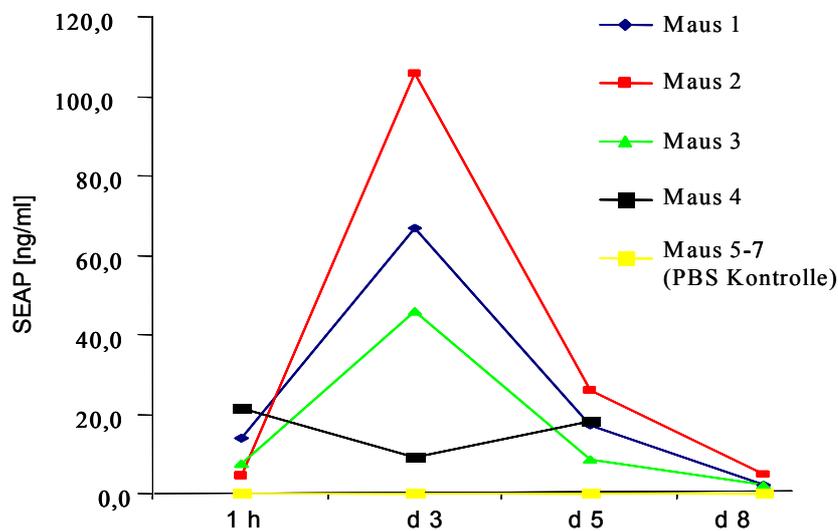
Abbildung 4.3.3: Verlauf der SEAP Konzentration im Serum von vier BALB/c Mäusen, denen jeweils 100 μl des Vektors pHSVSEAP in die Leber verabreicht wurde (Schwanzveneninjektion, Maus 1-4). Die Kontrollgruppe bestand aus drei BALB/c Mäusen, die je 100 μl PBS i.v. erhielten (Maus 5-7).



4.3.4 Gentransfer in die Muskulatur von BALB/c Mäusen

Die Muskulatur bietet aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit ein weiteres interessantes Zielgewebe für die Gensatztherapie. Insbesondere handelt es sich um ein Organ, das im Falle einer Komplikation nach der Vektorinjektion großzügig reseziert werden kann. In Analogie zur „Leber“-Gruppe erhielt auch diese Versuchsgruppe, bestehend aus 4 Tieren, jeweils eine Injektion von 100 µl pHSV SEAP Vektorpräparation in die Muskulatur der hinteren Extremität. Die drei Tiere der Kontrollgruppe erhielten je 100 µl PBS i.m. Die Abbildung 4.3.4 zeigt den Verlauf der SEAP Konzentration im Serum. Wie schon bei der „Leber“-Gruppe, zeigen drei von vier Tieren am Tag 3 ein SEAP Maximum. Das erreichte Maximum lag mit 57 ± 39 ng/ml allerdings etwa um den Faktor vier niedriger als in der „Leber“-Gruppe. Nach dem dritten Tag nahm die SEAP Konzentration ab und erreichte am Tag 8 das Hintergrundniveau.

Abbildung 4.3.4: Verlauf der SEAP Konzentration im Serum von vier BALB/c Mäusen nach i.m. Injektion von 100 µl pHSVSEAP.



Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden HSV-1 Amplikonvektoren für den Gentransfer im Kontext der Tumorimmuntherapie und der Gensatztherapie verwendet. Obwohl diese therapeutischen Modalitäten unterschiedliche Ansprüche an den Gentransfervektor stellen, konnte gezeigt werden, dass HSV-1 Amplikonvektoren vielversprechende Kandidaten für beide Anwendungen sind.

Gegenwärtig werden verschiedene Ansätze zur Immuntherapie hämatologischer Neoplasien erprobt³⁰. Eines dieser Konzepte sieht vor, autologe Blasten *ex vivo* genetisch zu manipulieren, um durch die Einführung von Genen, die für Immunmodulatoren wie z.B. Zytokine und Chemokine kodieren, die Immunogenität der Blasten zu verstärken. Diese genetisch veränderten Zellen können dem Patienten durch subkutane Injektion verabreicht werden. Durch den engen räumlichen Kontakt der autologen Blasten mit den immunmodulatorischen Molekülen entsteht an der Injektionsstelle ein Mikroenvironment, das verschiedene Effektorzellen des Immunsystems gegen die leukämischen Blasten aktiviert²⁷. In Anlehnung an eine klassische Impfung wird dieses Konzept als Leukämievakzine bezeichnet. Im Hinblick auf die Erstellung einer Leukämievakzine wurde hier der Gentransfer in humane hämatopoetische Zellen mit HSV-1 Amplikonvektoren untersucht. Zunächst ergab die Untersuchung des Gentransfers in die verschiedenen Zellpopulationen des gesunden Knochenmarks, dass sowohl B- und T-Lymphozyten (CD19 bzw. CD3) als auch Monozyten (CD14), myelomonozytäre Zellen (CD33) und Granulozyten (CD66B) empfänglich für den Gentransfer mit HSV-1 Amplikonvektoren sind. Die höchste Gentransferrate (Median 39%) wurde bei den CD3 positiven Zellen erreicht. Bei den übrigen Zellpopulationen ergaben sich Gentransferraten von Median 19% bis 36%. Diese Daten deuten auf einen Pantropismus der HSV-1 Amplikonvektoren im humanen hämatopoetischen System hin, der im Folgendem näher charakterisiert wurde.

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung des Gentransfers in CD34+ Stammzellen. Gegenwärtig werden diverse Vektorsysteme zur optimalen genetischen Manipulation dieser Zellen erprobt²⁶. Die Transduktion ruhender CD34+ Zellen hat sich dabei als besonders schwierig erwiesen, da viele Vektorsysteme, wie z.B. die konventionelle retroviralen Gentransfervektoren (Moloney Murine Leukemia Viren), nur teilende Zellen infizieren³¹. Die Induktion der Zellteilung *in vitro* führt jedoch auch zu einer Reifung der CD34+ Zellen, die

dadurch ihre Pluripotenz einbüßen. HSV-1 Amplikonvektoren bieten aufgrund ihrer Fähigkeit, nicht-teilende Zellen zu infizieren, eine interessante Alternative für die genetische Manipulation von CD34+ Stammzellen. Hier konnte gezeigt werden, dass HSV-1 Amplikonvektoren diese Zellen mit relativ guter Effizienz (8-37% bei moi 20-30) transduzieren können. Allerdings erwiesen sich die CD34+ Zellen als empfindlich gegenüber der Zytotoxizität der HSV-1 Helferviren. Durch zwei Parallelversuche, bei denen CD34+ Zellen derselben Charge sowohl mit Helfervirus-abhängigen als auch mit Helfervirus-freien Amplikonvektoren infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass sich die vektorbedingte Zytotoxizität durch Verwendung der Helfervirus-freien Amplikonvektoren deutlich reduzieren lässt. Da die meisten Anwendungen, die im Zusammenhang mit der genetischen Manipulation CD34+ Stammzellen postuliert werden, eine dauerhafte Modifikation der CD34+ Zellen erfordern, bleibt noch zu klären, ob die Verwendung von HSV-1/AAV bzw. HSV-1/EBV Hybridvektoren eine dauerhafte genetische Modifikation dieser Zellen ermöglicht.

Bei den akuten lymphatischen Blasten, denen in dieser Arbeit das Hauptinteresse galt, handelt es sich um Zellen, die sich als resistent gegenüber den meisten für die klinische Anwendung zugelassenen Vektorsystemen erwiesen haben¹⁹. Gute Transduktionsraten von ALL Blasten wurden bisher vor allem für die HIV-basierenden Lentiviren und rekombinante HSV-2 disabled infectious single cycle (DISC) Vektoren beschrieben^(49, 50). Die wesentlichen Anforderungen, die an einen Vektor für die Herstellung einer Leukämievakzine zu stellen sind, lauten: (a) effiziente Transduktion primärer Blasten *ex vivo*. Effizient bedeutet in diesem Zusammenhang, dass möglichst viele Zellen durch eine möglichst geringe Anzahl von Vektorpartikeln in möglichst kurzer Zeit transduziert werden sollten; (b) technisch möglichst einfache Klonierung verschiedener Vektorkonstrukte. Dies ermöglicht die rasche Erprobung der Wirksamkeit unterschiedlicher Immunmodulatoren bzw. Kombinationen von Immunmodulatoren; (c) ausreichende Insertionskapazität des Vektors, um ggf. mehrere immunmodulatorische Gene mit einem Vektorpartikel in die jeweiligen Zielzellen zu befördern.

Diese Anforderungen werden von den HSV-1 Amplikonvektoren weitestgehend erfüllt. Mit den HSV-1 Amplikonvektoren konnte in dieser Arbeit eine gute, wenngleich geringere als für DISC- und HIV-Vektoren beschriebene, Gentransferrate in ALL und AML Blasten erreicht werden. Bei den ALL Blasten lag die Gentransfereffizienz mit den HSV-1 Amplikonvektoren bei maximal $42\% \pm 14\%$ (moi 30-50). Im Falle der akuten myeloischen Blasten wurden maximal $29 \pm 10\%$ der Blasten mit einer moi 30-50 transduziert. Die maximale Genexpression

konnte bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt, nämlich nach ca. 24 Stunden festgestellt werden. Diesen Ergebnissen stehen Transduktionsraten von 80-90% mit DISC und HIV-Vektoren gegenüber^{32,33}. Dabei ist zu bedenken, dass im Fall der Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren, die für die Transduktion der primären ALL Blasten verwendet worden sind, höchstens ein Vektorpartikel (infektiöser Partikel, der das „gene of interest“ trägt) auf 100 Helferviren kommt⁶. Wahrscheinlich ließe sich die Transduktionsrate mit HSV-1 Amplikonvektoren erhöhen und an die Transduktionsraten der DISC und HIV-Vektoren annähern, wenn der Anteil der Vektorpartikel in der Vektorpräparation erhöht würde. Dies wäre z.B. durch die Verwendung des Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonsystems möglich. Die Erprobung dieser Vektoren zur Transduktion primärer ALL Blasten steht allerdings noch aus.

Im Gegensatz zu den rekombinanten HSV-2 DISC Vektoren enthalten die HSV-1 Amplikonvektoren weniger als 1 kb HSV-1 *wt*-Genom⁶. Die Erzeugung eines neuen Amplikonvektors mit einem bestimmten Transgen kann technisch vergleichsweise einfach durch die Klonierung des Amplikonplasmides erfolgen. Bei den DISC Vektoren dagegen ist dazu eine aufwendigere Rekombination des Virusgenoms erforderlich. Die Möglichkeit der raschen Erzeugung verschiedener Vektorkonstrukte ist bei der Untersuchung einer neuartigen Leukämieimmuntherapie besonders wichtig, da oftmals die Wirksamkeit verschiedener immunmodulatorischer Gene bzw. verschiedener Kombinationen dieser Gene verglichen werden soll.

Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass sich die Wirksamkeit einer Tumor- / Leukämieimmuntherapie durch die Verwendung von Kombinationen von Immunmodulatoren erhöhen lässt³⁴. In diesem Zusammenhang könnte die große Insertionskapazität der HSV-1 Amplikonvektoren von theoretisch bis zu 150 kb⁶ besonders vorteilhaft sein, da sie es ermöglicht, mehrere immunmodulatorische Gene durch einen Vektorpartikel in eine Leukämiezelle einzubringen.

In Vorbereitung auf ein murines Modell der Leukämievakzination wurde der Gentransfer in die murine prä-B lymphoblastische Zelllinie A20 untersucht. Fruh et al. haben gezeigt, dass nach einer Infektion mit HSV-1 das herpesvirale Protein ICP47 die Synthese von MHC Klasse I Molekülen im endoplasmatischen Retikulum und deren Transport zur Zelloberfläche hemmt³⁵. Eine MHC I Herabregulation infolge einer Infektion mit Amplikonvektoren wäre jedoch ein potentielles Hindernis bei der Erzeugung einer Leukämievakzine. Hier wurde anhand der A20

Zelllinie die Gentransfereffizienz und die Modulation der MHC Klasse I (H-2Kd bei der Maus) Modulation nach Infektion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit einer MOI von fünf 90% der A20 Zellen transduziert werden. Trotz dieser guten Gentransferrate wurde kaum eine Herabregulation der MHC Klasse I Moleküle auf den A20 Zellen festgestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass HSV-1 Amplikonvektoren sich in mehrfacher Hinsicht als potentielle Kandidaten zur Erzeugung einer klinisch einsetzbaren Leukämievakzine erwiesen haben: (i) Sie ermöglichen eine rasche Transduktion primärer leukämischer Blasten ohne die Notwendigkeit einer langfristigen Kultivierung der Blasten *in vitro*. Dies ist entscheidend, da bei der Kultivierung der Blasten die Gefahr der Selektion von Klonen und damit der Veränderung des Antigenrepertoires besteht. (ii) Sie vermitteln eine starke, wenngleich transiente Genexpression. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass ein Zeitraum von einigen Tagen ausreichend ist, um eine systemische Anti-Tumor Immunität zu induzieren; (iii) Wahrscheinlich wird die Immunogenität der akuten leukämischen Blasten durch die Infektion mit HSV-1 Amplikonvektoren nicht reduziert. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass die Freisetzung diverser zellulärer Epitope, die im Rahmen des zytopathischen Effektes erfolgt, die Immunogenität der Zellen eher noch steigert.

Die Frage, ob sich Helfervirus-abhängige Amplikonvektoren trotz ihres zytopathischen Effektes auf die Wirtszelle und der transienten Genexpression zur Erzeugung einer autologen Leukämievakzine eignen, kann also wahrscheinlich bejaht werden. Jetzt sollte anhand von Tierversuchen geklärt werden, ob mit HSV-1 Amplikonvektoren genetisch modifizierte Blasten einen anti-leukämischen Effekt *in vivo* leisten können.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Gensatztherapie. Dabei wurde die Bluterkrankheit Hämophilie als ein Modell für den korrektiven Gentransfer mit HSV-1 Amplikonvektoren gewählt. Die Erkrankung besitzt einige Eigenschaften, die sie zu einem attraktiven Kandidaten für eine solche Therapie machen: (i) Bereits geringe Faktorkonzentrationen sind ausreichend, um den Phänotypen des Patienten nachhaltig zu verbessern; (ii) Die Synthese biologisch aktiver Gerinnungsfaktoren kann in verschiedenen Geweben erfolgen. Sowohl die Leber als auch die Muskulatur haben sich als Zielorgane bewährt^{36,37}; Schließlich, (iii) ermöglichen etablierte Tiermodelle die Überprüfung der Wirksamkeit und Sicherheit einer neuartigen Therapie *in vivo*.

Verschiedene Vektorsysteme wurden verwendet, um den genetischen Defekt der Hämophilie zu korrigieren ³⁸. Obwohl sich erfolgreiche gentherapeutische Strategien auch in klinischen Versuchen abzeichnen ³⁹, besteht weiterhin ein Bedarf zur Optimierung der Gentransfertechnik. Insbesondere der Transfer der „ungekürzten“ Version des Faktor IX Gens (genomischen DNA Sequenz, ca. 35 kb), die im Gegensatz zur komplementären DNA Sequenz (cDNA, ca. 1,5 kb) potentiell wichtige physiologische Regulatoren enthält, konnte bisher aufgrund der unzureichenden Insertionskapazität der etablierten Vektorsysteme noch nicht untersucht werden.

Wesentliche Anforderungen an ein Vektorsystem für die Gensatztherapie sind stabile Transgenexpression und geringe Zytotoxizität. Die Forderung nach stabiler Genexpression wurde hier durch die Verwendung von HSV-1/AAV und HSV-1/EBV Hybridvektoren berücksichtigt. Das Prinzip der HSV-1 Hybridvektoren besteht darin, die Stabilität des Transgens durch spezifische genetische Elemente anderer Viren zu erhöhen ¹⁶. HSV-1 Vektoren sind aufgrund ihrer großen Insertionskapazität in besondere Weise als „Rückgrat“ für Hybridvektoren geeignet. Geeignete „Partner“ der HSV-1 Amplikonvektoren sind z.B. die Adeno-Assoziierten-Viren (AAV), deren „inverted terminal repeats“ (ITR) zusammen mit den rep Genen eine spezifische Integration in das Genom der Wirtszelle vermitteln können ³. Auch das „Epstein-Barr-Virus (EBV) Nuclear Antigen 1“ (EBNA-1) und der Replikationsursprung (oriP) können die Genexpression in der Wirtszelle durch den episomalen Erhalt des Vektorgenoms verlängern ¹⁷. Um der Forderung nach reduzierter Zytotoxizität gerecht zu werden, wurden Helfervirus-freie Amplikonvektoren verwendet.

Anhand eines *in vitro* Modells zum Gentransfer in Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Genexpression durch HSV-1/EBV Hybridvektoren signifikant länger ist als bei konventionellen Amplikonvektoren. Unter den getesteten Vektorkonstrukten war das HSV-1/EBV Hybridkonstrukt (pREHZcag-a SEAP) das einzige Konstrukt, bei dem es zu einer Zunahme der Reportergenexpression im Beobachtungszeitraum kam. Dagegen zeigte sich erwartungsgemäß bei dem konventionellen Amplikonkonstrukt (pHSVSEAP) initial eine hohe Genexpression, die dann allerdings rasch rückläufig war. Das HSV-1/AAV Hybridkonstrukt (pHySEAP) zeigte eine Kinetik, die der des Standardkonstrukte pHSVSEAP ähnlich war. Diese überraschend kurze Genexpression lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass das

verwendete HSV-1/AAV Konstrukt zwar die AAV ITRs enthielt, nicht jedoch die AAV rep Gene, die ebenfalls für eine stabile Genexpression entscheidend sind ¹⁶.

Tierexperimentell erfolgte zunächst die Untersuchung des Gentransfers mit dem Standard Amplikonvektor pHSVSEAP. Als Zielorgane dienten zum einen die Leber als orthotoper Ort der Gerinnungsfaktorsynthese und zum anderen die Skelettmuskulatur. Erwartungsgemäß wurde die maximale Konzentration des Reproterproteins SEAP im peripheren Blut der Tiere zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 3) gemessen. Danach kam es relativ rasch zu einem Rückgang der SEAP Konzentration, die sowohl in der „Muskel“- als auch in der „Leber“- Gruppe bereits am Tag 8 das Hintergrundniveau erreichte.

Eine Prüfung der HSV-1 Hybridkonstrukte *in vivo* steht noch aus. Weiterhin wäre es interessant zu prüfen, ob die Einführung der entscheidenden rep Gene (rep 68, rep 78) in das HSV-1/AAV Hybridkonstrukt und die Verwendung gewebespezifischer Promotoren eine Verlängerung Genexpression vermitteln können ⁹. Die wichtigste Prüfung, der die HSV-1 Amplikonvektoren jedoch zu unterziehen sind, ist der Transfer genomischer DNA, welche die Insertionskapazität der anderen etablierten Vektorsystem übersteigt. Erste Daten, die sich z.B. mit dem Transfer des Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferasegens (~ 115 kb) ²⁰, Dystrophingens (~ 26 kb) ¹⁰ und des low-density Lipoproteinrezeptorgens (~45 kb) ⁴⁰ befassen, lassen Hoffnung in dieser Hinsicht aufkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vektorsystem für zwei verschiedene Zielsetzungen aus dem Fachbereich der Hämatologie und Onkologie verwendet. Da gegenwärtig sowohl die Weiterentwicklung der Amplikonvektoren als auch die klinisch orientierte Anwendung dieses Vektorsystems mit ungebrochenem Enthusiasmus verfolgt werden, bleibt zu hoffen, dass die Amplikonvektoren einen erheblichen Beitrag zur molekularen Medizin der Zukunft leisten werden.

Abkürzungen

AAV	Adeno-Assoziierte-Viren
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
amp ^r	Ampicillinresistensgen
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E. coli	Escherichia coli
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Fötale Kälberserum)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ-1
ICP	<i>Infected Cell Protein</i>
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
i.m.	intra-muskulär
Kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MNZ	Mononukleäre Zellen
moi	<i>Multiplicity of infection</i> (Entspricht der errechneten Anzahl von Vektorpartikeln pro Zelle)
PE	Phycoerythrin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
P/S	Penicillin / Streptomycin
rpm	<i>rounds per minute</i>
SEAP	Sekretierte alkalische Phosphatase

Literatur

1. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*. 1993;260:926-932
2. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272:263-267
3. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:2211-2215
4. Hirata R, Chamberlain J, Dong R, Russell DW. Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol*. 2002;20:735-738
5. Lai CM, Lai YK, Rakoczy PE. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol*. 2002;21:895-913
6. Sena-Esteves M, Saeki Y, Fraefel C, Breakefield XO. HSV-1 amplicon vectors--simplicity and versatility. *Mol Ther*. 2000;2:9-15.
7. Geller AI, Breakefield XO. A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science*. 1988;241:1667-1669
8. Tolba KA, Bowers WJ, Hilchey SP, Halterman MW, Howard DF, Giuliano RE, Federoff HJ, Rosenblatt JD. Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98:287-295
9. Fraefel C, Jacoby DR, Lage C, Hilderbrand H, Chou JY, Alt FW, Breakefield XO, Majzoub JA. Gene transfer into hepatocytes mediated by helper virus-free HSV/AAV hybrid vectors. *Mol Med*. 1997;3:813-825
10. Wang Y, Mukherjee S, Fraefel C, Breakefield XO, Allen PD. Herpes simplex virus type 1 amplicon vector-mediated gene transfer to muscle. *Hum Gene Ther*. 2002;13:261-273.
11. Ward PL, Roizman B. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen [published erratum appears in *Trends Genet* 1994 Oct;10(10):380]. *Trends Genet*. 1994;10:267-274
12. Spaete RR, Frenkel N. The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. *Cell*. 1982;30:295-304
13. DeLuca NA, Schaffer PA. Activities of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP4 genes specifying nonsense peptides. *Nucleic Acids Res*. 1987;15:4491-4511
14. Johnson PA, Miyanoara A, Levine F, Cahill T, Friedmann T. Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 1992;66:2952-2965
15. Saeki Y, Ichikawa T, Saeki A, Chiocca EA, Tobler K, Ackermann M, Breakefield XO, Fraefel C. Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gene Ther*. 1998;9:2787-2794
16. Heister T, Heid I, Ackermann M, Fraefel C. Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors mediate site-specific integration at the adeno-associated virus preintegration site, AAVS1, on human chromosome 19. *J Virol*. 2002;76:7163-7173.
17. Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 1985;313:812-815
18. Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, Witherspoon RP, Fefer A, Fisher L, Buckner CD, Anasetti C, Appelbaum FR, Badger C, et al. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood*. 1989;73:1720-1728

19. Mascarenhas L, Stripecke R, Case SS, Xu D, Weinberg KI, Kohn DB. Gene delivery to human B-precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*. 1998;92:3537-3545
20. Wade-Martins R, Smith ER, Tyminski E, Chiocca EA, Saeki Y. An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19:1067-1070
21. Fraefel C, Song S, Lim F, Lang P, Yu L, Wang Y, Wild P, Geller AI. Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J Virol*. 1996;70:7190-7197
22. Wang Y, Fraefel C, Protasi F, Moore RA, Fessenden JD, Pessah IN, DiFrancesco A, Breakefield X, Allen PD. HSV-1 amplicon vectors are a highly efficient gene delivery system for skeletal muscle myoblasts and myotubes [In Process Citation]. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:C619-626
23. Bergold PJ, Casaccia-Bonnet P, Zeng XL, Federoff HJ. Transsynaptic neuronal loss induced in hippocampal slice cultures by a herpes simplex virus vector expressing the GluR6 subunit of the kainate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:6165-6169.
24. Smith IL, Hardwicke MA, Sandri-Goldin RM. Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. *Virology*. 1992;186:74-86.
25. Costantini LC, Fraefel C, Breakefield XO, Isacson O. Herpes simplex virus/adeno-associated virus hybrid vectors for gene transfer to neurons. Preparation and use. *Methods Mol Med*. 2002;69:461-479
26. Halene S, Kohn DB. Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest. *Hum Gene Ther*. 2000;11:1259-1267
27. Dilloo D, Bacon K, Holden W, Zhong W, Burdach S, Zlotnik A, Brenner M. Combined chemokine and cytokine gene transfer enhances antitumor immunity [see comments]. *Nat Med*. 1996;2:1090-1095
28. Cullen BR, Malim MH. Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods Enzymol*. 1992;216:362-368.
29. Kosuga M, Enosawa S, Li XK, Suzuki S, Matsuo N, Yamada M, Roy-Chowdhury J, Koiwai O, Okuyama T. Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken beta-actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). *Cell Transplant*. 2000;9:675-680.
30. Brenner MK. Gene transfer and the treatment of haematological malignancy. *J Intern Med*. 2001;249:345-358.
31. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*. 2000;18:119-128
32. Dilloo D, Rill D, Entwistle C, Bourns M, Zhong W, Holden W, Holladay M, Inglis S, Brenner M. A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*. 1997;89:119-127
33. Stripecke R, Cardoso AA, Pepper KA, Skelton DC, Yu XJ, Mascarenhas L, Weinberg KI, Nadler LM, Kohn DB. Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses. *Blood*. 2000;96:1317-1326
34. Tepper RI, Mule JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Hum Gene Ther*. 1994;5:153-164
35. Fruh K, Ahn K, Djaballah H, Sempe P, van Endert PM, Tampe R, Peterson PA, Yang Y. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature*. 1995;375:415-418
36. Park F, Ohashi K, Kay MA. Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood*. 2000;96:1173-1176.
37. Hagstrom JN, Couto LB, Scallan C, Burton M, McClelland ML, Fields PA, Arruda VR, Herzog RW, High KA. Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promoter. *Blood*. 2000;95:2536-2542.

38. Kay MA, Rothenberg S, Landen CN, Bellinger DA, Leland F, Toman C, Finegold M, Thompson AR, Read MS, Brinkhous KM, et al. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science*. 1993;262:117-119.
39. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*. 2000;24:257-261
40. Wade-Martins R, Saeki Y, Antonio Chiocca E. Infectious delivery of a 135-kb LDLR genomic locus leads to regulated complementation of low-density lipoprotein receptor deficiency in human cells. *Mol Ther*. 2003;7:604-612
41. Janka-Schaub GE, Harms D, Goebel U, Graubner U, Gutjahr P, Haas RJ, Juergens H, Spaar HJ, Winkler K. Randomized comparison of rotational chemotherapy in high-risk acute lymphoblastic leukaemia of childhood--follow up after 9 years. Coall Study Group. *Eur J Pediatr*. 1996;155:640-648
42. Reiter A. Therapy of B-cell acute lymphoblastic leukaemia in childhood: the BFM experience. *Baillieres Clin Haematol*. 1994;7:321-337
43. Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML, Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital. *N Engl J Med*. 1993;329:1289-1295
44. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell*. 1990;60:397-403
45. Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med*. 1990;172:1217-1224
46. Maass G, Schweighoffer T, Berger M, Schmidt W, Herbst E, Zatloukal K, Buschle M, Birnstiel ML. Tumor vaccines: effects and fate of IL-2 transfected murine melanoma cells in vivo. *Int J Immunopharmacol*. 1995;17:65-73
47. Tepper RI, Mule JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Hum Gene Ther*. 1994;5:153-164
48. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3539-3543
49. Dilloo D, Rill D, Entwistle C, Boursnell M, Zhong W, Holden W, Holladay M, Inglis S, Brenner M. A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*. 1997;89:119-127
50. Stripecke R, Cardoso AA, Pepper KA, Skelton DC, Yu XJ, Mascarenhas L, Weinberg KI, Nadler LM, Kohn DB. Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses. *Blood*. 2000;96:1317-1326
52. Kay MA, Rothenberg S, Landen CN, Bellinger DA, Leland F, Toman C, Finegold M, Thompson AR, Read MS, Brinkhous KM, et al. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science*. 1993;262:117-119.
53. Park F, Ohashi K, Kay MA. Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood*. 2000;96:1173-1176.
54. Hagstrom JN, Couto LB, Scallan C, Burton M, McClelland ML, Fields PA, Arruda VR, Herzog RW, High KA. Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promoter. *Blood*. 2000;95:2536-2542.
55. Fruh K, Ahn K, Djaballah H, Sempe P, van Endert PM, Tampe R, Peterson PA, Yang Y. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature*. 1995;375:415-418

56. Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H, Johnson D. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*. 1995;375:411-415
57. Neumann L, Kraas W, Uebel S, Jung G, Tampe R. The active domain of the herpes simplex virus protein ICP47: a potent inhibitor of the transporter associated with antigen processing. *J Mol Biol*. 1997;272:484-492

Zusammenfassung

Die somatische Gentherapie ist ein vergleichsweise junger Zweig der Medizin, mit dessen Hilfe Krankheitsprozesse durch die Einführung fremder Gene in Körperzellen beeinflusst werden sollen. Der Transfer der fremden DNA in die Wirtszelle erfolgt i.d.R. mit Hilfe viraler oder nicht-viraler Vehikel (Vektoren). Gegenwärtig gibt es Bemühungen, eine große Vielfalt von Erkrankungen auf diese Weise zu behandeln. In der vorliegenden Arbeit wird die genetische Manipulation hämatopoetischer Zellen mit dem Ziel der Erzeugung einer Immuntherapie für akute Leukämien (Leukämievakzine) dargestellt. Ein zweites Teilprojekt befasst sich mit dem Gentransfer in die Leber und die Muskulatur und zielt auf die Etablierung eines Modells der Gentransfertherapie ab. Beide Teilprojekte verbindet die Verwendung eines Vektorsystems, das sich von Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) ableitet.

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste bösartige Erkrankung des Kindesalters. Obwohl in den letzten dreißig Jahren große Fortschritte bei der Behandlung der ALL erzielt worden sind, besteht weiterhin dringender Bedarf für innovative therapeutische Strategien. Das Prinzip der Leukämievakzine besteht darin, die Immunogenität der Leukämiezellen durch den *ex vivo* Transfer immunstimulatorischer Gene zu verstärken. Murine Modelle belegen, dass die Injektion genetisch modifizierter Leukämiezellen *in vivo* zu einer systemischen leukämiespezifischen Immunantwort führt, die sich auch gegen unmodifizierte, an anderer Stelle des Körpers befindliche Leukämiezellen richtet. Die Herstellung einer Leukämievakzine für den klinischen Gebrauch wird bisher v.a. durch die Resistenz primärer ALL Blasten gegenüber den meisten etablierten Vektorsystemen behindert. In dieser Arbeit wird die genetische Manipulation humaner und muriner hämatopoetischer Zellen mit Hilfe von HSV-1 Amplikonvektoren untersucht. Dabei zeigt sich, dass unreife CD34+ Zellen, reife mononukleäre Knochenmarkszellen und auch primäre ALL und AML Blasten mit guter Effizienz transduziert werden können. Auf der Grundlage dieser Daten sollte nun die Überprüfung der Sicherheit und Wirksamkeit einer entsprechenden Leukämievakzine im Tiermodell erfolgen.

Zahlreiche monogenetische Erkrankungen lassen sich auf die verminderte Aktivität einzelner Proteine zurückführen. Die Bluterkrankheit Hämophilie gilt als ein gutes Beispiel einer monogenetischen Erkrankung, die durch Gentransfertherapie positiv beeinflusst werden könnte. Sowohl die Leber als auch die Skelettmuskulatur gelten als mögliche Zielgewebe für die Gentransfertherapie. Obwohl sich erfolgreiche Strategien bei der Gentherapie der Hämophilie abzeichnen, besteht weiterhin der Bedarf zur Optimierung der Gentransfertechnik. Insbesondere fehlt bisher Erfahrung mit Vektoren, die eine ausreichende Insertionskapazität aufweisen, um nicht nur die komplementäre DNA (cDNA), sondern auch genomische DNA Sequenzen inklusive aller regulatorischen Elemente aufnehmen können. HSV-1 Amplikonvektoren haben sich in dieser Hinsicht aufgrund ihrer großen Insertionskapazität von theoretisch bis zu 150 kb als vielversprechend erwiesen. Im Hinblick auf die Etablierung eines Modells der Gentransfertherapie der Hämophilie wird in der vorliegenden Arbeit der Gentransfer in Hepato- und Myozyten mit Hilfe der HSV-1 Amplikonvektoren untersucht. Zunächst wird die Konstruktion verschiedener Vektorkonstrukte (konventioneller HSV-1 Amplikonvektor, HSV-1/AAV Hybridvektor, HSV-1/EBV Hybridvektor), die ein Reportergen (Sekretierte Alkalische Phosphatase, 1,8 kb) enthalten, beschrieben. Die Funktionsfähigkeit dieser Konstrukte wird *in vitro* anhand einer Hepatozytenzelllinie demonstriert. In einem zweiten Schritt wird die Effizienz des *in vivo* Gentransfers in die Leber und Muskulatur gezeigt. In der Zukunft sollte nun geprüft werden, ob auch umfangreiche DNA Sequenzen, wie z.B. die genomische Sequenz des Gerinnungsfaktor IX (~35kb), mit vergleichbarer Effizienz transferiert werden können.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Lars Müller
Geburtsdatum 14. November 1974
Anschrift Deutschland Tulpenweg 2, 47877 Willich
Anschrift USA 3317 Jefferson Ave., 45220 Cincinnati, OH, USA
e-mail lars.muller@chmc.org / lars_muller@gmx.de

Schulischer Ausbildung

1994 Abitur, St. Bernhard Gymnasium, Willich
(Gesamtnote: 1,2)

Zivildienst

1994 – 1995 Zivildienst in der Krankenpflege, Katharinen-Hospital, Willich

Hochschulausbildung

1995 - 2002 Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Gesamtnote: sehr gut)

Praktisches Jahr

(2001-2002)

1. Tertial Chirurgische Klinik, Stadtspital Waid, Zürich, Schweiz
2. Tertial Texas Children's Hospital, Houston, USA
3. Tertial Medizinische Klinik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Stipendium

1999 Auslandsstipendium der Hedwig- und Waldemar Hort Stipendienstiftung (3 Monate Aufenthalt an der Universität Zürich)

Facharztausbildung

Pädiatrie

2002-2003 Tätigkeit als Arzt im Praktikum am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (6 Monate)
Seit Juni 2003 Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, USA (www.cchmc.org)

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meinen Eltern, Werner und Karin Müller, die mir während des Studiums ihre volle Unterstützung gegeben haben.

Bei Frau PD Dr. med. Dagmar Dilloo bedanke ich mich für die Betreuung der Doktorarbeit und eine intensive Förderung. Dr. Andree Zibert gilt mein Dank für die geduldige Einarbeitung in das kleine Ein-mal-Eins der Molekularbiologie und Virologie. Bei Professor Dr. U. Göbel bedanke ich mich für eine lehrreiche Zeit als Arzt im Praktikum an der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie sowie für die kritische Korrektur dieses Manuskriptes.

Am Virologischem Institut in Zürich gilt mein Dank PD Dr. Cornel Fraefel und Professor Dr. M. Ackermann für ihre Gastfreundschaft und die zahlreichen Einblicke, die Sie mir in die Biologie der HSV-1 Gentransfervektoren vermittelt haben. Bei Professor Dr. Martin Schwyzer bedanke ich mich für die kritische Korrektur des Manuskriptes.