

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

**Herstellung einer Leukämievakzine durch transgene
Expression immunmodulatorischer Moleküle auf
leukämischen Lymphoblasten nach Transduktion mit
Helfervirus - freien HSV-1 Amplikonvektoren**

Dissertation

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

Vorgelegt von

Anja Lerzynski

2007

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Dagmar Dilloo
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Ortwin Adams

Inhalt

1. <u>Einleitung</u>	6
1.1. Der immunologische Hintergrund	7
1.1.1 T-Zell vermittelte Immunantwort	8
1.1.2 Cross-priming	10
1.2. Die reduzierte Immunogenität neoplastischer Zellen – ein Problem in der Tumorabwehr	11
1.3. Das Prinzip der Leukämievakzination	12
1.3.1. Rolle der Zytokine bzw. kostimulatorischer Moleküle	14
1.4. Herpes simplex Typ-1 (HSV)-Vektorsysteme zur Leukämievakzination	16
1.4.1. Herpesviruseingangsmediatoren (Hve)	20
2. <u>Ziele der Arbeit</u>	21
2.1. Vergleich zwischen Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren (HSV) und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (BAC) hinsichtlich Transgenexpression und Zytotoxizität in Leukämiezellen <i>in vitro</i>	21
2.2. Expression von Herpesviruseingangsmediatoren (Hve) auf humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und primären leukämischen Blasten	22
2.3. Überprüfung der Wirksamkeit einer durch Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren <i>ex vivo</i> generierten Leukämievakzine	22
3. <u>Material und Methoden</u>	23
3.1. Material	23
3.1.2. Antikörper	23
3.1.2. Chemikalien	23
3.1.3. ELISA	25
3.1.4. Geräte	25
3.1.5. PCR	26
3.1.6. Plasmide und Plasmid Kit	27
3.1.7. Tierversuche	27
3.1.8. Viren	28
3.1.9. Zellen	28

3.1.10.	Zellkulturmedien	28
3.1.11.	Zellkulturgefäße / -geräte	29
3.2.	Methoden	30
3.2.1.	Zellkultur	30
3.2.2.	Transduktion von Zellen	33
3.2.3.	FACS-Analyse	33
3.2.4.	Herstellung Helfervirus-abhängiger HSV-1 Amplikonvektoren	35
3.2.5.	Herstellung Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren	40
3.2.6.	IL-2 ELISA (IL-2 Eli-pair)	42
3.2.7.	Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	43
3.2.8.	Anwendung Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren zur <i>ex vivo</i> Generierung einer Leukämievakzine und Überprüfung der Wirksamkeit der Vakzine im A20-Mausmodel	44
3.2.9.	Statistische Auswertung	46
4.	<u>Ergebnisse</u>	47
4.1.	Auf Herpes simplex Virus basierende Vektoren als Gentransfersystem ...	47
4.2.	Titrierung Helfervirus-abhängiger und Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren zur Festlegung äquivalenter <i>transducing units</i> (TU)	48
4.3.	Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren	53
4.4.	CD70 Expression in humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und primären leukämischen Blasten nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren	58
4.5.	IL-2 Expression in humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien nach Trans- duktion mit Helfervirus-abhängigen und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren	62
4.6.	Expression von herpesviralen Entry-Rezeptoren auf humanen Leukämie- /Lymphomzelllinien und primären leukämischen Blasten	65
4.7.	Expression der immunmodulatorischen Moleküle CD70 und Interleukin-2 in der murinen Zelllinie A20	67
4.8.	Das A20-Mausmodell – ein Behandlungsmodell zur Leukämievakzination..	73
5.	<u>Diskussion</u>	78
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	86

7. <u>Abkürzungsverzeichnis</u>	93
8. <u>Zusammenfassung</u>	96
9. <u>Lebenslauf</u>	97
10. <u>Danksagungen</u>	98

1. Einleitung

Akute Leukämien sind bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems, die unbehandelt innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tod führen. Sie stellen mit einem Anteil von ca. 33% aller malignen Erkrankungen die häufigsten Krebserkrankungen im Kinder- und Jugendalter dar. Dabei handelt es sich in etwa 80 % der Fälle um eine akute lymphatische Leukämie (ALL). Die akute myeloische Leukämie (AML) kommt mit einem Anteil von knapp 20% deutlich seltener vor (Yiallourous et al. 2006 & 2006; Schrappe et al., 2005).

Die Behandlung der Leukämie im Kindes- und Jugendalter findet heute nach festgelegten Therapieplänen statt und in den vergangenen Jahrzehnten konnten so die Heilungschancen durch immer weitere Optimierung der Therapie stetig verbessert werden. Während die ALL bzw. die AML noch in den 50er und 60er Jahren in ihrem Krankheitsverlauf kaum zu beeinflussen war, können heute durch risikoadaptierte Radio- und Polychemotherapie etwa 80% (ALL) bzw. 60% (AML) der erkrankten Kinder dauerhaft von dieser Krankheit geheilt werden (Yiallourous et al. 2006 & 2006; Schrappe et al., 2005; Creutzig U. et al. 2003). Die allogene Knochenmarktransplantation stellt dabei eine Therapieoption für Patienten mit hohem Rezidivrisiko oder refraktären Erkrankungen dar. Eine unerwünschte Nebenwirkung nach Knochenmarktransplantation ist die sogenannte *Graft-versus-host-Reaktion (GvHD)*. Dabei handelt es sich um eine zytotoxische Immunreaktion, bei der im Transplantat enthaltene T-Zellen gegen den Empfängerorganismus reagieren (Moalic V., 2006; Holler E. et al., 1995). Darüber hinaus können die T-Zellen des Spenders aber auch gegen die Leukämiezellen des Empfängers reagieren. Diese immunologische Kontrolle der Leukämie durch die transplantierten Spenderzellen wird als *Graft-versus-Leukemia (GvL)-Effekt* bezeichnet (Kolb H.J., 2004; Wikipedia, 2007). Bisher lassen sich die *GvHD* und die *GvL*-Reaktion nur schlecht voneinander trennen.

Dass eine Immunreaktion gegen Leukämiezellen ausgebildet werden kann ist somit durch den *GvL*-Effekt hinreichend belegt. Das Prinzip der Leukämievakzination hat die spezifische Induktion einer *GvL*-Reaktion *in vivo* zum Ziel und stellt so eine neue ergänzende Therapieoption in der Behandlung der akuten Leukämie dar. Die Stimulation einer spezifischen antileukämischen Immunantwort ist bei der ALL jedoch eine besondere Herausforderung. Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Leukämievakzine soll diese Stimulation des Immunsystems über die Expression immunmodulatorischer Moleküle erzielt werden.

1.1 Der immunologische Hintergrund

Das humane Immunsystem kann in ein angeborenes und in ein erworbenes Abwehrsystem unterteilt werden. Das angeborene Abwehrsystem setzt sich zusammen aus physikalischen Barrieren, unspezifischer zellulärer Abwehr und chemischen Barrieren. Innerhalb des erworbenen Abwehrsystems wird zwischen spezifischer zellulärer und humoraler Abwehr unterschieden. T-Zellen stellen in diesem Zusammenhang die Träger der zellvermittelten Immunantwort dar, während B-Zellen als antikörpersezernierenden Zellen die Träger der humoralen Immunantwort sind (Daubenberger, 1997) (Abb. 1.1).

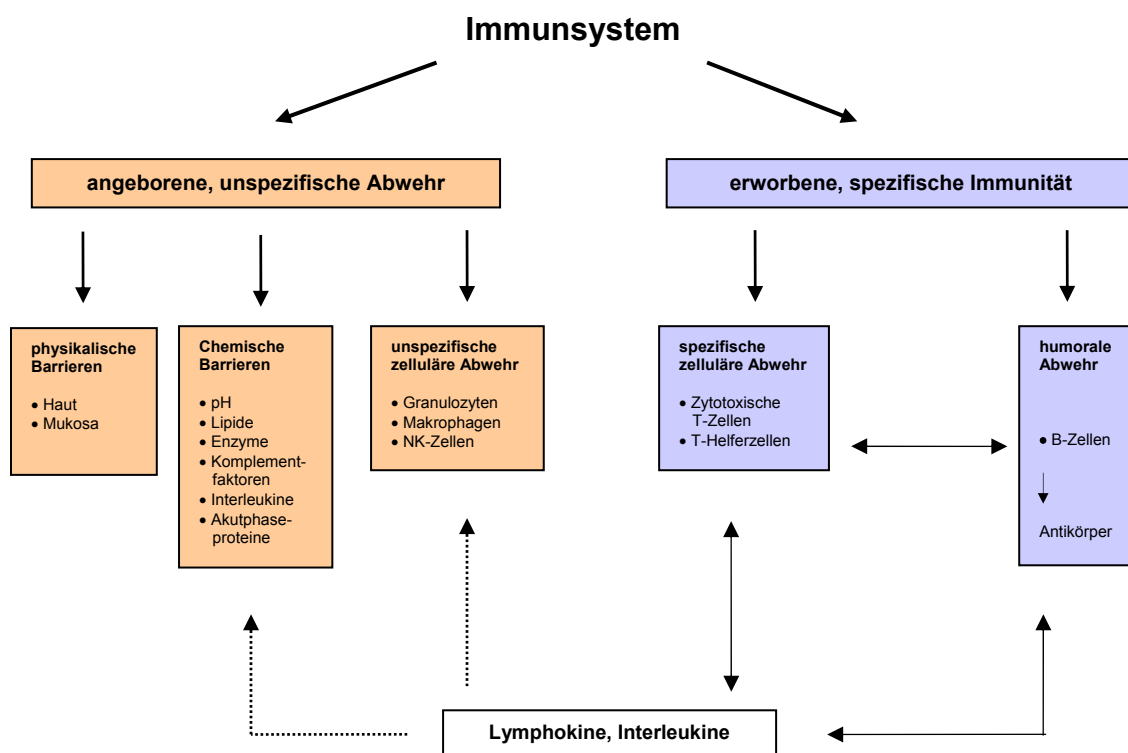


Abb. 1.1: Die Einteilung des humanen Immunsystems

Das angeborene Abwehrsystem umfasst unspezifische physikalische, chemische und zelluläre Mechanismen. Das erworbene Abwehrsystem umfasst die spezifische zelluläre und die humorale Abwehr. Die spezifischen T-Zellen und Antikörper rekrutieren und konzentrieren unspezifische Effektormechanismen spezifisch dort, wo Antigen vorkommt (Kayser et al., 1998).

1.1.1 T-Zell vermittelte Immunantwort

Bei der Entwicklung einer Leukämievakzine spielt die T-Zell vermittelte Immunantwort eine entscheidende Rolle. Dabei stellen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zentrale T-Zell-Subpopulationen in der T-Zell vermittelten Immunantwort dar.

$CD4^+$ T-Zellen, auch als T-Helferzellen bezeichnet, sezernieren nach ihrer Aktivierung unterschiedliche Zytokine und „helfen“ so, andere Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise $CD8^+$ T-Zellen oder B-Zellen, zu aktivieren. Die Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen selbst geschieht durch Antigene, die ihnen über MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-II-Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentiert werden. Dieser MHC-II-Antigenkomplex interagiert auf der T-Zelloberfläche mit dem T-Zellrezeptor (TZR) und dem $CD4$ -Oberflächenmolekül (Isomacki et al., 2005). Dadurch kommt es zur Aktivierung der APZ, die IL-1 sezerniert, welches wiederum die T-Helferzelle aktiviert. Diese stimuliert dann über die Freisetzung unterschiedlicher Zytokine, wie beispielsweise IL-2, IL-4 oder γ -IFN, letztendlich andere Zellen des Immunsystems. Für eine vollständige T-Zellaktivierung ist jedoch die Interaktion zwischen dem von der T-Zelle exprimierten TZR und dem im Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Antigen oft nicht ausreichend. Vielmehr ist ein zweites kostimulatorisches Signal notwendig. Dazu zählen beispielsweise kostimulatorisch wirkende Zytokine wie das membranständige Interleukin 1 (mIL-1). Eine effiziente Kostimulation beinhaltet darüber hinaus auch die Interaktion bestimmter Oberflächen- bzw. Adhäsionsmoleküle mit ihren Liganden auf T-Zellen, wie beispielsweise die Interaktion zwischen $CD40$ - $CD40L$, $CD80$ / $CD86$ (B-7) - $CD28$ oder $LFA-1$ - $ICAM-1$ (Isomacki et al., 2005; Kayser et al., 1998; Daubenberger, 1997).

Die beschriebenen Aktivierungsmechanismen und Interaktionen werden in der Abbildung 1.2 nochmals veranschaulicht.

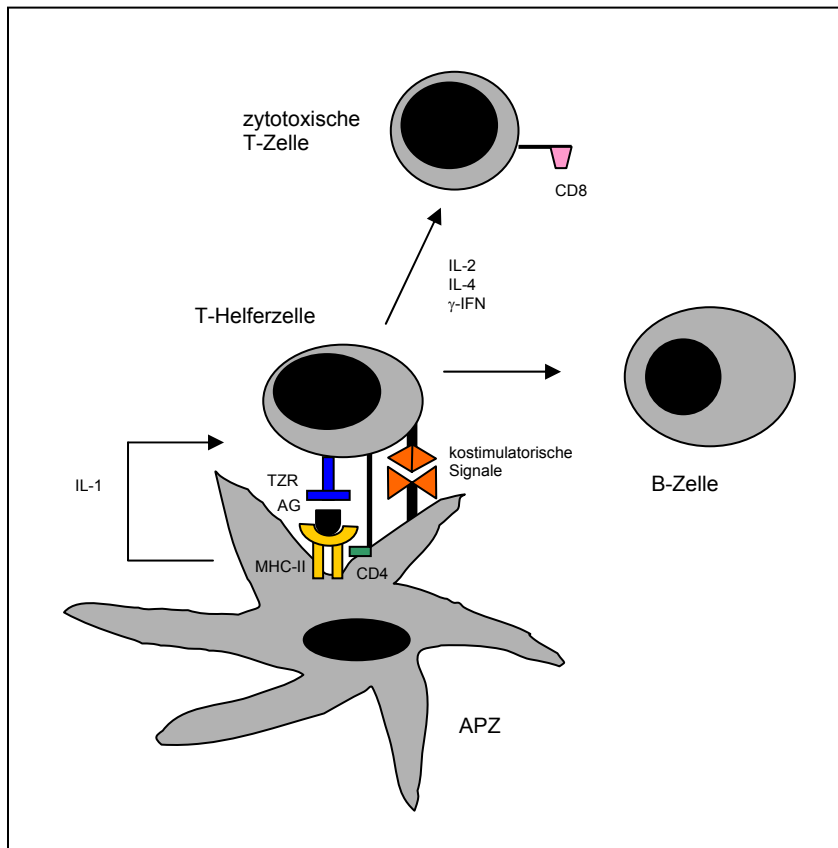


Abb. 1.2: Die Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen

Die Interaktion des T-Zellrezeptor und des $CD4$ -Oberflächenmoleküls mit dem $MHC-II$ -Antigenkomplex führt zur Aktivierung der APZ. Die APZ sezerniert daraufhin $IL-1$, das die T-Zelle aktiviert. Diese kann nun über weitere Mediatoren andere Zellen stimulieren.

$CD8^+$ T-Zellen sind nach ihrer Aktivierung als zytotoxische T-Zellen in der Lage, andere Zellen und so auch Leukämiezellen zu lysieren (Cardoso et al., 1999). Sie erkennen antigene Strukturen durch Interaktion des TZR und des $CD8$ Oberflächenmoleküls mit MHC -Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von APZ oder anderen Zielzellen, wie beispielsweise virusinfizierten oder malignen Zellen. Im Gegensatz zu $CD4^+$ T-Zellen benötigen $CD8^+$ T-Zellen kein $IL-1$ für ihre Aktivierung. Ihr Wachstum ist allerdings $IL-2$ abhängig, das ihnen überwiegend durch T-Helferzellen zur Verfügung gestellt wird. Wichtige kostimulatorische Signale bei der Interaktion von $CD8^+$ T-Zellen mit APZ oder anderen Zielzellen sind wie bei der Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen verschiedene Zytokine und die Interaktion bestimmter Oberflächenmoleküle wie die vorgenannten Interaktion zwischen $CD40 - CD40L$, $CD80 / CD86 (B-7) - CD28$ oder $LFA-1 - ICAM-1$ (Isomacki et al., 2005; Daubenberger, 1997; Kayser et al., 1998) (Abb. 1.3).

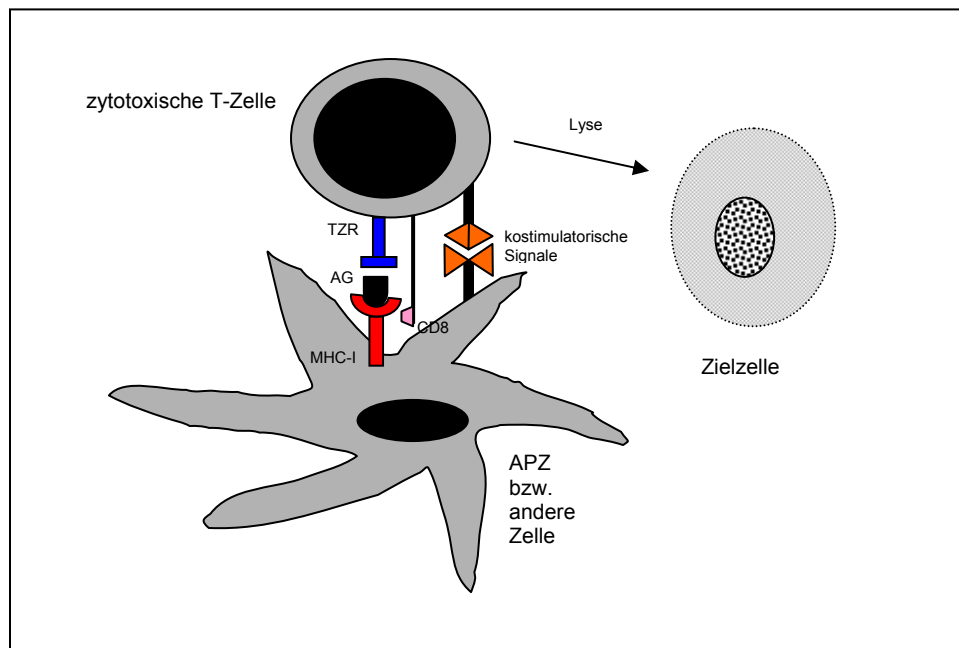


Abb. 1.3: Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen

Die Interaktion des TZR und des CD8-Oberflächenmoleküls mit dem MHC-I-Antigenkomplex führt zur Aktivierung der T-Zelle. Diese ist dann in der Lage, Zellen, die bestimmte Antigene auf ihrer Oberfläche tragen, zu lysieren.

1.1.2 Cross-priming

Zur direkten Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen ist, wie in Abbildung 1.3 dargestellt, die Interaktion der CD8⁺ T-Zelle mit dem MHC-I-Antigenkomplex notwendig. Antigene, die über MHC-I präsentiert werden, sind in der Zelle synthetisierte, endogene Antigenpeptide. Exogene Antigene, wie beispielsweise Fragmente von abgestorbenen malignen Zellen, werden in Phagolysosomen zu Peptiden verarbeitet und dann in der Regel über MHC-II auf der Zelloberfläche präsentiert. Eine Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen findet in diesem Fall vor allem indirekt über CD4⁺ T-Zellen statt (siehe Abb. 1.2).

In der letzten Zeit ergeben sich jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass es einen weiteren Mechanismus gibt, über den auch exogene Antigene in den endogenen Weg der Antigenpräsentation eingeschleust werden können. Das bedeutet, dass auch exogene Antigene über MHC-I auf APZ präsentiert werden können und hierdurch eine direkte CD8⁺ T-Zell-Antwort möglich ist. Dieses Phänomen wird als „cross-priming“ und die Präsentation von exogenen Antigenen über MHC-I als „cross-presentation“ bezeichnet (Blachère et al., 2006; Le Bon et al., 2006).

1.2 Die reduzierte Immunogenität neoplastischer Zellen – ein Problem in der Tumorabwehr

Die Kenntnis der im vorherigen Kapitel dargestellten Aktivierungsmechanismen der T-Zell vermittelten Immunantwort ist sowohl wichtig für das Verständnis der reduzierten Immunogenität neoplastischer Zellen, als auch für Konzepte, die die Entwicklung einer Leukämievakzine durch Expression immunmodulatorischer Molekülen zum Ziel haben.

Tumoren entstehen in der Regel durch das ungehemmte Wachstum einer transformierten Körperzelle. In diesem Prozess spielen einerseits die unkontrollierte Aktivierung von wachstumsinduzierenden Genen, den sogenannten Onkogenen und andererseits der Verlust bzw. die Inaktivierung in wachstumshemmenden Genen, den Tumorsuppressorgenen, eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus bestehen Störungen auf der Ebene der Zellkommunikation, der Zelldifferenzierung und letztendlich ebenfalls auf der Ebene der immunologischen Kontrolle.

Die reduzierte Immunogenität neoplastischer Zellen beruht dabei zumeist nicht auf einer primär fehlenden Antigenpräsentation. Neoplastische Zellen können auf ihrer Oberfläche zellspezifische Antigene präsentieren, die in Tumor-spezifische Antigene (TSA) und Tumor-assoziierte Antigenen (TAA) unterteilt werden. TSA werden ausschließlich von Tumorzellen exprimiert und kommen in normalem Gewebe nicht vor. Bei den meisten bis heute identifizierten Tumorantigenen handelt es sich jedoch um TAA, die sowohl auf Tumorzellen als auch in normalem Gewebe exprimiert werden, in der Regel auf Tumorzellen aber überexprimiert sind. Da es sich hierbei um physiologisch vorkommende oder nur leicht in ihrer Struktur veränderte Proteine handelt, reicht deren Expression aufgrund einer bestehenden immunologischen Toleranz meistens nicht aus, um eine suffiziente Immunantwort zu induzieren. Zu den „Tumorantigenen“, die speziell von Leukämien exprimiert werden gehört zum Beispiel das TSA Bcr-Abl, das ein durch Translokation entstandenes Genprodukt ist und fast ausschließlich bei der CML vorkommt (Wikipedia, 2007; Yang F. et al., 2005; He et al., 2001; Yasukawa et al., 1998). Ein weiteres Beispiel für eine Translokation bei der ALL ist die MLL t(11q23) oder die TAN-1 t(7;9)(q34;q34.3) bei der T-ALL. Darüber hinaus überexprimieren Leukämiezellen die TAA *human Telomerase Reverse Transcriptase* (hTERT) (Molldrem et al., 2000; Molldrem et al. 1999) und das antiapoptotische Protein Survivin (Arai et al., 2001; Minev et al., 2000; Adida et al., 1998).

Im Vergleich zu vielen soliden Tumoren, bei denen das Vorkommen von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche stark reduziert ist oder völlig fehlt, so dass selbst TSA den T-Zellen nicht in ausreichender Form präsentiert werden können, exprimieren Leukämiezellen viele MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Dennoch kommt es meistens nicht zu einer ausreichend protektiven Immunreaktion. Der Grund dafür ist das Fehlen oder die niedrige Expression wichtiger kostimulatorischer Signale, wie das IL-2, CD40, LFA-1 oder CD80 / CD86 (B-7) der

Zellen, die für eine vollständige T-Zellaktivierung notwendig sind (s. Kap. 1.1.1). Ohne kostimulatorische Signale kann der Kontakt der T-Zelle mit dem Antigen sogar die Induktion von Anergie seitens der T-Zelle zur Folge haben (Chambers et al., 2001; Alexandroff et al., 2000).

Bezüglich der Entwicklung einer Leukämievakzine scheint die genetische Modifizierung von Leukämiezellen durch die transgene Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle oder Zytokine ein erfolgversprechender Ansatz zu sein, um die Immunogenität der Leukämiezellen zu steigern und dadurch eine körpereigene Abwehrreaktion gegen die malignen Zellen zu induzieren (Kayser et al., 1998; Burmester et al., 1998; Gemsa et al., 1997).

1.3 Das Prinzip der Leukämievakzination

Ziel von Vakzinationsstrategien, mit denen sich die vorliegende Arbeit genauer beschäftigt ist es, *in vivo* eine effektive antileukämische Immunantwort zu induzieren. Dazu müssen die im Rahmen einer Leukämievakzine verwendeten Vakzinezellen zum einen in der Lage sein, spezifische Antigene auf MHC-Molekülen zu präsentieren und zum anderen die benötigten kostimulatorischen Signalmoleküle als zweites essentielles Aktivierungssignal zur Verfügung zu stellen.

Anders als bei den heute standardmäßig durchgeführten, rein prophylaktisch wirksamen Schutzimpfungen gegen Infektionskrankheiten soll eine Leukämievakzine nicht eine *de-novo* Erkrankung verhindern, sondern Schutz vor einem Rezidiv einer bereits bestehenden Erkrankung bieten. Zu diesem Zweck muss die Vakzine so wirksam sein, dass die aktivierten T-Zellen auch residuale, nach Standardtherapie noch vorhandene, leukämische Blasten erkennen und lysieren. Dabei sollte über die Leukämievakzine sowohl eine primäre T-Zell-Antwort von Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, induziert werden, als auch die Möglichkeit bestehen bereits anerge T-Zellen zu „reaktivieren“. Zudem sollen Gedächtniszellen ausgebildet werden, um langfristig bei neuerlichem Antigenkontakt, zum Beispiel in der Situation eines beginnenden Rezidivs, eine „*Recall-Antwort*“ zu ermöglichen. Zur Überprüfung der Effektivität des verwendeten Leukämievakzinationsansatzes im Tiermodell wurde in der vorliegenden Arbeit ein *Behandlungsmodell* gewählt. Das Behandlungsmodell stellt die Situation bei bestehender Resterkrankung nach, d.h. den Tieren werden zunächst Leukämiezellen appliziert und in einem zweiten Schritt die Vakzinezellen verabreicht, um zu überprüfen, ob durch die Stimulation einer antileukämischen Immunantwort das Auswachsen der Leukämie verhindert werden kann. Im Gegensatz dazu werden beim *klassischen Vakzinationsmodell* den Versuchstieren zuerst die

genetisch veränderten Vakzinezellen und dann die Leukämiezellen verabreicht (Roskrow et al., 1999). Damit wird eine Aussage hinsichtlich der protektiven Wirkung der Vakzine auf ein Auswachsen der nachträglich applizierten Tumorzellen ermöglicht. Das *Behandlungsmodell* stellt jedoch das stringentere Modell dar, weil es die klinische Situation besser nachempfindet, da auch hier eine beim Patienten bereits bestehende Erkrankung behandelt wird. Auch mögliche Probleme der leukämischen Erkrankung wie beispielsweise eine Immunsuppression durch die Erkrankung selbst werden in diesem Modell verstärkt berücksichtigt. In Abb. 1.4. wird das beschriebene Prinzip der Leukämievakzination übertragen auf die klinische Situation dargestellt.

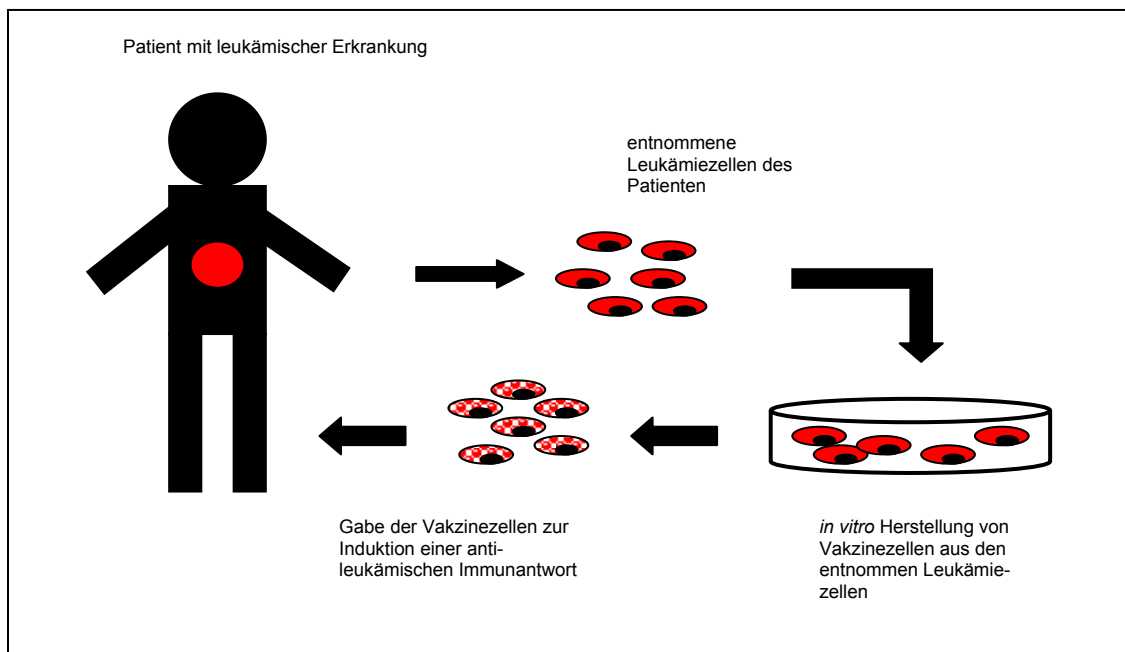


Abb. 1.4: Das Prinzip der Leukämievakzination in der klinischen Anwendung

Ansatzpunkt ist eine bereits vorliegende leukämische Erkrankung. Dem Patienten werden zuerst Leukämiezellen entnommen aus denen in vitro sogenannte Vakzinezellen hergestellt werden. Diese Vakzinezellen werden anschließend dem Patienten wieder zurückgegeben und sollen in vivo eine Immunantwort gegen die Leukämie induzieren.

Grundlage einer zellulären Vakzine sind, wie bereits erwähnt, genetisch veränderte „Vakzinezellen“, die zur Induktion einer Immunantwort führen sollen. Als Vakzinezellen können dabei entweder klassische APZ verwendet werden, die entsprechend mit einem definierten Antigen beladen werden, oder die neoplastische Zelle selbst wird durch genetische Modulation zur „APZ“ verwandelt und dann als Vakzinezelle eingesetzt. Erstere

Möglichkeit eignet sich nur zur Behandlung von malignen Erkrankungen, die bekannte und charakterisierte TSA präsentieren, wie beispielsweise maligne Melanome oder Prostata Tumoren aber auch Leukämiezellen. Ein potentieller Nachteil *in vitro* angezüchteter APZ, die mit einzelnen spezifischen TSA beladen werden ist, dass keine breite Immunantwort gegen das gesamte Spektrum der TSA und TAA der jeweiligen malignen Erkrankung induziert wird. Dadurch kann es leichter zur Ausbildung von *Escape* – Phänomenen kommen, die die dauerhafte Induktion einer suffizienten Immunantwort verhindern. Aus diesem Grund verwendet der in der vorliegenden Arbeit angewandte Ansatz zur Überprüfung der Wirksamkeit einer Leukämievakzine die Leukämiezellen selber zur Herstellung der Vakzine. Die Immunantwort wird so gegen das gesamte komplexe Repertoire der auf Leukämiezellen präsentierten Antigene ausgebildet. Die genetische Modifikation der Leukämiezellen geschieht mittels viraler Vektoren, die die genetischen Informationen in die Zellen einschleusen. Dabei muss bedacht werden, dass leukämische Blasten, insbesondere die Blasten der ALL, *in vitro* kaum bzw. gar nicht proliferieren und sich daher mit den bisher gängigen Vektorsystemen nur sehr schwer infizieren lassen. Es wird deshalb ein Vektorsystem benötigt, das in der Lage ist, genetisches Material zur Modifikation in ruhende Zellen einzubringen. Im Hinblick auf diese Überlegungen haben sich in den letzten Jahren auf Herpes simplex Viren (HSV) basierende Vektoren als attraktive Gentransfersysteme erwiesen, da es über diese Vektoren möglich wird, genetisches Material auch in nicht-mitotische Zellen einzuschleusen. Ziel der genetischen Veränderungen wäre, dass *in vitro* modifizierte Vakzinezellen *in vivo* kostimulatorische Moleküle zu Verfügung stellen, die ansonsten für eine suffiziente antileukämische Immunantwort fehlen.

1.3.1. Rolle der Zytokine bzw. kostimulatorischen Moleküle

Leukämiezellen exprimieren auf ihrer Oberfläche ausreichend viele MHC-Moleküle, so dass ein Kontakt von T-Zellen mit entsprechenden Antigenen möglich ist. Aufgrund von fehlenden kostimulatorischen Signalen kommt es im Folgenden aber nicht zur Induktion einer antileukämischen Immunantwort. Ziel der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Vakzinationsstrategien ist es, über die Expression des Zytokins IL-2 und des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 erstens eine Immunantwort zu induzieren und zweitens die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen sowie die Ausbildung von Gedächtniszellen zu stimulieren.

Interleukin-2 (IL-2)

CD8⁺ T-Zellen sind einerseits in der Lage, Zellen zu lysieren und andererseits Gedächtniszellen auszubilden, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere gezielte Immunantwort zulassen. Ihr Wachstum ist IL-2-abhängig. Dieses wird ihnen in der Aktivierungskaskade durch T-Helferzellen zur Verfügung gestellt (s. Kapitel 1.1.1). Durch den Einsatz von IL-2 in der Leukämievakzine wird eine von CD4⁺ T-Zellen unabhängige Proliferation der zytotoxischen T-Zellen ermöglicht bzw. die durch T-Helferzellen induzierte Proliferation verstärkt. Beim IL-2 handelt es sich um ein vierfach helikal gebündeltes Zytokin, das von T-Zellen produziert wird (Bazan, 1992). Es wirkt sowohl autokrin als auch parakrin auf die Zielzelle und aktiviert zytotoxische T-Zellen sowie natürliche Killerzellen bzw. stimuliert deren Wachstum (Fehervari et al., 2006; Foreman et al., 1993; Gottlieb et al., 1989; Handgretinger et al., 1989; Oshimi et al., 1986).

CD70

Beim CD70 handelt es sich um ein kostimulatorisches Molekül, das zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor Superfamilie gehört. Es ist ein transmembranes Glykoprotein vom Typ II und wird auf einigen peripheren aktivierten B-Gedächtniszellen, auf Plasmazellen und auf einigen B-Lymphozyten in Keimzentren von lymphatischen Organen exprimiert (Durkop et al., 1997; Hintzen, Lens et al. 1994; Goodwin et al., 1993). Auch einige Tumoren und B-Zell-Leukämien tragen CD70 auf ihrer Zelloberfläche (Zambello et al., 2000; Trentin et al., 1997). Allgemein ist die CD70 Expression auf malignen Zellen, so auch auf malignen B-Zellen, jedoch meistens nur schwach ausgeprägt. Der Ligand von CD70 ist CD27. Dabei handelt es sich um ein Glycoprotein vom Typ I, das auf der Mehrzahl der peripheren T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NKZ) und einzelnen B-Zellsubpopulationen exprimiert wird.

Die CD70-CD27 Interaktion führt auf T-Zellebene zur Aktivierung der T-Zellen sowie zur Proliferation, Zytokinproduktion und Aufrechterhaltung der Langzeitimmunität (Hendriks et al., 2000; Nagumo et al., 1998; Hintzen et al., 1995; Agematsu et al., 1994).

Bei B-Lymphozyten wird die Aktivierung, Proliferation, Plasmazellbildung und die Immunglobulinsynthese gesteuert (Morimoto et al., 2000; Agematsu et al., 1998 & 2000; Nagumo et al., 1998 & 1998; Jacquot et al., 1997; Kobata et al., 1995).

In Bezug auf den Einsatz dieses kostimulatorischen Moleküls im Rahmen einer Leukämievakzine führt CD70 also nicht nur zur Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen sondern vor allem auch zu ihrer Proliferation und Expansion sowie zur Ausbildung von T-Gedächtniszellen und zur Aktivierung von natürlichen Killerzellen (Borst et al., 2005; Arens et al., 2004; Taraban et al., 2004; Kazuyoshi et al., 2000). Es kann dadurch entscheidend zur Ausbildung einer antileukämischen Immunantwort beitragen (Troeger et al., 2005).

Über die Expression von CD70 wird also eine von T-Helferzellen bzw. IL-2 unabhängige Aktivierung und Proliferation von CD8⁺ T-Zellen möglich (Bullock et al., 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Leukämievakzine sollte jedoch auf einer kombinierten Expression von IL-2 und CD70 basieren, da die zusätzliche Kombination mit dem Zytokin IL-2 zu einer Verstärkung der Aktivierung der natürlichen Killerzellen führt (Vereecque et al., 2000; Stripecke et al., 1999; Nakazaki et al., 1998; Dunussi-Joannopoulos et al., 1997; Yang et al., 1996).

1.4 Herpes simplex Typ-1 (HSV-1)-Vektorsysteme zur Leukämievakzination

In Kapitel 1.3 wurde das Prinzip der Leukämievakzination zur Induktion einer antileukämischen Immunantwort beschrieben. Zur Generierung der genetisch veränderten Vakzinezellen sind Vektoren nötig, die zusätzliche genetische Informationen in die Zielzellen einbringen können. Für diesen Gentransfer werden heutzutage verschiedene virale und nicht-virale Vektoren benutzt. Das Prinzip des Gentransfers mittels viraler Vektoren besteht darin, die Hülle und damit den Eindringmechanismus des Wildtypvirus zu verwenden, um fremde bzw. die therapeutisch nutzbare DNA in die Zielzellen einzuschleusen.

In den letzten Jahren haben sich auf Herpes simplex Viren (HSV) basierende Vektoren als attraktive Gentransfersysteme für verschiedene Anwendungsmöglichkeiten erwiesen. Ursprünglich wurden diese Vektoren aufgrund ihres Neurotropismus für den Gentransfer in neuronale Zellen zur gentherapeutischen Behandlung bestimmter Nervenerkrankungen entwickelt (Glorioso et al., 2003). Im Verlauf konnte dann auch der Gentransfer in andere Zielzellen wie beispielsweise Blasten der chronischen lymphatischen Leukämie (Tolba et al., 2001), Hepatozyten (Fraefel et al., 1997) und Myozyten (Wang et al., 2002) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden auf Herpes simplex Typ-1 (HSV-1) basierende virale Vektoren für den Gentransfer eingesetzt. Die Vielseitigkeit von auf HSV-1 basierenden Vektoren im Hinblick auf den Gentransfer auch in schwer zu transduzierende Zielzellen basiert auf drei Hauptcharakteristika. Erstens besitzen HSV-1-Vektoren die Möglichkeit große Mengen von fremder DNA zu tragen. Das HSV-1 Genom hat eine Größe von ca. 152 kb und kodiert für mehr als 75 Gene, von denen 38 nicht essentiell für die Virusreplikation sind (Ward et al., 1994). Es können daher große Teile des viralen Genoms im Rahmen der HSV-1-Vektorherstellung durch therapeutisch nutzbare Fremd-DNA ersetzt werden. Durch diese Möglichkeit große Mengen von Fremd-DNA zu transportieren (Sena-Estevés et al., 2000), kann die kombinierte Expression von zwei oder mehreren immunmodulatorischen Molekülen erreicht werden. Dies ist eine essentielle Bedingung für die Herstellung einer

effektiven Leukämievakzine (Verecque et al., 2000; Stripecke et al., 1999; Nakazaki et al., 1998; Dunussi-Joannopoulos et al., 1997; Dilloo et al., 1996).

Das zweite Hauptcharakteristikum von HSV-1-Vektoren ist die hohe Infektiosität und der breite zelluläre Tropismus, der sich sogar auf ruhende Zielzellen erstreckt. Dadurch wird es möglich, auch hämatopoetische Zellen bzw. leukämische Blasten, die *in vitro* kaum bzw. gar nicht proliferieren effektiv zu transduzieren (Tolba et al., 2001; Kutubuddin et al., 1999; Dilloo et al., 1997).

Drittens besitzen auf HSV-1 basierende Vektoren starke Promotoren, die eine hohe Transgenexpression in Zielzellen ermöglichen (Roizman et al., 2001).

HSV-1 Amplikonvektoren

Im Vergleich zu rekombinanten HSV-Vektoren, bei denen einzelne Virusgene durch Transgene ersetzt werden, wird für die Herstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HSV-1 Amplikonvektoren ein transgentragendes Plasmid (Amplikonplasmid) benutzt, welches lediglich eine kurze Sequenz des HSV-Genoms trägt. (Abb. 1.5) Dabei sind die wichtigsten Bestandteile der HSV-Replikationsursprung *ori_s* und das DNA-Verpackungssignal *pac* (Spaete et al., 1982).

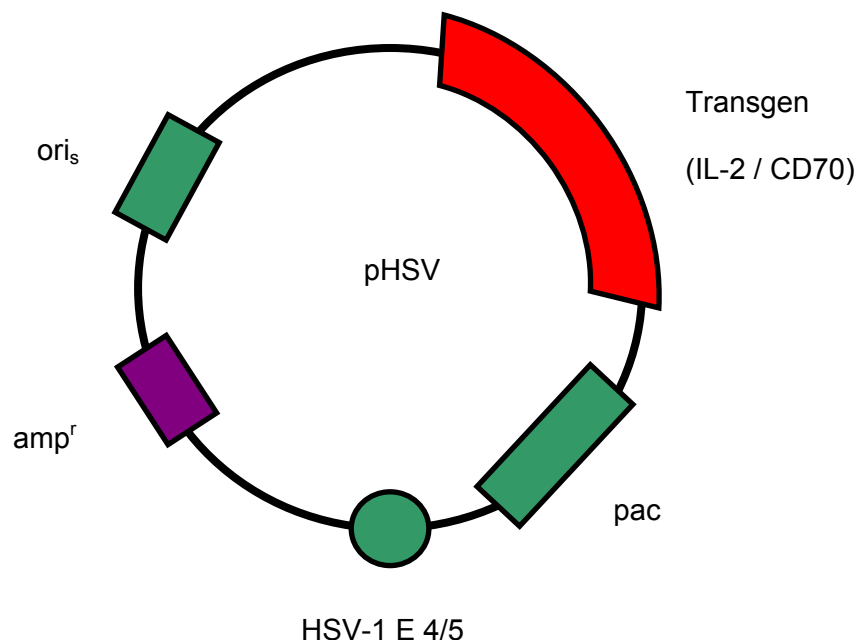


Abb. 1.5: Das HSV-1 Amplikonplasmid

Die Abbildung zeigt das HSV-1-Amplikonplasmid (pHSV), das folgende genetische Elemente enthält: eine Transgenkassette (Transgen IL-2 / CD70), das HSV-Verpackungssignal (*pac*), den HSV-Replikationsursprung (*ori_s*), den HSV-Promotor (HSV-1 E 4/5) und ein Gen zur Antibiotikaresistenz (*amp^r*).

Aufgrund eines „Rollmechanismus“ bei der Replikation können mehrere End-zu-End Kopien, sogenannte Konkatomere, des Amplikonplasmids bis zu einer Größe von maximal 150 kb, welches der Größe des HSV-1 Wildtypgenoms entspricht, in virale Vektorpartikel verpackt werden.

Für die Herstellung von Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren werden Verpackungszellen zuerst mit dem transgenetrischen Amplikonplasmid (s. Abb. 1.5) transfiziert und in einem zweiten Schritt mit einem replikationsdefekten HSV-1 Helfervirus infiziert. Bei dem Helfervirus handelt es sich um eine Deletionsmutante des HSV Wildtypvirus, die Deletionen für essentielle Replikationsgene, wie z.B. das *infected cell protein 4 (ICP4)* aufweist. Dadurch wird eine Replikation der Helferviren im Zielorganismus verhindert. Im Prozess der Amplikonherstellung werden diese fehlenden Gene durch die entsprechenden Verpackungszellen bereitgestellt, so dass an dieser Stelle eine Replikation ermöglicht wird. Die Interaktion des Amplikonplasmids mit HSV-1 Strukturproteinen und Enzymen der Helferviren ermöglicht die Verpackung des Amplikonplasmids zu Vektorpartikeln. Im Ergebnis der Vektorpräparation entstehen jedoch neben den Amplikonvektoren auch unterschiedliche Mengen an „leeren“ Helferviruspartikeln, die nicht das Transgen tragen, aber in der Lage sind, virale Proteine zu exprimieren (DeLuca et al., 1985) (Abb. 1.6). In der vorliegenden Arbeit werden die Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren im Folgenden entsprechend des Transgens als HSV.CD70 bzw. HSV.IL-2 bezeichnet.

Ein neues HSV-1 Vektorsystem erlaubt nunmehr die Herstellung von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren. Diese geschieht mittels Ko-Transfektion des transgenetrischen Amplikonplasmids mit einem artifiziellen bakteriellen Chromosom (BAC). Dieses Konstrukt ersetzt die Rolle der Helferviren, indem es die erforderlichen HSV-1 Proteine *in trans* bereitstellt (Saeki et al., 1998 & 2001; Stavropoulos et al., 1998, Horsburgh et al., 1999). Auch bei diesem Vektorsystem werden Verpackungszellen benötigt, da das BAC weder das DNA-Verpackungssignal *pac*, noch das *infected cell protein 27 (ICP27)* trägt, um eine Replikation im Zielorganismus bzw. eine Bildung von Wildtypviren zu verhindern. Im Ergebnis der Vektorpräparation entstehen neben den Amplikonvektoren keine „leeren“ Helferviruspartikeln (Abb. 1.6). In der vorliegenden Arbeit werden die Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren im Folgenden entsprechend des Transgens als BAC.CD70 bzw. BAC.IL-2 bezeichnet.

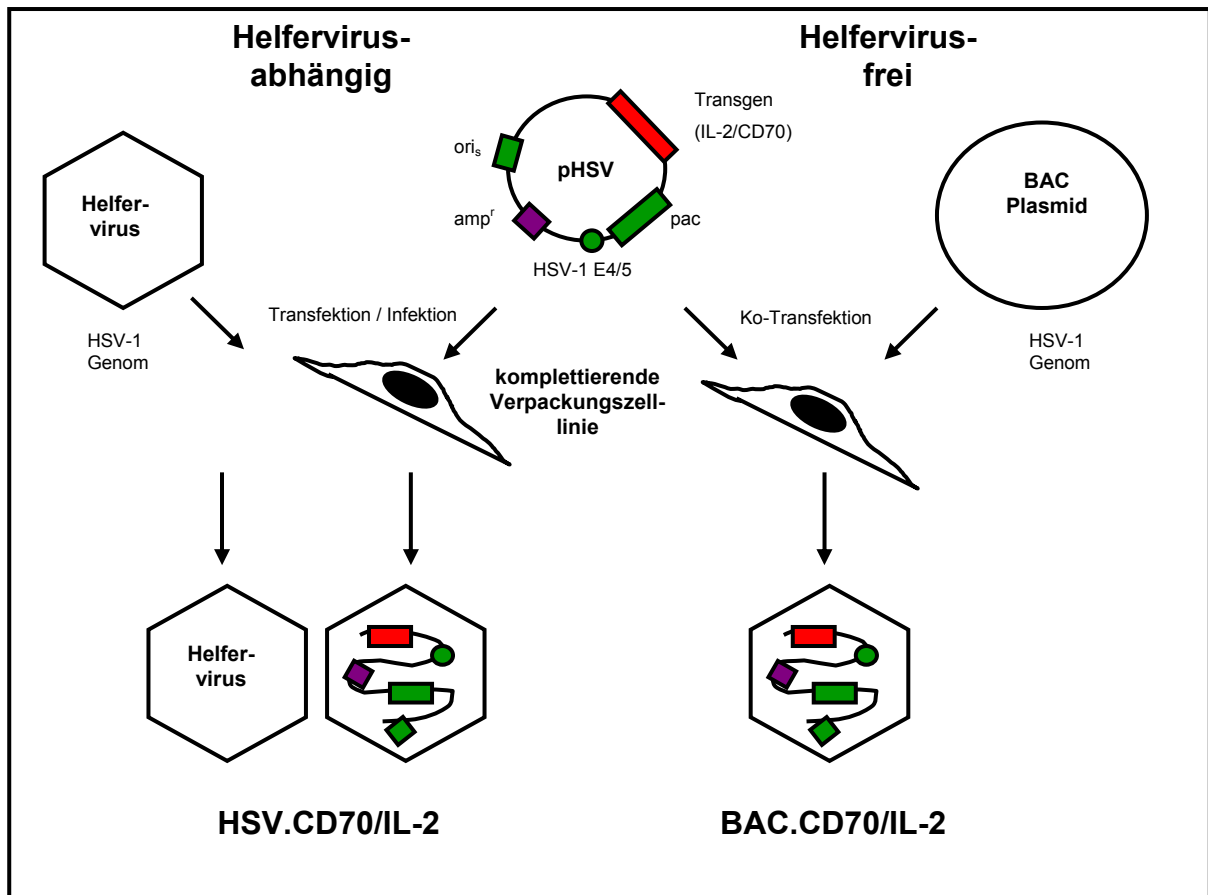


Abb. 1.6: Die Herstellung von Helfervirus-abhängigen und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren

Für die Herstellung von Helfervirus-abhängigen bzw. Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren wird eine komplettierende Verpackungszelllinie benötigt, die die essentiellen Gene zur Replikation bereitstellt. Das Transgen wurde in beiden Fällen in ein Amplikonplasmid (pHSV) kloniert (s. Abb. 1.5).

Zur Herstellung von Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren wird das Amplikonplasmid zuerst mit der komplettierenden Verpackungszelllinie transfiziert und in einem zweiten Schritt mit dem Helfervirus infiziert. Am Ende der Präparation erhält man Amplikonstocks, die sowohl die transgentragenden Amplikonvektoren enthalten, als auch Helferviruspartikel.

Die Präparation von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren ist vergleichbar mit der der Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren, nur dass die Infektion mit dem Helfervirus durch die Ko-Transfektion mit dem BAC ersetzt wird. Hierdurch entstehen Amplikonstocks, die neben den transgentragenden Amplikonvektoren keine Helferviruspartikel enthalten.

Die Transduktion mit sowohl Helfervirus-abhängigen, als auch Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren hat einen nicht-korrektiven Gentransfer zur Folge, der in den Zielzellen zu einer transienten Transgenexpression führt. Für die meisten gentherapeutischen Anwendungen, im speziellen für den nicht-korrektiven Gentransfer, sind die Zielzelltoxizität und die Vektorimmunogenität unerwünschte Vektoreigenschaften. Beim Helfervirus-abhängigen HSV-1 Vektorsystem führt die Expression von herpesviralen Proteinen durch

Helferviruspartikel zu einer erhöhten Zytotoxizität (Johnson et al., 1992). In Bezug auf die Herstellung einer Leukämievakzine ergibt sich daher ein Nachteil für die Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren (Geller et al., 1988). Die Wirksamkeit einer Leukämievakzine basiert auf einer ausreichend langen Transgenexpression, denn nur dann wird eine Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer antileukämischen Immunantwort möglich. Dies setzt wiederum eine ausreichende lange Überlebenszeit der Vakzinezellen voraus.

Die Verfügbarkeit von Helfervirus-freien und Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren ermöglicht nun eine vergleichende Bewertung der Transgenexpression in Relation zur Zielzelltoxizität und Immunogenität.

1.4.1 Herpesviruseingangsmediatoren (Hve)

Auf Herpes simplex Viren (HSV) basierende Vektoren zeichnen sich durch eine hohe Infektiosität und einen breiten zellulären Tropismus aus. Die Einschleusung von Herpes simplex Viren in Zellen von Säugetieren folgt einer komplexen Kette von Einzelschritten, welche die HSV-Hüllglykoproteine B und / oder C sowie zelluläre Oberflächenmoleküle umfasst (Bender et al., 2005; Geraghty et al., 1998; Herold et al., 1994; Spear et al., 1992; WuDunn et al., 1989). Nachdem HSV zunächst an Zelloberflächenproteoglykanen gebunden wurde, sind weitere Rezeptoren für die Einschleusung der Viren in die Zielzellen notwendig. Diese Membranproteine sind bereits charakterisiert und werden als Herpesviruseingangsmediatoren (Hve) bezeichnet, wobei HveA, HveB und HveC unterschieden werden. HveA gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (Mauri et al., 1998; Montgomery et al., 1996) wohingegen HveB und C der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet werden (Geraghty et al., 1998; Warner et al., 1998). HSV Typ-1 scheinen dabei bevorzugt HveA und HveC zur Einschleusung zu verwenden, während die meisten HSV Typ-2 sich des HveB bedienen (Geraghty et al., 1998; Mauri et al., 1998; Warner et al., 1998; Montgomery et al., 1996).

Es ist also wichtig sicher zu stellen, dass die Zielzellen für eine Leukämievakzine mittels HSV-Vektorsystemen diese Herpesviruseingangsmediatoren besitzen, da ansonsten eine effiziente Transgenexpression nicht erzielt werden kann.

2. Ziele der Arbeit

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Eignungsprüfung von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zur genetischen Modifikation von primären humanen Blasten im Rahmen der Generierung einer Leukämievakzine zur immuntherapeutischen Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie. Hierzu sollen die immunstimulatorischen Moleküle CD70 und IL-2 mittels Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren *ex vivo* in die patienteneigenen Lymphoblasten eingebracht werden, um durch die transgene Expression dieser kostimulatorischen Signale die Immunogenität der Blasten so zu steigern, dass sie als Leukämievakzine zur Stimulation einer effektiven und leukämiespezifischen Immunantwort appliziert werden können.

Auf dem Weg zur Etablierung dieser Vakzinationstrategie für den klinischen Einsatz lassen sich verschiedene Teilziele abgrenzen:

2.1. Vergleich zwischen Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren (HSV) und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (BAC) hinsichtlich Transgenexpression und Zytotoxizität in Leukämiezellen *in vitro*

Zunächst wurden Helfervirus-abhängige HSV-1 Amplikonvektoren als auch Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren hinsichtlich der nach Transduktion erzielten Transgenexpression und Zytotoxizität *in vitro* untersucht.

Zu diesem Zweck wurden einerseits zur Wirksamkeitsprüfung der Vakzinationsstrategie im Mausmodell die murine Zelllinie A20 und andererseits im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung auch unterschiedliche humane Leukämie-/Lymphomzelllinien sowie primäre leukämische Blasten mit den verschiedenen Amplikonvektoren transduziert und die Expression des kostimulatorischen Oberflächemoleküls CD70 bzw. des Zytokins IL-2 sowie die Zytotoxizität bestimmt.

Diese vergleichende Untersuchung sollte einerseits klären, ob Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren eine ähnlich gute Transduktionseffizienz, gemessen an der Transgenexpression, besitzen wie Helfervirus-abhängige HSV-1 Amplikonvektoren. Zum anderen sollte die Frage beleuchtet werden, ob die für andere Zielzellen bereits nachgewiesene geringere Zytotoxizität dieser neuen Generation von HSV-1 Amplikonvektoren bei ihrer Verwendung für den Gentransfer in Blasten der akuten lymphatischen Leukämie ebenfalls zum Tragen kommt.

2.2 Expression von Herpesviruseingangsmediatoren (Hve) auf humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und primären leukämischen Blasten

Es ist davon auszugehen, dass eine erfolgreiche Transduktion mit auf Herpes simplex basierenden Vektoren vor allem dann stattfinden kann, wenn alle drei HSV-Rezeptorgene (HveA, B, C) auf der Oberfläche der Zielzellen vorhanden sind. In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß die in der Arbeit als Zielzellen untersuchten humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und primäre leukämische Blasten die entsprechenden Rezeptoren besitzen und ob es einen Zusammenhang zwischen den auf der Zelloberfläche vorhandenen HSV-Rezeptorgenen und der Transgenexpression gibt.

2.3 Überprüfung der Wirksamkeit einer durch Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren ex vivo generierten Leukämievakzine

Der antineoplastische Effekt einer Leukämievakzine, die durch den Gentransfer der immunstimulatorischen Moleküle CD70 und IL-2 mit Hilfe von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren *ex vivo* hergestellt wurde, sollte abschließend in einem *in vivo* Modell überprüft werden. Hierzu wurden Mäusen mit einer hochmalignen und rasch dissimulierenden präB-Zellerkrankung syngene Leukämiezellen, die nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren transgen CD70 und IL-2 exprimieren, als Vakzine appliziert. Mit diesen Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob die neue Generation der HSV-1 Amplikonvektoren dazu geeignet ist leukämische Vakzinezellen zu generieren, die *in vivo* eine protektive, anti-leukämische Immunantwort induzieren können.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

- CD19 (FITC) Immunotech, Krefeld, Deutschland
- CD19 (PE) Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
- CD3 (PerCP) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- CD33 (PE) Immunotech, Krefeld, Deutschland
- CD34 (FITC) Immunotech, Krefeld, Deutschland
- CD45r (FITC) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- CD56 (PE) Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
- CD70 (PE) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- CD70 human (PE) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- CD80 (PE) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- CD86 (PE) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- H₂KD (FITC) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- HLA abc (FITC) Immunotech, Krefeld, Deutschland
- HLA-DR (FITC) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- IAD (PE) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- IgG 1 (FITC) Immunotech, Krefeld, Deutschland
- IgG 2a (FITC) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- IgG 2b rat (PE) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- ISO (PerCP) BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- Isotyp (PE/FITC) Immunotech, Krefeld, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- LiCl Sigma, Taufkirchen, Deutschland

- Ammoniumchlorid-Lösung sterilisiert, isotonisiert; Universitätsklinikum Düsseldorf Apotheke (1000 ml enthalten NH_4Cl 8,3g; KHCO_3 1,0g; EDTA-Na_2 0,0375g; Aq. ad. iniect. ad 1000,0 ml)
- Bicarbonat-Puffer Carbonate-Bicarbonate Buffer Capsules, Sigma, Steinheim, Deutschland
- BSA Albumine Bovine Serum, Sigma, Steinheim, Deutschland
- Butanol Merck, Darmstadt, Deutschland
- CaCl_2 Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- CsCl Serva, Heidelberg, Deutschland
- Chloramphenicol Serva, Heidelberg, Deutschland
- DMSO Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Ethanol Apotheke Universität Düsseldorf, Deutschland (80% (V/V) mit 1% Polyether vergällt)
- Ethanol Merck, Darmstadt, Deutschland (Ethanol 100%)
- Ethidiumbromid (EtBr) Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland (für BAC)
- Ethidiumbromid (EtBr) Sigma, Steinheim, Deutschland
- Geneticin (G418) GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- Glycerin Merck, Darmstadt, Deutschland
- H_2SO_4 Merck, Darmstadt, Deutschland
- Isopropanol Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kristallviolett-Lösung Grams-Kristallviolett, Merck, Darmstadt, Deutschland
- MgCl_2 Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Natriumazid (NaN_3) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Paraformaldehyd Merck, Darmstadt, Deutschland
- $\text{PBS} + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ $\text{PBS} + \text{CaCl}_2$ (100mg/l) + MgCl_2 (100mg/l)
- Propidiumiodid Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Succrose Merck, Darmstadt, Deutschland
- TAE Puffer Maniatis : „Molecular Clonig" A Laboratory manual, Second Edition, J. Sambrook; E.F. Fritsch; T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989, Band 1-3
- TE-Puffer Maniatis : „Molecular Clonig" A Laboratory manual, Second Edition, J. Sambrook; E.F. Fritsch; T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989, Band 1-3
- Trypan Blue Sigma, Steinheim, Deutschland

- TWEEN 20 Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.3 ELISA

- ELISA-Kit IL-2 Eli-pair, Diaclone, Besacon, Frankreich
- ELISA Messgerät Sunrise, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
- ELISA-Software Magellan Vers. 2.5 Instrument Control and Data Analysis Software, Tecan, Crailsheim, Deutschland
- Maxi Sorp Nunc Platte NUNC™ Serving Life Science Apogent_{TR}, Dänemark

3.1.4 Geräte

- Neubauerzählkammer Welabo, Düsseldorf, Deutschland
- Megafuge 1.OR Megafuge 1.OR, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Einfriercontainer Nalgene Labware, Rochester, NY, USA
- Inkubator Thermo Forma, Marietta, Ohio, USA
- Zellkulturbank Holton Lamin Air, Heto-Holton A/S, Allerød, Dänemark
- Mikroskop Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- Pipettierhilfe Pipetboy, Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
- Pipetten Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Facs-Röhrchen Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- Facs-Gerät FACS-Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- Facs-Software Cell Quest Vers.3.3, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- Ultraschallgerät Branson Sonifier 450, Danbury, USA
- Zentrifuge J2-HS Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
- Rotor JA -10 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
für 500 ml Zentrifugenbecher von Beckman
- Rotor JA -12 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
für 50 ml Falcon Tubes
- Rotor JA -20 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
für 30 ml Zentrifugenröhrchen von Beckman

- Zentrifuge J2 -21 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
- Rotor JA -10 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
für 500 ml Zentrifugenbecher von Beckman
- Ultrazentrifuge L8-70M Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
- Rotor SW.41 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
für Ultra Clear™ Tubes (14x95mm), Beckman
- Rotor VTI 65 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
für Quick Seal Centrifuge Tubes (13x51mm), Beckman
- Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg
Deutschland
- Bakterienschüttler Certomat BS-T, B. Braun Biotech International
- Gelkammern Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems,
Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
- Stromquellen Standard Power Pack P25, Biometra®, Göttingen,
Deutschland
- Photometer Spectrophotometer, Beckman Coulter DV 640B;
Küvette Qs 1001

3.1.5 PCR

- RNeasy® Mini Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
- First-strand cDNA Synthesis Kit Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- Primer MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
- β-Actin-Primer MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
- 10x Puffer Qiagen, Hilden, Deutschland
- dNTP (10mM) Qiagen, Hilden, Deutschland
- Taq-Polymerase Qiagen, Hilden, Deutschland
- Trio Thermblock™ Biometra®, Göttingen, Deutschland
- Loading Buffer (6x) Fermentas GmbH, St. Leon Rot, Deutschland
- 100 bp Ladder Fermentas GmbH, St. Leon Rot, Deutschland
- Biozym-Agarose Biozym Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Fluor-S Multimanager Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
- Multianalyst Software Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany

3.1.6 Plasmide und Plasmid Kit

- pHSV CD70 Mix II freundlicherweise überlassen von Dr. M. Roskow, GSF München
- pHSV IL-2 2.10.00 wurde in unserem Labor von Herrn Dr. A. Zibert hergestellt
- pHSV Δ 10.3.99 wurde in unserem Labor von Herrn Dr. A. Zibert hergestellt
- f-HSV Δ pac Δ 27 Δ KN Saeki Y et al. Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome.
Mol Ther 2001; 3: 591-601
- pEBH ICP 27 28.6.00 freundlicherweise überlassen von Dr. C. Fraefel, Universität Zürich, Schweiz
- QIAGEN Plasmid Kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.7 Tierversuche

- BALB/cBYJ Mäuse TVA HHU Düsseldorf, Deutschland
- Bestrahlungsgerät Gammacell[®] 1000 Elite MDS Nordion, Science Advenging Health, Ottawa, Canada
- 1ml Spritzen Omnifix[®]-F 1ml SOLO, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Kanüle s.c. Microlance[®] 3 25G A1 0,5x25, Becton Dickinson, Drogheda, Ireland
- CD4-AK J. Mysliwietz, GSF National Research Center for Environment and Health, München, Deutschland
- CD8-AK J. Mysliwietz, GSF National Research Center for Environment and Health, München, Deutschland
- CD4 (Rat anti mouse PE anti mouse CD4 (L3T₄), BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
- CD8 (Rat anti mouse FITC anti mouse CD8 (Ly2), BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

3.1.8 Viren

- d120 Helferviren Bergold PJ, Casaccia-Bonnel 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 USA 1993; 90: 6165-6169

3.1.9 Zellen

- 7B Zellen Derivat einer Affennierenzelle (Vero), die das HSV ICP4 und ICP27 exprimieren, freundlicherweise von M. Roskow, GSF, München erhalten
- RR-1 Zellen Johnson PA et al. Cytotoxicity of a replication-defective mutante of herpes simplex virus type 1. J Virol 1992; 66: 2952-2965
- 2-2 Verozellen Smith et al., 1992; freundlicherweise von Herrn PD Cornel Fraefel, Institut für Virologie der Universität Zürich zur Verfügung gestellt
- A20 Zellen American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA)
- AD Zellen Dilloo et al. A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. Blood 1997; 89: 119-127
- Daudi Zellen ATCC, Manassas, VA, USA
- Jurkat Zellen ATCC, Manassas, VA, USA
- HL60 Zellen ATCC, Manassas, VA, USA

3.1.10 Zellkulturmedien

- DMEM GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- RPMI 1640 GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- FCS GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- Penicillin / Streptomycin (10.000 U / ml) GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK

- L-Glutamin (200 mM) GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- PBS-Puffer pH 7,3 Serag Wissner, Naila, Deutschland
- PBS steril PAA Laboratories, Österreich (Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (1x))
- Trypsine EDTA (1x) PAA Laboratories, Österreich
- Aqua dest. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland (Aqua ad iniectabilia Braun)
- Low melting point agarose Sea Plaque GTG agarose, FMC Bio Products, Rockland, Maine, USA
- 10 x MEM Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- 1 x MEM Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Lipofectamine GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- OptiMEM I GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- LB - Medium Sigma, Steinheim, Deutschland

3.1.11 Zellkulturgefäße / -geräte

- Zentrifugenröhrchen Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland (15 ml Falcon Tube)
- Zentrifugenröhrchen Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA (50 ml Falcon Tube)
- Cryoröhrchen Costar Corning, NY, USA
- Zellkulturflaschen Costar Corning, NY, USA
- Well-Platten Costar Corning, NY, USA (Tissue Culture Treated)
- Pasteurpipetten Brand, Wertheim, Deutschland
- Serumpipetten Costar Corning, NY, USA
- Pipettenspitzen WELABO Laborbedarf, Düsseldorf, Deutschland
- Cell-Scraper NUNC™, Nalge Nunc International Brand Products, USA
- Faltenfilter Schleicher&Schuell GmbH, Porendurchmesser 125 mm, Kassel, Deutschland)
- Dialyseschlauch ZelluTrans ROTH, MWCO: 8,000-10,000, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Eppendorfgefäße Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

▪ Zellzählung

Für eine Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot von ca. 100 µl der Zellsuspension steril entnommen und mit PBS verdünnt, so dass eine Zellzahl zwischen 20-150 Zellen pro Quadrant einer Neubauer Zählkammer erreicht wurde. 20 µl Trypan-Blau Lösung wurde zur Färbung von 80 µl Zellsuspension verwendet. 10 µl dieser Suspension wurde auf eine Neubauer Zählkammer aufgebracht und die ungefärbten, vitalen Zellen in mindestens 2 Quadranten ausgezählt. Für die Berechnung der Zellzahl (Zellzahl pro ml) wurde die Summe der gezählten Zellen mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch die Anzahl der ausgezählten Quadrate dividiert. Das Ergebnis wurde mit dem Faktor für die Neubauer Zählkammer (FNZ = 10^4) multipliziert.

Formel: Zellzahl / ml = gezählte Zellen / Anzahl Quadranten x Verdünnungsfaktor x FNZ

▪ Auftauen von Zellen

Kryoröhrchen mit Zellen, die zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff lagerten, wurden unter Schwenken in einem auf 37°C vorgeheizten Wasserbad aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisklumpen sichtbar war. Danach wurde die aufgetaute Zellsuspension unter sterilen Bedingungen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde nochmals mit 1 ml Medium ausgespült. Unter Schwenken wurde 10 ml Medium tropfenweise zu der Zellsuspension pipettiert und diese für 5 Min. bei 1400 rpm (Megafuge 1.OR) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Medium für die weitere Kultivierung resuspendiert.

▪ Einfrieren von Zellen

Vor dem Einfrieren wurde die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen 5 min bei 1400 rpm (Megafuge 1.OR) zentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium bestand aus 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO. Es wurden zwischen $1-4 \times 10^6$ Zellen / 1,5 ml Einfriermedium unter sterilen Bedingungen in die

Kryoröhrchen überführt und unverzüglich in einem Einfriercontainer bei -80°C eingefroren. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

▪ Kultivierung von Zellen

Zelllinien, die für längere Zeit in Kultur gehalten werden sollten, wurden in Zellkulturflaschen, bzw. auf Well-Platten (Tab. 3.2.1), im Inkubator bei Standardkulturbedingungen (37°C und $5\% \text{CO}_2$) kultiviert.

Größe der Zellkulturflasche bzw. der Well -Platte	Menge des verwendeten Mediums pro Zellkulturflasche bzw. pro Well
Ty 25	7,5 ml
Ty 75	10 ml
Ty 175	20 ml
96-Well-Platte	200 μl
48-Well-Platte	500 μl
24-Well-Platte	1 ml
12-Well-Platte	2 ml
6-Well-Platte	2-3 ml

Tab. 3.2.1: Menge des verwendeten Mediums in Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturflasche bzw. der Well-Platte

Die Tabelle 3.2.2 zeigt eine Aufstellung der verwendeten Zellen und der entsprechenden Kulturmedien.

Zelllinie	Medium
7B (ICP4 positive Verpackungszelllinie)	DMEM +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin
RR 1 (ICP4 positive Verpackungszelllinie)	DMEM +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin + 500 μl / ml G418

2-2 Verozellen (ICP27 positive Verpackungszelllinie)	DMEM +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin + 500 µl / ml G418
A20 (murines B-Zell Lymphom)	RPMI +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin + 0,05% (v/v) β-Mercaptoethanol
AD (Prä-B-ALL)	RPMI +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin
Daudi (Burkitt-Lymphom)	RPMI +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin
Jurkat (T-Zelllinie, akute lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ)	RPMI +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin
HL60 (humane AML)	RPMI +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin
humane ALLs / AMLs (primäre leukämische Blasten)	RPMI +10% (v/v) FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin

Tab. 3.2.2: Verwendete Zelllinien sowie primäre leukämische Blasten und entsprechende Kulturmedien

Abhängig von der Zellproliferation wurden die Zellen durchschnittlich alle 2-3 Tage unter sterilen Bedingungen passagiert. Dabei wurden zwei Methoden angewendet, abhängig davon, ob es sich um adhärent wachsende Zellen oder um Suspensionszellen handelte:

- Passagieren von adhärent wachsenden Zellen

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen 2mal mit PBS gewaschen. Danach wurde, entsprechend der Größe der Zellkulturflasche (Ty 25 = 0,5 ml, Ty 75 = 1 ml und Ty 175 = 2 ml Trypsin) Trypsin auf die Zellen gegeben und diese für 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen zu lösen. Die Zellen wurden in dem entsprechenden Medium resuspendiert und abhängig von der Zelldichte 1:2 – 1:10, bezogen auf die Ausgangsmenge, gesplittet.

- Passagieren von Suspensionszellen

Die Zellen wurden gut resuspendiert und dann abhängig von der Zelldichte 1:2 – 1:10, bezogen auf die Ausgangsmenge, gesplittet.

3.2.2 Transduktion von Zellen

Bemerkung: Für alle Transduktionsversuche wurden nur Zellproben verwendet, in denen sich mindestens 75% lebende Zellen befanden. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen wurde mit Hilfe der FACS - Analyse (s.u.) und einer Propidiumiodid-Färbung (2 µl einer 0,5 µg/ml Propidiumiodid-Lösung) ermittelt.

Die Zellen der entsprechenden Probe wurden gezählt und auf 1×10^5 Zellen pro 500 µl eingestellt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen auf einer 12-Well-Platte ausgesät (500 µl Zellsuspension pro Well). Die für den Versuch festgelegten Mengen an Amplikonvektoren und Kontrollen wurden zu der Zellsuspension pipettiert und die Ansätze bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Innerhalb der ersten zwei Stunden der Inkubationszeit wurden die Ansätze alle 10 min leicht per Hand geschwenkt. Danach wurden die Ansätze weiter bei 37°C und 5% CO₂ entsprechend der festgelegten Inkubationszeit inkubiert.

3.2.3 FACS - Analyse

- FACS-Puffer

500 ml PBS
+ 3% (v/v) FCS

- Fixierungslösung

20 g Paraformaldehyd
0,2 g NaN₃
ad 1 Liter PBS

Da es sich um schlecht lösliche Substanzen handelte, wurden diese im Wasserbad bei 70°C unter Rühren gelöst.

Für die Fixierung von Zellen wurde ein 1:1 Gemisch der oben beschriebenen Lösung und FACS-Puffer verwendet.

▪ Antikörper-Färbung

Die Zellen der zu färbenden Probe wurden in FACS-Röhrchen überführt und nach Zugabe von jeweils 1 ml FACS-Puffer für 5 min bei 1400 rpm (Megafuge 1.OR) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in 100 µl Antikörpermix (Menge Antikörper ad 100 µl FACS-Puffer) resuspendiert. Die Ansätze wurden 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde jeweils 1 ml FACS-Puffer auf jede Probe gegeben und die Ansätze 5 min bei 1400 rpm (Megafuge 1.OR) und Raumtemperatur zentrifugiert, um nicht-gebundene Antikörper heraus zu waschen. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Bei Proben, die vor der FACS-Färbung mit virushaltigen Suspensionen transduziert wurden, mussten die Zellen nach der Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern noch fixiert werden. Es wurde jeweils 1 ml Fixierungslösung (1:1 Gemisch, s. unter „Fixierungslösung“) auf jede Probe gegeben und die Ansätze 30 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden 5 min bei 1400 rpm (Megafuge 1.OR) und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellsediment in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Die Tabelle 3.2.3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Mengen Antikörper pro gefärbten Ansatz.

Antikörper	eingesetzte Menge pro Ansatz
IAD (PE)	0,5 µl
H₂KD (Fitc)	0,5 µl
I_gG 2b rat (PE)	0,5 µl
I_gG 2a (Fitc)	0,5 µl
CD 45 r (Fitc)	0,5 µl
CD 70 (PE)	0,5 µl
CD 80 (PE)	0,5 µl
CD 86 (PE)	0,5 µl
Isotyp (PE/Fitc)	5-10 µl
HLA abc (Fitc)	10 µl
HLA-DR (Fitc)	5 µl
ISO (PerCP)	5 µl
IgG 1 (Fitc)	5 µl
CD 3 (PerCP)	5 µl
CD 19 (PE)	5 µl
CD 19 (Fitc)	5 µl
CD 33 (PE)	5 µl
CD 34 (Fitc)	5 µl
CD 56 (PE)	5 µl
CD 70 human (PE)	5 µl

Tab. 3.2.3: *Verwendete Antikörper und eingesetzte Menge pro Ansatz*

▪ FACS-Messung

Die FACS-Messungen wurden mit dem FACScan Durchflusszytometer durchgeführt. Bei den Proben wurde immer der Seitwärts-Scatter (Side-Scatter = SSC) gegen den Vorwärts-Scatter (Forward-Scatter = FSC) gemessen. Die Auswertungen wurden mit dem Programm Cell Quest Vers. 3.3 gemacht.

3.2.4 Herstellung Helfervirus-abhängiger HSV-1 Amplikonvektoren

▪ HSV-MIDI-Präp

Diese Methode diente zur Herstellung von d120 Helferviren (Ausgangsmenge für HSV-Maxi-Präp). Dazu wurden 7B-Zellen mit d120-Helfervirus mit einer MOI (= *multiplicity of infection*) von 0,05 (entspricht z.B. 2×10^6 Zielzellen (7B) + 1×10^5 Viren (d120)) infiziert. Es wurden 7B-Zellen einer frühen Passage ($P < 20$) verwendet.

Die Zellen wurden trypsinisiert (s. 3.1 „Passagieren von adhären wachsenden Zellen“), auf die gewünschte Zellzahl (2×10^6 Zellen / 500 μ l Medium) eingestellt und unter sterilen Bedingungen in ein 15 ml Falcon Tube überführt. d120 Helferviren wurden mit einer MOI von 0,05 ($1 \times 10^5 / 50 \mu$ l) hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und alle 10 min per Hand leicht geschwenkt. Nach einer Stunde wurden die infizierten Zellen unter sterilen Bedingungen in 9,5 ml Medium aufgenommen und in eine Ty75 überführt. Die Zellen wurden 48-72 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, bis im Mikroskop ein deutlicher zytopathischer Effekt (ZPE) in Form von Riesenzellen erkennbar war. Die Helferviren befinden sich zu diesem Zeitpunkt in den Zellen bzw. bei Zelllyse im Medium.

Das Medium wurde steril mit einer Pipette abgenommen und in ein 15 ml Falcon Tube überführt. 1 ml frisches Medium wurde auf die Zellen gegeben und diese mit einem *Cell-Scraper* vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Suspension wurde in ein neues 15 ml Falcon Tube überführt. Die Zellkulturflasche wurde mit etwas Medium ausgespült, das zu der Suspension in das Falcon Tube gegeben wurde (Überstand dieser Suspension wird für „HSV-MAXI-Präp“ benötigt, s.u.). Der Inhalt beider Falcon Tubes wurde 3mal in einem Gemisch aus Trockeneis und Ethanol (80%) eingefroren und in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad aufgetaut. Beide Falcon Tubes wurden für jeweils 5mal für 20 sek. mit Ultraschall behandelt (3°C; CONTROL = 8; DUTY CYCLE = constant). Nach

Zentrifugation für 5 min bei 1100 rpm (Megafuge 1.OR) und Raumtemperatur wurde der Überstand jeweils steril abgenommen und in neue Falcon Tubes überführt. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren, jeweils 1 x 50 μl wurden für einen Plaque-Test aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

▪ HSV-MAXI-Präp

Diese Methode diente zur Herstellung von d120 Helferviren (Ausgangsmenge für die Herstellung von Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren).

Die Infektion der 7B-Zellen erfolgte wie unter 3.2.4 „HSV-MIDI-Präp“ beschrieben, es wurden allerdings andere Mengen an Zellen und Virus eingesetzt. Insgesamt 8×10^7 7B-Zellen / 2ml Medium wurden mit d120 Helfervirus einer MOI von 0,05 (4×10^6 d120) infiziert. Gewonnen wurden diese d120 Helferviren über eine vorher durchgeführte „HSV-MIDI-Präp“ (s.o.). Verwendet wurde der nach Ablösen der Zellen und entsprechender weiterer Behandlung gewonnene d120 Helfervirus-haltige Überstand (s.o.). Die infizierten Zellen wurden auf insgesamt 3 Ty175 verteilt.

Nach 72h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen mit einem *Cell-Scraper* vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Abgelöste Zellen und Medium der drei Flaschen wurden gepoolt und auf zwei 50 ml Falcon-Tubes verteilt. Die Suspension wurde 10 Min bei 1400 rpm (Megafuge 1.OR) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde steril abgenommen, in neue 50 ml Falcon Tubes überführt und 60 Min bei 10.000 rpm (Zentrifuge J2-HS) und 4°C zentrifugiert. Die entstandenen Sedimente wurden steril in jeweils 1 ml Medium (RPMI ohne FCS+10% (v/v) Glycerin) resuspendiert, gepoolt und auf Eis gestellt (diese Suspension wird zur Herstellung Helfervirus-abhängiger HSV-1 Amplikonvektoren benötigt).

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand steril abgenommen, aliquotiert (10 ml / Falcon Tube) und bei -80°C eingefroren. Mit den entstandenen Sedimenten wurde wie mit dem aus der ersten Zentrifugation entstandenen Sediment verfahren. Beide, aus den Sedimenten entstandenen Suspensionen wurden 3mal in einem Gemisch aus Trockeneis und Ethanol (80%) eingefroren und in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad aufgetaut. Danach wurden sie 5mal für jeweils 20 sek. mit Ultraschall behandelt (3°C ; CONTROL = 8; DUTY CYCLE = constant). Beide Suspensionen wurden resuspendiert und jeweils steril aliquotiert (100 μl / Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen wurden bei -80°C eingefroren.

▪ HSV-Plaques-Test

Dieser Test diente zur Titrierung von d120 Helferviren und Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren.

Am Vortag wurden 5×10^5 7B Zellen / Well unter sterilen Bedingungen auf einer 6-Well-Platte ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am Tag des Plaque –Tests sollte die Platte 80% konfluent sein.

Vor der Infektion bzw. Transduktion der Zellen wurde eine Verdünnungsreihe der Virussuspension, wie in Tabelle 3.2.4 dargestellt, steril hergestellt:

Verdünnung	Menge Virus / PBS	Verdünnungsstufe
1	10 µl Virus + 1 ml PBS	1×10^{-2}
2	100 µl Verdünnung 1 + 0,9 ml PBS	1×10^{-3}
3	100 µl Verdünnung 2 + 0,9 ml PBS	1×10^{-4}
4	100 µl Verdünnung 3 + 0,9 ml PBS	1×10^{-5}
5	100 µl Verdünnung 4 + 0,9 ml PBS	1×10^{-6}
6	100 µl Verdünnung 5 + 0,9 ml PBS	1×10^{-7}

Tab. 3.2.4: Verdünnungsreihe zur Titrierung von d20 Helferviren und Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren

In jedem Well wurden 500 µl PBS vorgelegt. Je 100 µl der entsprechenden Virusverdünnung wurden in die jeweiligen Wells pipettiert. Die Ansätze wurden 1 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und alle 10 min leicht per Hand geschwenkt. 10 min vor Ende der Inkubation wurde das Overlay-Medium (s.u.) vorbereitet. Das virushaltige PBS wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Pipette abgenommen und das Overlay-Medium auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde bei Raumtemperatur inkubiert, bis das Overlay-Medium fest war. Die Ansätze wurden 48-72 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Zur Auswertung wurde das Overlay-Medium mit einem Spatel abgezogen und der Zellrasen mit einer Kristallviolett-Lösung (1:10 Verdünnung von Kristallviolett mit Aqua dest.) gefärbt. Die Anzahl der Plaques, die Ausdruck der lytischen Proliferation auf den Verpackungszellen sind, wurde ausgezählt.

Auswertungsbeispiel: 10 Plaques entsprechen bei einer Verdünnung von 1×10^5 einem Titer von 1×10^7 pfu (= *plaque forming unit*) / ml (Rechnung: $10 \times (1 \times 10^5) \times 10 = 1 \times 10^7$).

Overlay-Medium

Das Overlay-Medium bestand aus einem 1:1 Gemisch aus *Low-Melting-Point* Agarose (2 %) und 2 x MEM Medium.

Zur Herstellung der 2 %-igen *Low-Melting-Point* Agarose wurden 2 g *Low-Melting-Point* Agarose in 100 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Die *Low-Melting-Point* Agarose wurde zur Herstellung des Overlay-Mediums aufgekocht und vor Zugabe des MEM Mediums (s.u.) auf 42°C abgekühlt.

Das 2 x MEM Medium wurde wie folgt hergestellt:

12 ml 10 x MEM
+ 3,2 ml 7,5% NaHCO₃
+ 100 ml 1 x MEM
+ 1,2 ml Pen/Strep (100x)
+ 1,2 ml L-Glutamin
+ 6 ml FCS

Wenn das Overlay-Medium soweit abgekühlt war, dass es nur noch handwarm war, konnte es auf die Zellen gegeben werden.

▪ Herstellung von Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren

Am Tag vor der Transfektion wurden 1×10^6 RR1 Zellen / 60 mm² Zellkulturplatte / 3 ml Medium (ohne G418 s. Tab 3.2) unter sterilen Bedingungen ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die Transfektion wurde mittels Lipofectamin nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (15 µl Lipofectamin / Ansatz; OptiMEM I). Pro Zellkulturplatte wurden 5 µl Plasmid (pHSV.CD70; pHSV.IL-2 oder pHSVPrPUC) eingesetzt. Vor der Transfektion wurden die Zellen 2mal mit DMEM ohne FCS gewaschen. Die Ansätze wurden 5 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die DNA / Lipofectamin-Suspension wurde abgenommen und die Zellen 1mal mit PBS gewaschen. Pro Zellkulturplatte wurden 3 ml Medium (ohne G418 s. Tab 3.2.2) auf die Zellen gegeben und die Ansätze weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 24 h Inkubation wurden die RR1 Zellen mit d120 Helferviren (MOI = 0,2) infiziert. Dazu wurde eine Virussuspension hergestellt (d120 mit einer MOI von 0,2 / 500 µl PBS / Ansatz). Das Medium wurde abgenommen, 500 µl Virussuspension auf jede Zellkulturplatte gegeben und die Ansätze 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle 10 min wurden die Platten per Hand leicht geschwenkt. Am Ende der Inkubationszeit wurden pro Zellkulturplatte noch 2,5 ml Medium (ohne G418 s. Tab 3.2.2) hinzugegeben. Die Zellkulturplatten wurden 48 h bei 34°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach 48h war ein deutlicher ZPE unter dem Mikroskop zu erkennen. Die Zellen wurden mit einem *Cell-Scraper* vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und die Suspension steril in

Falcon-Tubes überführt. Zwischen der Durchführung der im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden die Proben immer auf Eis gekühlt. Die Suspension wurde 3mal in einem Gemisch aus Trockeneis und Ethanol (80%) eingefroren und in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Suspension 5mal für jeweils 20 sek. mit Ultraschall behandelt (3°C; CONTROL = 8; CYCLE DUTY = constant). Die Zellreste wurden durch Zentrifugation von 5 Min bei 1500 rpm (Megafuge 1.OR) und 4°C entfernt. Der amplikonhaltige Überstand wurde steril abgenommen, in ein Falcon-Tube überführt und bei -80°C eingefroren.

Zur Vermehrung der Amplikonvektoren wurde der gewonnene Überstand erneut auf RR1 Zellen gegeben. Am Tag vor der Infektion wurden $4,5 \times 10^6$ Zellen pro 60 mm² Zellkulturplatte ausplattiert und bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert. Der Zellrasen war vor der Infektion 80-100% konfluent. Der Überstand wurde im 37°C vorgewärmten Wasserbad aufgetaut. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen von den Zellen abgenommen und durch 2,5 ml Überstand pro Zellkulturflasche ersetzt. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und alle 10 min per Hand leicht geschwenkt. Anschließend wurde noch 1 ml Medium (ohne G418 s. Tab 3.2) pro Zellkulturplatte zugegeben und die Platten für 48 h bei 34°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach 48h war unter dem Mikroskop ein deutlicher ZPE erkennbar. Die Amplikongewinnung erfolgte wie oben beschrieben.

Zur Amplikonanreicherung und -aufreinigung wurde der Überstand auf ein Sucrosekissen gegeben und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dazu wurden in die Zentrifugenröhrchen 2 ml einer Succroslösung (25 %) gegeben, 6 ml des Überstands vorsichtig, auf die Succrose geschichtet und das Zentrifugenröhrchen mit Medium (DMEM ohne Zusätze) aufgefüllt. Der Überstand wurde 2 h in der Ultrazentrifuge bei 4°C und 24.000 rpm (Ultrazentrifuge L8-70M, Rotor SW.41) zentrifugiert. Die Amplikonpartikel waren nach der Zentrifugation am Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment in 200 µl PBS (+Ca²⁺+Mg²⁺) resuspendiert und die Suspension aliquotiert (100 µl / Kryoröhrchen). Zur Langzeitaufbewahrung wurden die HSV-Amplikonvektoren bei -80°C gelagert.

3.2.5 Herstellung Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren

- Plasmidpräparation von f-HSV Δ pac Δ 27 Δ KN (BAC)

Zunächst wurde eine Vorkultur in *E.coli* angesetzt. Dazu wurden 3 ml LB-Medium mit einem Chloramphenicolgehalt von 15 μ g/ml mit einer Pipettenspitze der BAC-Glycerinkultur in einem 15 ml Falcon Tube über Nacht bei 37°C und 150 rpm im Bakterieneschüttler inkubiert. Aufgrund des sauerstoffabhängigen Wachstums der Bakterien wurde der Deckel des Falcon Tubes nicht vollständig verschlossen, sondern mittels eines Klebestreifens nur locker darauf gesetzt.

Außerdem wurden vier 2 l Glaskolben mit jeweils 10 g LB-Medium und 500ml Aqua dest. Gefüllt und autoklaviert.

Zur Herstellung der BAC-Kultur wurden Chloramphenicol (15 μ g/ml) und 500 μ l der Vorkultur in jeweils 500 ml LB-Medium gegeben und über Nacht im Bakterieneschüttler bei 37°C und 150 rpm inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde in Zentrifugenbecher (500 ml Zentrifugenbecher von Beckman für Rotor JA –10) überführt und 5 min bei 4°C und 5000 rpm (Zentrifuge J2-21) zentrifugiert. Die Sedimente wurden in jeweils 10 ml P1 (*Resuspension Buffer*) resuspendiert. Dann wurden die Suspensionen von jeweils zwei Sedimenten gepoolt und die Zentrifugenbecher mit jeweils 10 ml P1 gespült (= 40ml Suspension pro Becher). Zur Lyse wurden jeweils 40 ml P2 (*Lysis Buffer*) in jeden Becher gegeben, mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert und die Ansätze 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden zur Neutralisation jeweils 40 ml eiskaltes P3 (*Neutralization Buffer*) hinzugegeben, wieder vorsichtig resuspendiert und die Proben 30 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden 30 min bei 4°C und 10.000 rpm (Zentrifuge J2-21) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Über Faltenfilter wurde der Überstand in neue Zentrifugenbecher filtriert und zur Fällung der DNA mit der 0,7-fachen Menge an Isopropanol versetzt. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Suspension bei 4°C gelagert.

Im nächsten Schritt wurde die Suspension bei 4°C und 10.000 rpm (Zentrifuge J2-HS) für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet. Die Sedimente wurden in jeweils 2 ml TE-Puffer (pH 7,4) resuspendiert, gepoolt (Gesamtvolumen = 8 ml) und in 22 ml QBT-Puffer (*Equilibration Buffer*) aufgenommen. Die Suspension wurde auf eine equilibrierte QIAGEN 500 Säule gegeben und die Säule anschließend 2mal mit jeweils 30 ml QC-Puffer (*Wash Buffer*) gewaschen. Dann wurde die DNA mit 15 ml QF-Puffer (*Elution Buffer*; auf 65°C vorgewärmt) eluiert, das Eluat mit 0,7 Vol (10,5 ml) Isopropanol gemischt und 30 min bei 4°C und 10.000 rpm (Zentrifuge J2-HS) zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde

mit 70%igem Ethanol gewaschen, in 3 ml TE-Puffer (auf 65°C vorgewärmt) resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Über einen CsCl-Gradienten wurde im Anschluss die *super-coiled* DNA von der *relaxed-circle* DNA getrennt. Es wurden 3,8 ml TE/DNA-Suspension, 3,8 g CsCl und 330 µl EtBr (10mg/ml) in ein Zentrifugenröhrchen (*Quick Seal Centrifuge Tubes* (13x51mm), Beckman) pipettiert und 16 h bei 20°C und 60.000 rpm in der Ultrazentrifuge (Ultrazentrifuge L8-70M) zentrifugiert. Unter UV-Licht in der Dunkelkammer war es möglich nach Zentrifugation in dem Röhrchen zwei Banden zu unterscheiden. Die obere Bande stellte die *relaxed-circle* DNA, die untere die *super-coiled* DNA dar. Das Zentrifugenröhrchen wurde oben, knapp unterhalb des Halses mittels einer Kanüle (0,8 mm) entlüftet und die untere Bande wurde unter UV-Licht in der Dunkelkammer mit einer Kanüle (0,8 mm) und einer 5 ml Spritze abgezogen. Das EtBr wurde mit H₂O-gesättigtem Butanol ausgewaschen. Dann wurde die DNA in einen Dialyse-Schlauch überführt und zum Entsalzen über 24h oder alternativ mehrere Tage bei 4°C in 1,6 – 3 l 1xTE-Puffer dialysiert. Die Dialyseflüssigkeit wurde am 1. Tag 3mal täglich, dann 1mal täglich gewechselt. Nach der Dialyse wurde die DNA in ein 50 ml Falcon Tube überführt und durch Zugabe von 0,1 Vol 4M LiCl und 2,5 Vol Ethanol gefällt und die Ansätze anschließend für 3 h bei –20°C inkubiert. Die Suspension wurde 30 min bei 4°C und 8000 rpm (Zentrifuge J2-HS) zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde zum Waschen in 5 ml 80%igem Ethanol aufgenommen und bei 4°C und 8000 rpm (Zentrifuge J2-HS) für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment nach dem Trocknen in 300 µl 1 x TE-Puffer gelöst und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das gelöste Plasmid wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und zur Langzeitaufbewahrung bei 4°C gelagert.

Die DNA-Menge wurde über eine photometrische Messung bestimmt (Formel zur Berechnung der DNA-Menge: $(OD_{260} \times Vf \times 50) : 1000 = x \mu\text{g} / \mu\text{l}$; Vf = Verdünnung).

▪ Herstellung von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^6 2-2 Zellen / 60 mm² Zellkulturplatte / 3 ml Medium (ohne G418 s. Tab 3.2.2) unter sterilen Bedingungen ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die Transfektion wurde mittels Lipofectamin nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (12 µl Lipofectamin/Ansatz; OptiMEM I). Pro Zellkulturplatte wurden 6 µl f-HSVΔpacΔ27ΔKN, 1 µl pEBH ICP27 und das jeweilige Transgen (2 µl pHSV.CD70 (Mix 2); 4 µl pHSV.IL-2 oder 2 µl pHSVΔ eingesetzt. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und die DNA / Lipofectamin-Suspension auf die Zellen gegeben. Die Ansätze wurden 5,5 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurde die DNA / Lipofectamin-Suspension steril abgenommen und die Zellen 3mal mit 2 ml PBS gewaschen.

Pro Zellkulturplatte wurden 3,5 ml Medium (DMEM+6%FCS+1%Pen/Strep+1%L-Glutamin) auf die Zellen gegeben und die Ansätze für 48 h bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach 48h wurden die Zellen mit einem *Cell-Scraper* vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und die Suspension steril in Falcon-Tubes überführt. Zwischen der Durchführung der im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden die Falcon-Tubes immer auf Eis gestellt. Die Suspension wurde 3mal in einem Gemisch aus Trockeneis und Ethanol (80%) eingefroren und in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Suspension 3mal für jeweils 20 sek. Mit Ultraschall behandelt (3°C; CONTROL = 8; CYCLE DUTY = constant). Die Zellreste wurden durch Zentrifugation von 10 Min bei 1400 rpm (Megafuge 1.OR) und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in Zentrifugenröhrchen überführt und 2h bei 13.000 rpm (Zentrifuge J2-HS, Rotor JA-20) und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die amplikonhaltigen Sedimente in 400 µl PBS (+Mg²⁺+Ca²⁺) resuspendiert, die Suspension in Falcon Tubes überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei – 80°C eingefroren.

Für die Amplikonaufreinigung und Lagerung wurde wie unter Kapitel 3.2.4, Unterpunkt „Herstellung von Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren“ verfahren.

3.2.6 IL-2 ELISA (IL-2 Eli-pair)

Zur Erhebung der ELISA-Daten wurde das ELISA-Kit “IL-2 Eli-pair“ der Firma DIACLONE Research verwendet.

Am Tag vor der Messung wurde eine 96-Well ELISA Platte mit *Capture*-Antikörper (AK) (= anti-IL-2 AK) beladen. Es wurden 100 µl *Capture*-AK in 10 ml *Coating*-Puffer (= Carbonat-Bicarbonat-Puffer: 1 Carbonat-Bicarbonat-Puffer-Kapsel + 100 ml Aqua dest.) gelöst und auf die Platte pipettiert (100 µl/Well). Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Außerdem wurde eine 3%-ige BSA-Lösung (0,9 g BSA + 30 ml PBS) und eine 0,1%-ige Tween-Lösung (0,5 ml Tween 20 + 500 ml PBS) angesetzt.

Am nächsten Tag wurde die Platte zuerst 4mal mit jeweils 200 µl / Well 0,1%-iger Tween-Lösung (Waschlösung) gewaschen. Dann wurden zum Blocken in jedes Well 200 µl 3%-ige BSA-Lösung pipettiert und die ELISA Platte 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 2mal mit je 200 µl Waschlösung / Well gewaschen. Aus den restlichen 10 ml der 3%-igen BSA-Lösung wurde durch Zugabe von 20 ml 0,1%-iger Tween-Lösung die Gebrauchslösung (GL) für die AK-Verdünnungen hergestellt. Die IL-2 Standards (Standartreihe laut Angaben des Herstellers mit Konzentrationen von 1000pg/ml bis 31,25pg/ml), die Proben sowie die Negativkontrollen wurden jeweils in einem Volumen von

100 µl / Well auf die Platte pipettiert und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde 4mal gewaschen und der *Detection-AK* (AK-Lösung = 100 µl AK + 10 ml GL) auf die Platte pipettiert (100 µl / Well). Nach Inkubation von 1 h bei 37°C wurde die Platte erneut 4mal gewaschen, Streptavidin-HRP laut Angaben des Herstellers auf die Platte pipettiert und diese 20 min bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde 6mal gewaschen und 100 µl der TMB-Lösung in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde abgedunkelt und die Reaktion nach dem Farbumschlag mit H₂SO₄(1M) gestoppt. Es folgte die Messung und Auswertung der Proben. Die photometrische Messung und Auswertung erfolgte mit dem ELISA Messgerät sunrise der Firma Tecan und dem Programm Magellan Vers. 2.5. Es wurde eine Wellenlänge von 450 nm verwendet und vor Beginn der Messung 10 sek. geschüttelt.

3.2.7 Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Diese Methode diente zum Nachweis von herpesviralen Entry-Rezeptoren (Hve = *herpes virus entry mediator*) auf verschiedenen humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und in primären leukämischen Blasten.

Die RNA wurde aus 0,5x10⁶ bis 1x10⁶ Zellen mit Hilfe des RNeasy Mini Protokoll laut Angaben des Herstellers isoliert. Zur Präparation der cDNA wurde das Standardprotokoll des First-strand cDNA Synthesis Kit verwendet (es wurde nur der poly-*T* bifunctional Primer eingesetzt). Für die anschließende PCR wurden folgende Reagenzien / Mengen pro Ansatz eingesetzt (Sequenzen der Primer sind in Tabelle 3.2.5 aufgeführt):

- 4µl cDNA
- 1 µl spezifische Primer (0,5 µl sense + 0,5 µl *antisense* Primer, Konz. 100 pmol / µl)
- 0,1 µl β-Actin 5' (Konz. 100 pmol / µl)
- 0,1 µl β-Actin 3' (Konz. 100 pmol / µl)
- 2,5 µl 10 x Puffer
- 16,9 µl H₂O
- 0,2 µl Taq-Polymerase
- 0,25 µl dNTP (10 mM)

Die PCR-Reaktion wurde in einem Trio Thermblock™ durchgeführt (Programm: 94°C 10 min; (94°C 1 min; 60°C 1 min; 72°C 1 min) x 35; 72°C 10 min; 4°C bis zur Weiterverarbeitung).

Die Proben wurden mit *Loading-Buffer* (6 x Puffer) auf ein 2,5%-iges Agarosegel + 5 µg/ml EtBr aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 80 mA und einer

Laufzeit von 50 min durchgeführt. Zur Auswertung wurde der Fluor-S Multimager und die Multianalyst Software verwendet. Die semi-quantitative Bestimmung der Stärke der spezifischen Banden nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde mit Hilfe photometrischer Messung durchgeführt. Die spezifischen Hve-Bandenstärken wurden in Beziehung zu den gleichzeitig erhobenen Bandenstärken des β -Actins gesetzt und als Verhältnis der Hve-spezifischen Bandenstärken relativ zur β -Actin-Kontrolle dargestellt.

Primer	sense	antisense
HveA	5'-GCATGGAGCCTCCTGGAGAC-3'	5'-CTCCTTGCAGGACGGCAGAG-3'
HveB	5'- ATGGAACCAGATGGCAAGGATGAG- 3'	5'-ACTGCCCGCCGTGAGATGAG-3'
HveC	5'-CGGCCCTACTTCACCGTGGA-3'	5'- CTTGAAATGAAAGACCCGTCGTTC- 3'

Tab. 3.2.5: Sequenzen der spezifischen Primer für die Herpes Virus Entry Mediatoren (=Hve) A, B und C

3.2.8 Anwendung Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren zur ex vivo Generierung einer Leukämievakzine und Überprüfung der Wirksamkeit der Vakzine im A20-Mausmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde eine auf leukämischen Blasten basierende Leukämievakzine entwickelt. Dazu wurden durch genetische Modifikation mittels Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren Vakzinezellen generiert, deren antigenpräsentierende sowie immunstimulatorische Kapazität über die transgene Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 und des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 verbessert werden sollte. Die Wirksamkeit der hergestellten Vakzine wurde im A20-Mausmodell überprüft. Dabei handelt es sich um ein Behandlungsmodell, bei dem 9-14 Wochen alte BALB/cBYJ Mäuse zu Versuchsbeginn eine „Tumorgabe“ (*Challenge*) mit 1×10^5 unbestrahlten und genetisch unveränderten A20 Zellen (murine Prä-B-Leukämie) erhielten. Vor der geplanten Vakzinegabe lag also bereits eine leukämische Erkrankung vor, was die Situation der Patienten in Hinblick auf eine klinischen Anwendung darstellen sollte. An Tag 4 und 14 erfolgte dann die jeweilige Vakzineinjektion mit CD70 exprimierenden und IL-2

sezernierenden A20-Vakzinezellen. Die Überlebensrate der Tiere wurde bis Tag 100 nach Gabe der Leukämiezellen betrachtet.

▪ Tiere und Tierhaltung

Die BALB/cBYJ Mäuse stammten aus der Tierzucht der Tierversuchsanlage (TVA) der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Es handelte sich um weibliche Tiere, die zu Versuchsbeginn ein Alter von 9-14 Wochen hatten. Die Aufzucht und die Haltung der Tiere wurden entsprechend der Standards der TVA der Universität Düsseldorf durchgeführt.

▪ Gabe der Leukämiezellen (*Challenge*) und Vakzine

Für die Leukämie-Challenge wurden A20 Zellen 7 Tage vor Versuchsbeginn aufgetaut und unter Standardbedingungen kultiviert. Am Tag der „Tumorgabe“ wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und auf eine Zellzahl von 5×10^5 /ml (Trypan-Blau-negative Zellen) eingestellt. Jeweils 0,2 ml (1×10^5 Zellen) dieser Suspension wurden mit einer 1ml Spritze (0,5x25G Kanülen) steril aufgezogen und die Spritzen auf Eis gelagert. Die Zellen wurden subkutan (s.c.) in die Flanke der Mäuse injiziert. Die Gabe der Leukämiezellen führte zur Entstehung einer soliden lymphoblastischen Tumormasse.

Am Tag 4 und Tag 14 nach der Challenge erfolgte die subkutane Injektion der A20-Vakzinezellen. Am Abend vor der Vakzine wurden die A20 Zellen mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren transduziert (getrennte Ansätze für die unterschiedlichen Transgene CD70 und Il-2). Die eingesetzte Menge an Amplikonvektoren entsprach der in vorangegangenen Versuchen ermittelten Menge, durch die eine Transduktionseffizienz von > 80% CD70 positiven Zellen bzw. eine IL-2 Sekretion von 10-14 ng IL-2/ml/ 10^6 24 h p.t. erreicht werden konnte. Für die Vektorkontrolle wurde eine identische Menge eingesetzt. 13 h p.t. wurden die transduzierten A20 Zellen 2mal mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert, auf eine Zellzahl von 1×10^6 /ml eingestellt und die mit BAC.CD70 bzw. BAC.II-2 transduzierten Ansätze vereinigt. Der IL-2-haltige Mediumüberstand wurde für eine spätere ELISA Messung bei -80°C eingefroren. Die Vakzinezellen wurden anschließend mit 10 Gy bestrahlt, um eine weitere Vermehrung der Zellen im Organismus zu verhindern und jeweils 0,2 ml der Zellsuspension steril in 1 ml Spritzen (0,5x25G Kanülen) aufgezogen. Die Vakzinezellen (2×10^5 Zellen/Ansatz/Tier) wurden den Mäusen subkutan in die Flanke injiziert. Als Kontrolle wurden einer Gruppe bestrahlte aber genetisch nicht veränderte A20 Zellen injiziert.

Um die Beteiligung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen an einer induzierten antileukämischen Immunantwort nachzuweisen, wurden außerdem zwei sogenannte „Depletionsgruppen“ eingesetzt. Die Tiere dieser Gruppen erhielten vor Gabe der Leukämiezellen und dann 1mal wöchentlich zusätzlich zu den Vakzinezellen monoklonale Antikörper, durch die die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen *in vivo* depletiert wurden. Dabei handelte es sich in der einen Gruppe um CD4.1 (anti CD4) und in der anderen Gruppe um CD8.2 (anti CD8). Jeweils 100 µg des entsprechenden Antikörpers wurde mit 200 µl PBS in einer 1 ml Spritze steril aufgezogen und den Mäusen intraperitoneal injiziert.

Die Charakterisierung der Vakzine- und A20 Zellen erfolgte über durchflußzytometrische Untersuchungen und ELISA Messungen. Der Nachweis der Depletion der entsprechenden Tiere wurde durch Blutentnahme mittels Kappen der Schwanzvene und Bestimmung der Antikörper in einer durchflußzytometrischen Untersuchung kontrolliert.

▪ Überwachung und Untersuchung der Tiere während des Versuches

Die Tiere wurden täglich hinsichtlich ihrer Anzahl und ihres Allgemeinzustands kontrolliert. Zweimal wöchentlich wurden alle Tiere gewogen und die aktuelle Größe des subkutanen lymphoblastischen Tumors mit Hilfe einer Schieblehre und anschließender Volumenberechnung bestimmt, indem der größte senkrechte Durchmesser des Tumors vermessen wurde, die Tumorgöße wurde im mm³ angegeben. Den Tieren aus den Depletionsgruppen wurden außerdem die jeweiligen Antikörper einmal wöchentlich intraperitoneal injiziert.

Endpunkt des Versuchs war entweder ein Überleben der Tiere von länger als 100 Tagen nach Gabe der Leukämie-Challenge, eine Tumorgöße von mehr als 450 mm³, ein Übersteigen des Körpergewichts um mehr als 30%, Ulzerationen des Tumors nach außen oder physischer Stress der Tiere. In diesen Fällen wurden die Tiere mittels Tod durch Genickbruch getötet.

Zur Beurteilung der Organe hinsichtlich einer eventuellen Metastasierung wurde anschließend eine Sektion der Tiere durchgeführt.

3.2.9 Statistische Auswertung

Statistische Analysen zum Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen der *in vivo* Experimente wurden mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Für alle weiteren Ergebnisse wurde der Mann-Whitney-U Test bzw. der 2-seitige t-Test für kontinuierliche Variablen angewendet. Ein Wert von P<0,05 wurde als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Auf Herpes simplex Virus basierende Vektoren als Gentransfersystem

Auf Herpes simplex Virus Typ-1 (HSV-1) basierende Vektoren haben sich im Hinblick auf die Entwicklung einer Leukämievakzine in den letzten Jahren als ein vielversprechendes Gentransfersystem erwiesen.

Neben den bereits länger bekannten Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren ist es mittlerweile möglich, auch Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren herzustellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese neue Generation der HSV-1 Amplikonvektoren zunächst hinsichtlich der Transgenexpression und der Zielzelltoxizität untersucht, um die Vektoren in einem zweitem Schritt zur Herstellung einer Leukämievakzine einzusetzen.

Die Abbildungen 4.1 a und 4.1 b zeigen eine exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Untersuchung nach Transduktion einer murinen lymphoblastischen Leukämiezelllinie (A20 Zellen) mit Helfervirus-abhängigen (HSV.CD70) und Helfervirus-freien (BAC.CD70) HSV-1 Amplikonvektoren. Gezeigt ist zum einen die Zytotoxizität und zum anderen die transgene Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70.

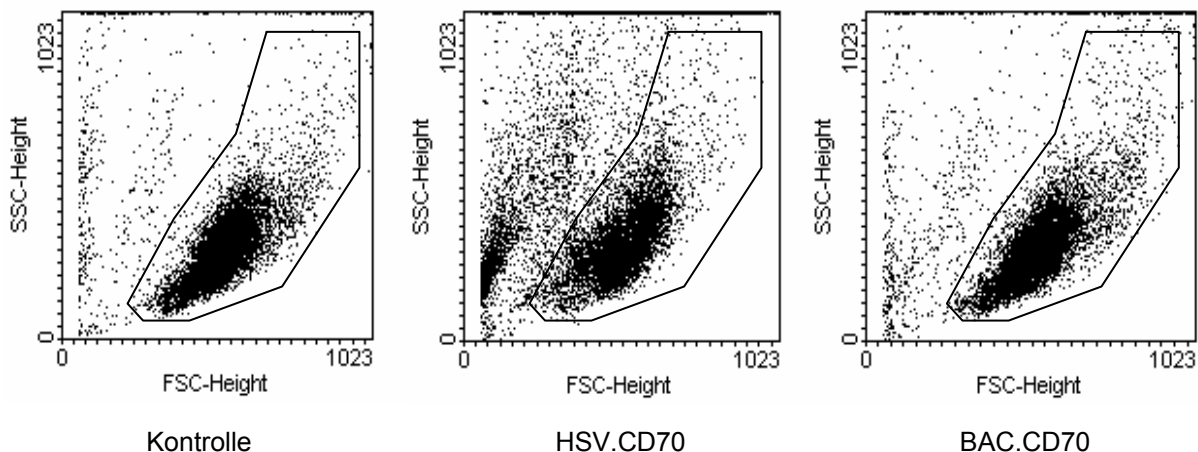


Abb. 4.1a: Durchflusszytometrische Darstellung der Zytotoxizität nach Transduktion von A20 Zellen mit Helfervirus-abhängigen und -freien HSV-1 Amplikonvektoren

Die Abbildungsreihe zeigt die Vorwärts- gegen die Seitwärts „Scatter“ der Dot-Plot Darstellung nach Transduktion von A20 Zellen mit Helfervirus-abhängigen (HSV.CD70) und Helfervirus-freien (BAC.CD70) HSV-1 Amplikonvektoren. Das gesetzte Gate markiert die lebende Zellen 24 h post transductionem (p.t.). Als Kontrolle wurden nicht transduzierte A20 Zellen eingesetzt.

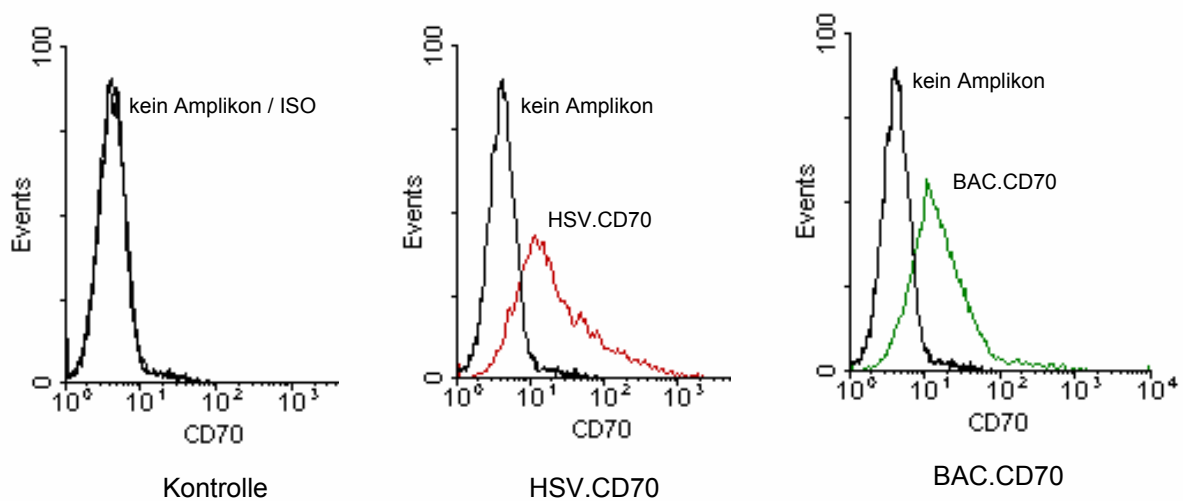


Abb. 4.1b: Durchflusszytometrische Darstellung der transgenen CD70 Expression nach Transduktion von A20 Zellen mit Helfervirus-abhängigen und -freien HSV-1 Amplikonvektoren

Die Abbildungsreihe zeigt eine Histogramm-Darstellung der CD70-Expression 24 h p.t.. Zur Transduktion wurden äquivalente Mengen der Helfervirus-abhängigen (HSV.CD70, rot) und der Helfervirus-freien (BAC.CD70, grün) HSV-1 Amplikonvektoren verwendet. Als Kontrolle dienten jeweils nicht transduzierte A20 Zellen, sowie die entsprechende Isotypkontrolle als allgemeiner Kontrollansatz (linkes Diagramm).

Zu bemerken ist, dass das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD70 einerseits ein geeignetes Markermolekül zur Optimierung der Transduktionsbedingungen ist und andererseits als kostimulatorisches Signal im Rahmen der Leukämievakzine dient. Dabei wird das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte murine CD70 natürlicherweise nicht auf humanen Zellen exprimiert.

4.2 Titrierung Helfervirus-abhängiger und Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren zur Festlegung äquivalenter transducing units (TU)

Für Helfervirus-abhängige HSV-1 Amplikonvektoren können über einen standardisierten HSV-Plaques-Test (s. Material und Methoden) Titer errechnet werden, die zum Zweck der Transduktion dann auf das Verhältnis von Vektorpartikeln zu Zielzellen in MOI (*multiplicity of infection*) umgerechnet werden können. Über die MOI wird gewährleistet, dass zur besseren Vergleichbarkeit unterschiedlicher Amplikonstocks, vergleichbare Mengen an Amplikonvektoren, bezogen auf die jeweilige Zielzellzahl, zur Transduktion eingesetzt werden.

Da Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren auch auf komplettierenden Zelllinien ohne zusätzliches Helfervirus nicht zur Replikation fähig sind und die „Plaques“ Ausdruck der lytischen Proliferation auf den Verpackungszellen sind, können keine Titer über einen Plaque-Test erhoben werden. Stattdessen wurde die Menge an transduzierenden Partikeln über die Transgenexpression 24 h nach Transduktion von 1×10^5 A20 Zellen mit verschiedenen Mengen an Helfervirus-freien und Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren bestimmt. Die Mengen an Helfervirus-abhängigen und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren, die gleich hohe Expressionsraten auf A20 Zellen erzielen, enthalten dabei identisch viele *transducing units* (TU).

Zum Vergleich der Amplikonvektoren wurde zunächst die Transgenexpression 24 h nach Transduktion mit steigenden MOI Helfervirus-abhängiger HSV-1 Amplikonvektorpräparationen ermittelt. Abbildung 4.2 stellt die CD70 Expression nach Transduktion mit drei verschiedenen Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektorpräparationen (HSV.CD70) in Abhängigkeit von der MOI dar (n = 2-5). Die Transgenexpression steigt mit steigender MOI an und erreicht dann ein Plateau.

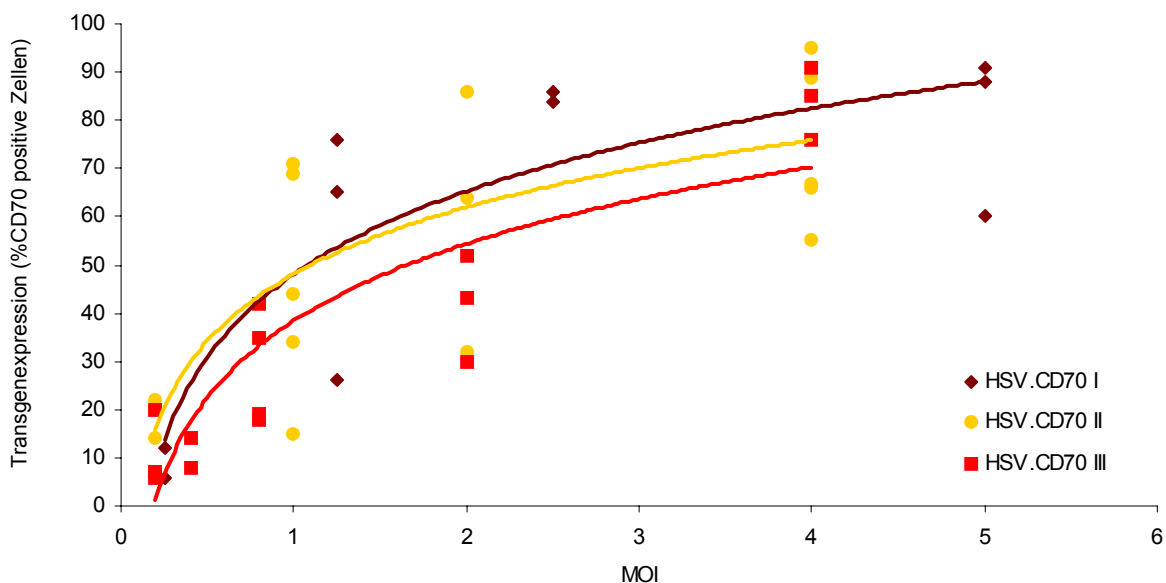


Abb. 4.2: Die CD70 Expression nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren in Abhängigkeit von der MOI

1×10^5 A20 Zellen wurden mit drei verschiedenen Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektorpräparationen (HSV.CD70) unterschiedlicher MOIs transduziert und die Genexpression 24h p.t. im Durchflusszytometer bestimmt. In der Abbildung ist die CD70 Expression in Prozent angegeben. Die dargestellten Kurven zeigen die logarithmischen Trendlinien.

In der Abbildung 4.3 ist entsprechend die CD70 Expression in Prozent 24 h nach Transduktion mit drei verschiedenen Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektorpräparationen (BAC.CD70) dargestellt (n = 2-3). Die Transgenexpression steigt mit steigender μl -Zahl und erreicht dann ebenfalls ein Plateau.

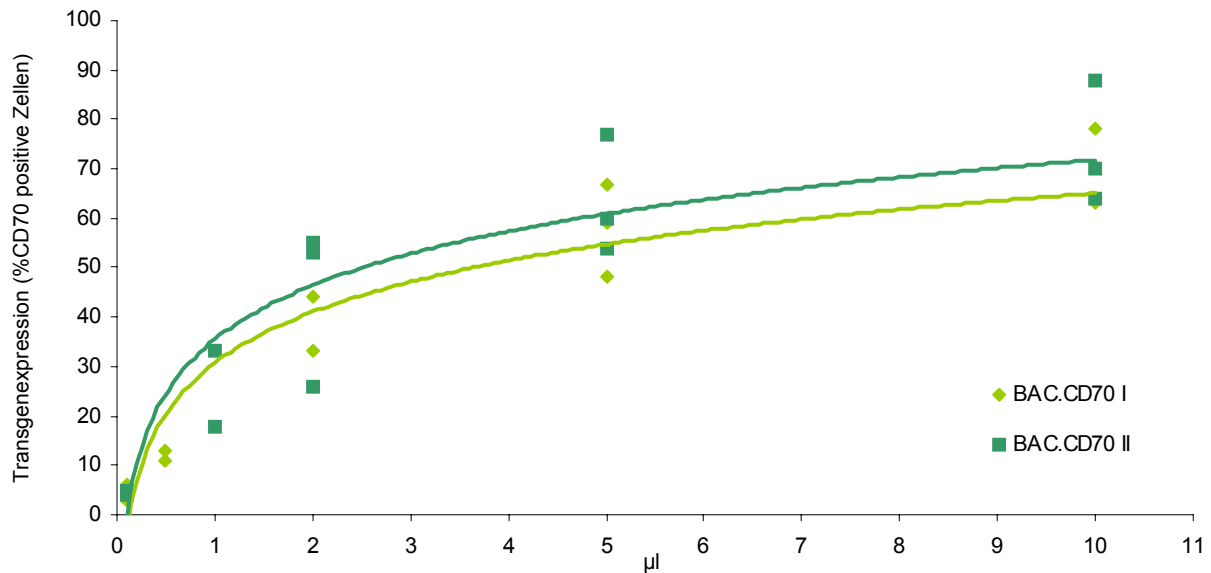


Abb. 4.3: Die CD70 Expression nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren in Abhängigkeit von der Amplikonmenge

1×10^5 A20 Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen zwei verschiedener Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektorpräparationen (BAC.CD70) transduziert und die Genexpression 24h p.t. im Durchflusszytometer bestimmt. In der Abbildung ist die CD70 Expression in Prozent angegeben. Die dargestellten Kurven zeigen die logarithmischen Trendlinien.

Zum Vergleich der *transducing units* nach Transduktion mit Helfervirus-freien und Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren werden die jeweiligen Mengen an Vektorpräparation, die zu einer Transgenexpression auf 50% der Zielzellen führen herangezogen. Die Tabelle 4.1 fasst dies zusammen:

Amplikonvektor	Eingesetzte Amplikonmenge zum Erreichen einer Transgenexpression von 50% bei 1×10^5 Zielzellen	TU
HSV.CD70 I	0,43 μ l (= MOI 1,08)	50
HSV.CD70 II	0,55 μ l (= MOI 1,10)	50
HSV.CD70 III	4,12 μ l (= MOI 1,65)	50
BAC.CD70 I	3,64 μ l	50
BAC.CD70 II	2,50 μ l	50

Tab. 4.1: Die TU_{50} für verschiedene Helfervirus-abhängige und Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonpräparationen

In der Tabelle sind die äquivalenten TUs verschiedener Helfervirus-abhängiger und Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren dargestellt, durch die eine Transgenexpression von 50% erreicht wurde bei gleicher Zellzahl von 1×10^5 A20 Zellen.

Die Tabelle stellt die TU aller in den folgenden Experimenten verwendeten Vektorpräparationen dar. Dabei fällt auf, dass die Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren hinsichtlich der TU / Volumeneinheit bis auf eine Vektorpräparation fast 10-fach höher konzentriert sind als die Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass zum Erreichen einer gleichen Transgenexpression teilweise ungefähr die 10-fache Menge an Helfervirus-freien HSV-Amplikonvektoren eingesetzt werden muss. Grund für diese Beobachtung könnte eine herstellungsbedingt weniger effiziente Vektorpräparation im Helfervirus-freien Amplikonsystem sein.

Für die Bestimmung der Vektormenge, die bei Transduktion mit Helfervirus-freien Amplikonvektoren eingesetzt wird, werden im Folgenden μ l angezeigt, die dann über die TU_{50} einer vergleichbaren MOI nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren zugeordnet werden können.

Parallel zur Transgenexpression wurde auch die Zytotoxizität in Abhängigkeit der verschiedenen Mengen eingesetzter transduzierender Partikel bestimmt. Die Abbildung 4.4 zeigt, dass die Toxizität mit steigender Menge an eingesetzten Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren ($n = 2-5$) steigt und sich dann einem Plateauwert nähert.

Nach Transduktion mit Helfervirus-freien Amplikonvektoren ($n = 2-3$) hingegen nimmt die Zytotoxizität auch bei steigender Menge an eingesetzten transduzierenden Partikeln kaum zu und ist insgesamt um ca. ein Drittel niedriger als im Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem.

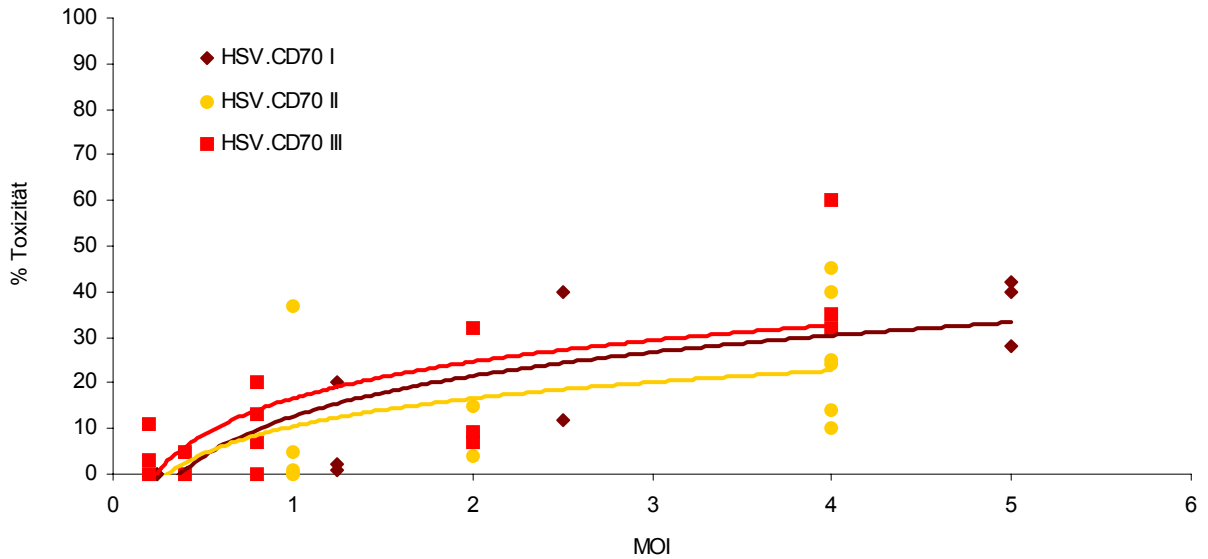


Abb. 4.4: Die Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren in Abhängigkeit von der MOI

1×10^5 A20 Zellen wurden mit drei unterschiedlichen Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektorpräparationen (HSV.CD70) verschiedener MOIs transduziert und die Toxizität 24h p.t. im Durchflusszytometer bestimmt. In der Abbildung ist die Zytotoxizität in Prozent angegeben. Die dargestellten Kurven zeigen die logarithmischen Trendlinien.

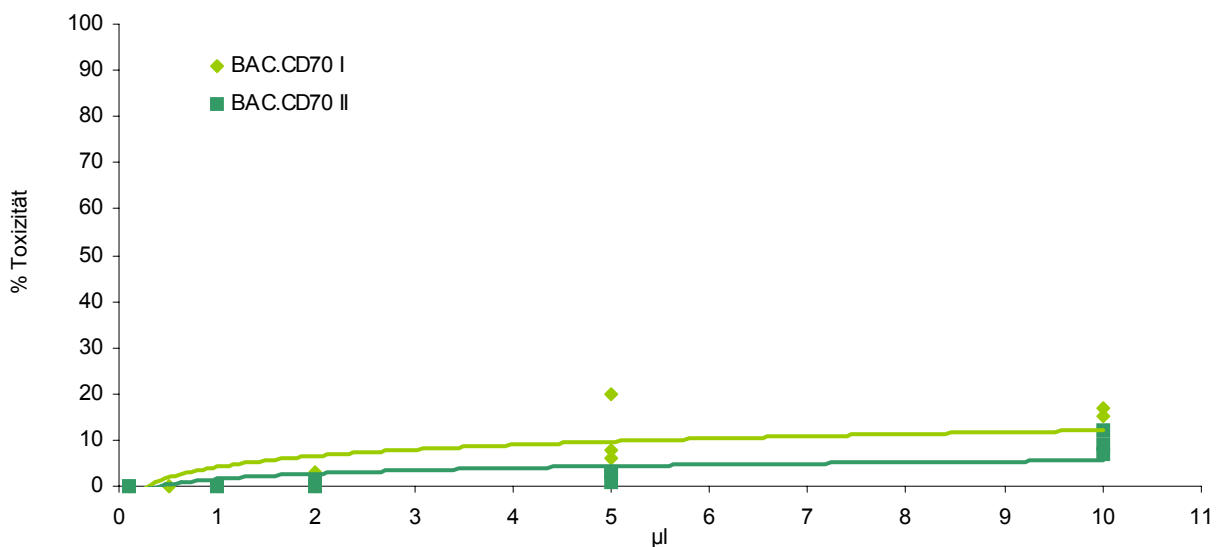


Abb. 4.5: Die Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren in Abhängigkeit von der Amplikonmenge

1×10^5 A20 Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen zwei verschiedener Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektorpräparationen (BAC.CD70) transduziert und die Toxizität 24h p.t. im Durchflusszytometer bestimmt. In der Abbildung ist die Zytotoxizität in Prozent angegeben. Die dargestellten Kurven zeigen die logarithmischen Trendlinien.

Im Hinblick auf die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse scheint das Helfervirus-freie Amplikonsystem zur Herstellung einer Leukämievakzine zunächst geeigneter, da mit steigender Vektormenge eine Steigerung der Transgenexpression ohne gleichzeitige Zunahme der Zytotoxizität, zumindest auf der Modellzelllinie A20, zu erzielen ist.

Die möglichen Ursachen der gesteigerten Zytotoxizität der Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren wurden nachfolgend analysiert.

4.3 Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren

Die Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren führt, wie aus den Kapiteln 4.1 und 4.2 ersichtlich ist zum Tod eines nicht unerheblichen Teils der Zielzellen. Hinsichtlich der Ursache dieser Zytotoxizität werden vor allem zwei Hypothesen diskutiert. Einerseits wurde gezeigt, dass die Zytotoxizität durch herpesvirale Proteine hervorgerufen wird, die von Helferviruspartikeln in der Amplikonsuspension exprimiert werden. Zum anderen ist es möglich, dass die Zytotoxizität durch subzelluläre Zellpartikel, sogenannten „Zellschrott“, verursacht wird. Dieser entsteht bei der Lyse der Verpackungszellen während der Amplikonherstellung und setzt sich beispielsweise aus Zellmembranen bzw. sämtlichen Zytoplasmabestandteilen der Verpackungszellen, wie Enzymen oder Zellorganellen, zusammen. Letztere Hypothese würde auch die zwar deutlich geringere aber dennoch vorhandene Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren erklären (s. Kapitel 4.1 / 4.2). Eine Differenzierung zwischen dem jeweiligen Einfluss der herpesviralen Proteine und der subzellulären Zellpartikel in Bezug auf die Zytotoxizität lässt sich jedoch nur nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren ermitteln, da nur in diesem Amplikonsystem beide Komponenten zum Tragen kommen.

Um die vorgenannten Hypothesen näher zu untersuchen, wurden zunächst Experimente durchgeführt, in denen die HSV-Proteine der Vektorpräparation durch Erhitzen denaturiert wurden. Hierzu wurden die Amplikonvektoren in dem einem Ansatz vor der Transduktion für 30 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Zum Vergleich mit dem Standardvorgehen wurde in einem zweiten Ansatz die Amplikonsuspension nicht erhitzt, sondern bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. 1×10^5 A20 Zellen wurden jeweils mit 20 μ l (= MOI 40) Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren (HSV.CD70) transduziert. Die CD70 Expression und die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, wurden 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n = 3). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.6 dargestellt.

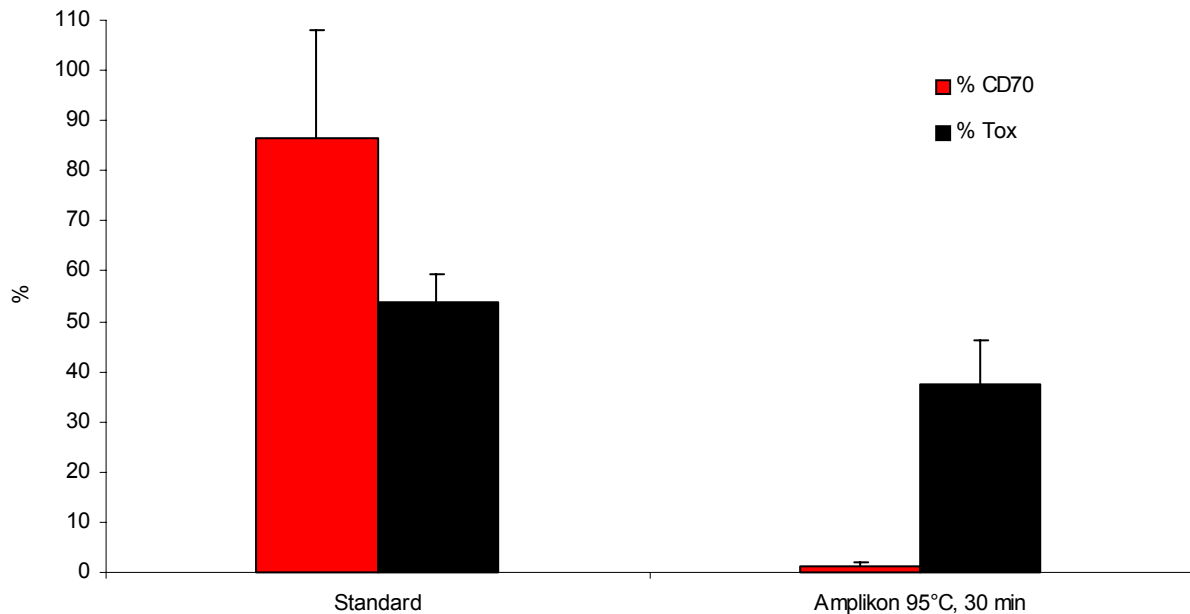


Abb. 4.6: Die Transgenexpression und die Zytotoxizität nach Denaturierung der HSV-Proteine

1x10⁵ A20 Zellen wurden mit HSV.CD70 transduziert. In einem Ansatz wurde die Amplikonsuspension vor der Transduktion für 30 min bei 95°C inkubiert. Im Standardansatz blieben die Amplikonvektoren unbehandelt. Die CD70 Expression und die Zytotoxizität wurden 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt und sind in der Abbildung in Prozent dargestellt.

Die Experimente zeigen einerseits, dass nach Inkubation der Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren bei 95°C und anschließender Transduktion 24 h p.t. keine CD70 Expression mehr nachweisbar ist. Da durch das Erhitzen auf 95°C ein großer Teil der herpesviralen Proteine bei diesen Temperaturen denaturiert wird, kann keine Infektion bzw. Transduktion mehr stattfinden. Andererseits wird ersichtlich dass die Zytotoxizität im Vergleich zum Kontrollansatz nur um etwa ein Drittel reduziert ist ($54 \pm 6\%$ vs $37 \pm 9\%$). Dies deutet darauf hin, dass die Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren nicht alleine durch die Anwesenheit von HSV-Proteinen bedingt sein kann.

Zur Untersuchung der zweiten Hypothese, die besagt, dass die Zytotoxizität durch subzelluläre Zellpartikel verursacht sein könnte, wurden im Folgenden Experimente durchgeführt, in denen versucht wurde mittels Ultraschallbehandlung die subzellulären Zellpartikel aus der Amplikonsuspension zu lösen. Dazu wurde die Amplikonsuspension des

einen Ansatzes vor der Transduktion 45 sec mit Ultraschall (3°C; CONTROL = 8; CYCLE DUTY = constant) behandelt. Zum Vergleich mit dem Standardvorgehen wurde in einem zweiten Ansatz die Amplikonsuspension nicht mit Ultraschall behandelt, sondern bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. 1×10^5 A20 Zellen wurden jeweils mit 10 μ l (= MOI 20) Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren (HSV.CD70) transduziert. Die CD70 Expression und die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, wurden 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n = 2). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.7 dargestellt.

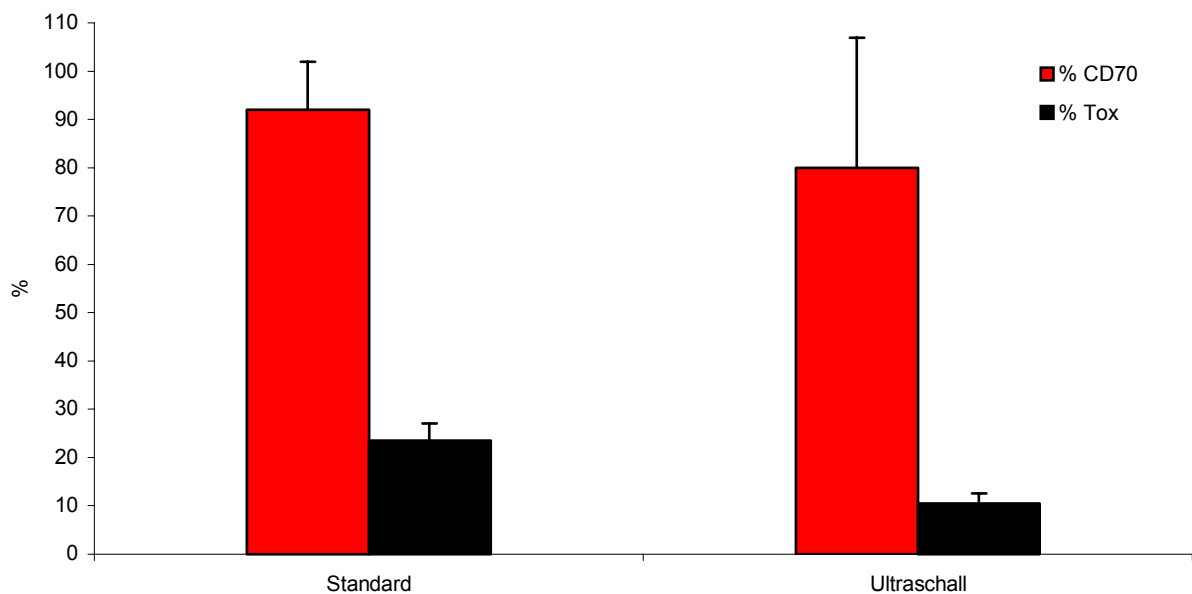


Abb. 4.7: Die Transgenexpression und die Zytotoxizität nach Aufreinigung der Amplikonsuspension mittels Ultraschall

1×10^5 A20 Zellen wurden mit HSV.CD70 transduziert. Ein Ansatz wurde vor der Transduktion 45 sec mit Ultraschall behandelt. Im Standardansatz blieben die Amplikonvektoren unbehandelt. Die CD70 Expression und die Toxizität wurden 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt und sind in der Abbildung in Prozent dargestellt.

Die Abbildung zeigt, dass die gemessene Zytotoxizität nach Aufreinigung der Amplikonsuspension mittels Ultraschall und anschließender Transduktion mit HSV.CD70 nur noch halb so groß war wie im Standardansatz ($24 \pm 4\%$ vs $11 \pm 2\%$). Die primär schon geringere Zytotoxizität des Standardansatzes im Vergleich zur Abbildung 4.6 ist dadurch zu erklären, dass für die in Abbildung 4.7 dargestellten Versuche nur 10 μ l (= MOI 20) statt 20 μ l (= MOI 40) HSV.CD70 zur Transduktion eingesetzt wurde.

Den in Abbildung 4.7 dargestellten Ergebnissen zur Folge scheinen subzelluläre Zellpartikel, wie sie während der Amplikonherstellung entstehen, tatsächlich eine deutliche Zytotoxizität

zu bedingen. Zur weiteren Erhärtung dieser Annahme wurden jeweils 1×10^5 A20 Zellen mit 20 μ l eines Leeransatzes „transduziert“. Die Suspension dieses Leeransatzes wurde gewonnen, indem Zellen der entsprechenden komplettierenden Verpackungszelllinie alle Schritte zur Herstellung von Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren durchlaufen haben (s. Material und Methoden, Kapitel 3.2.4). Das bedeutet, dass im Verlauf der Amplikonpräparation dem Ansatz jedoch weder das Helfervirus, noch das transgenetragende Amplikonplasmid zugegeben wurde. Die gewonnene Suspension enthielt demnach nur die durch die Zelllyse während der Amplikonherstellung entstandenen subzellulären Zellpartikel. Die Suspension des Leeransatzes wurde wie oben beschrieben mit Ultraschall behandelt ($n = 2$) und die Zytotoxizität, angegeben in Prozent, 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

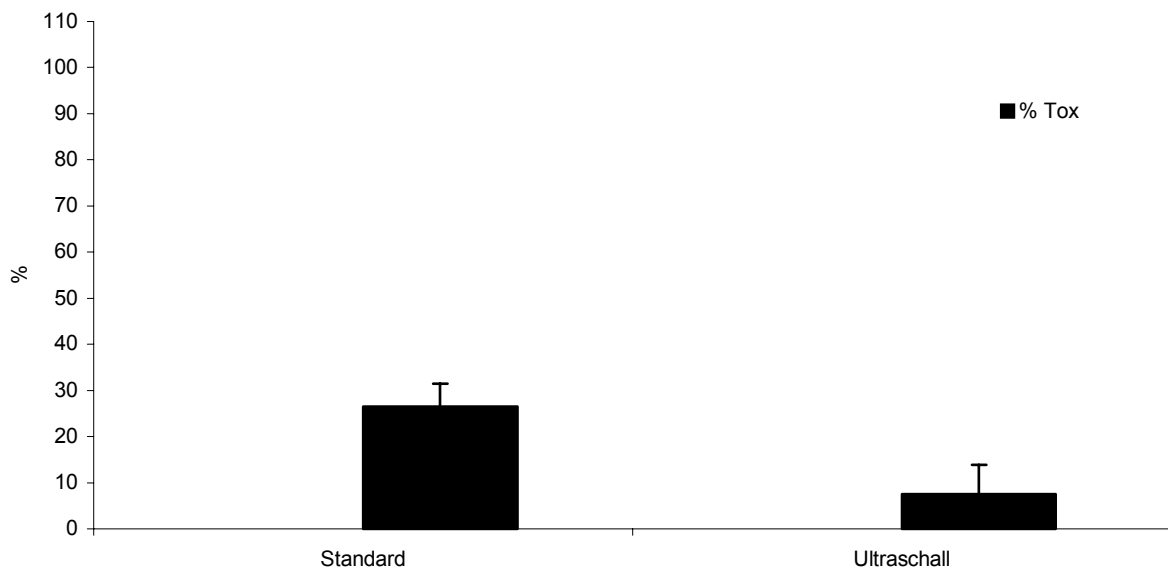


Abb. 4.8: Die Zytotoxizität nach Aufreinigung einer Leeransatz-Suspension mit Ultraschall

1×10^5 A20 Zellen wurden mit der Suspension eines Leeransatzes (s.o.) „transduziert“. Ein Ansatz wurde vor der „Transduktion“ 45 sec mit Ultraschall behandelt. Im Standardansatz blieb die zur „Transduktion“ verwendete Suspension unbehandelt. Die Toxizität wurde 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist in der Abbildung in Prozent dargestellt.

Nach „Transduktion“ mit dem Leeransatz ließ sich eindeutig eine Zytotoxizität messen, obwohl dieser Ansatz, keine auf Herpes simplex Virus basierende Amplikonvektoren, sondern nur subzelluläre Zellpartikel enthielt. Durch die Aufreinigung der Suspension mittels Ultraschall konnte die Zytotoxizität insgesamt um mehr als zwei Drittel reduziert werden, von $27 \pm 5\%$ auf $8 \pm 6\%$.

Eine Expression des Transgens CD70 konnte erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden, da das transgentragende Plasmid während der Amplikonherstellung dem Ansatz nicht zugegeben wurde.

In einer abschließenden Versuchsreihe wurde noch ein weiteres Verfahren zur Aufreinigung der Amplikonsuspension getestet. Jeweils 1×10^5 A20 Zellen wurden mit 20 μl (= MOI 41,7) Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren (HSV.CD70) transduziert. Dabei wurde für die Versuche, im Unterschied zu den ersten drei Versuchsreihen (s. Abb. 4.6 bis 4.8), eine Amplikonpräparation benutzt, die in vorangegangenen Versuchen auf A20 Zellen eine besonders hohe Zytotoxizität gezeigt hatte. Bei zwei Ansätzen wurde die Amplikonsuspension vor der Transduktion mit Hilfe von Filtern verschiedener Größe gereinigt. Zum Vergleich mit dem Standardvorgehen wurde in einem dritten Ansatz die Amplikonsuspension nicht filtriert, sondern bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert (n = 2). Die CD70 Expression und die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, wurden 24h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

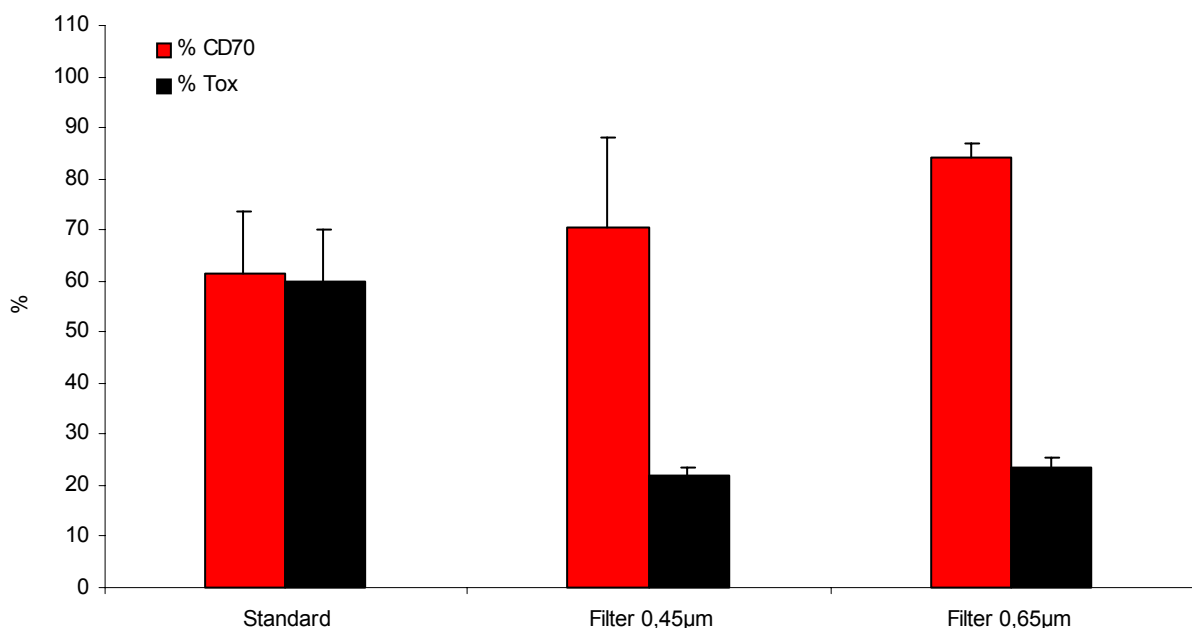


Abb. 4.9: Transgenexpression und Zytotoxizität nach Aufreinigung der Amplikonsuspension mittels verschiedener Filter

1×10^5 A20 Zellen wurden mit HSV.CD70 transduziert. Bei zwei Ansätzen wurde die Amplikonsuspension vor der Transduktion mit Hilfe von Filtern mit einer Porengröße von 0,45 μm bzw. 0,65 μm gereinigt. Im Standardansatz blieben die Amplikonvektoren unbehandelt. Die CD70 Expression und die Toxizität wurden 24h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt und sind in der Abbildung in Prozent dargestellt.

Die Ergebnisse (s. Abb. 4.9) zeigen, wie in den vorangegangenen Experimenten, dass die Zytotoxizität durch Entfernung der subzellulären Zellpartikel, hier durch Reinigung über verschiedene Filter, um fast zwei Drittel reduziert werden konnte ($60 \pm 10\%$ vs $22 \pm 1\%$ bzw. $24 \pm 2\%$). Dabei zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Filtergrößen.

Des Weiteren ist aus der Abbildung ersichtlich, dass sich die CD70 Expression durch die Filtrierung der Amplikonsuspension vor der Transduktion bis zu ca. 20% steigern ließ ($62 \pm 12\%$ vs $71 \pm 18\%$ bzw. $84 \pm 3\%$). Bezüglich der Verwendung des $0,65 \mu\text{m}$ Filters handelt es sich sogar um eine signifikante Steigerung.

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass die nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren beobachtete Zytotoxizität teilweise durch die Expression von herpesviralen Proteinen bedingt ist. Die Denaturierung dieser Proteine führt allerdings nur zu einer vergleichbar geringen Reduktion der Toxizität. Der größere Anteil der Zytotoxizität ist durch in der Amplikonsuspension befindliche subzelluläre Zellpartikel bedingt, die während der Amplikonpräparation entstehen. Eine Entfernung dieser subzellulären Zellpartikel aus der Amplikonsuspension mittels Ultraschallbehandlung bzw. Aufreinigung über Filter führt zu einer deutlichen Reduktion der Zytotoxizität und damit zu einer Optimierung der Transduktionsbedingungen im Helfervirus-abhängigen Amplikonssystem.

Vergleichbare Versuche nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (Daten nicht gezeigt) zeigten nur eine geringfügige Reduktion der Zytotoxizität. Das ist am wahrscheinlichsten dadurch zu erklären, dass herstellungsbedingt ein Präparationsschritt mit nachfolgender Zellyse wegfällt. Dadurch sind in der Amplikonsuspension primär weniger subzelluläre Zellpartikel enthalten.

4.4 CD70 Expression in humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und primären leukämischen Blasten nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren

Im Hinblick auf die projizierte klinische Anwendung einer Leukämievakzine wurde in einem zweiten Schritt die Gentransfereffizienz von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren in humanen Leukämie-/Lymphomzellen und primären leukämischen Blasten getestet.

Im Folgenden soll zuerst die CD70 Expression und die Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (BAC.CD70) in humanen Leukämie-

/Lymphomzelllinien dargestellt werden. Für die Experimente wurden als lymphoblastische Zelllinien AD (Prä-B-ALL), Daudi (Burkitt-Lymphom) und Jurkat (T-Zell-Leukämie) Zellen verwendet, sowie HL60 Zellen (humane AML) als myeloische Zelllinie. Diese Zellen tragen auf ihrer Oberfläche natürlicherweise weder die murine Variante des kostimulatorischen Moleküls CD70, noch sezernieren sie IL-2.

Es wurden jeweils 1×10^5 Zellen mit 20 μ l bzw. 40 μ l Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (BAC.CD70) transduziert (jeweils 2 Einzelerperimente) und die CD70 Expression sowie die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die eingesetzte Menge an Amplikonvektoren entsprach etwa der 10-fachen Vektormenge, die zum Erreichen einer TU_{50} auf der murinen Modellzelllinie 20 erforderlich war.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.10 und 4.11 dargestellt.

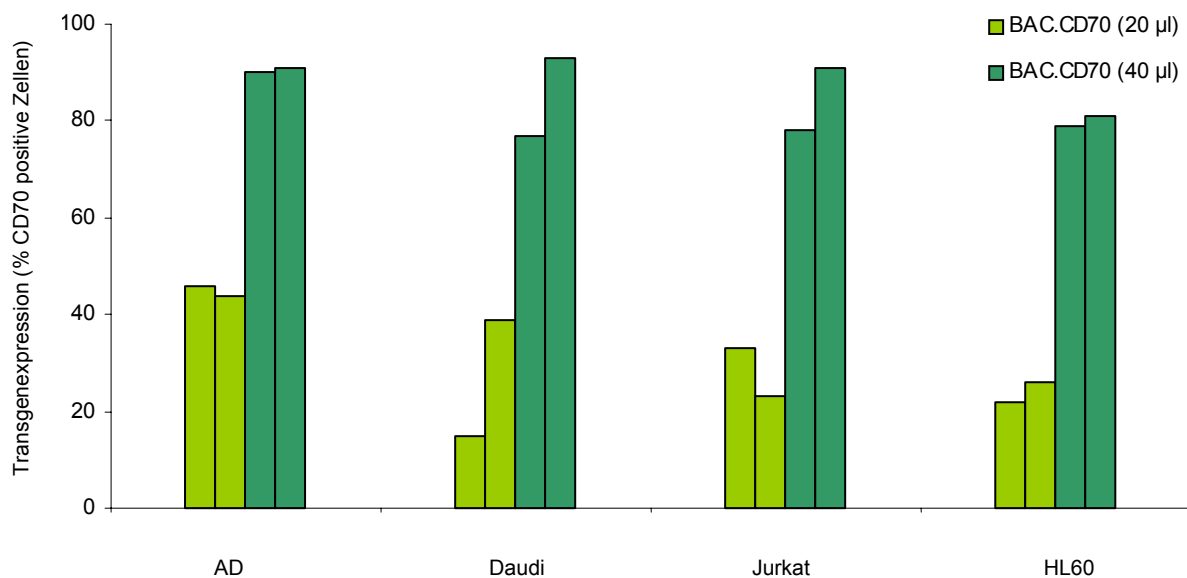


Abb. 4.10: Transgene CD70 Expression nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren auf malignen hämatopoetischen Zelllinien

Jeweils 1×10^5 AD, Daudi, Jurkat und HL60 Zellen wurden mit BAC.CD70 transduziert und die CD70 Expression 24h p.t. mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Es sind jeweils zwei Einzelerperimente mit unterschiedlichen eingesetzten Mengen an BAC.CD70 dargestellt. Die CD70 Expression ist in Prozent angegeben.

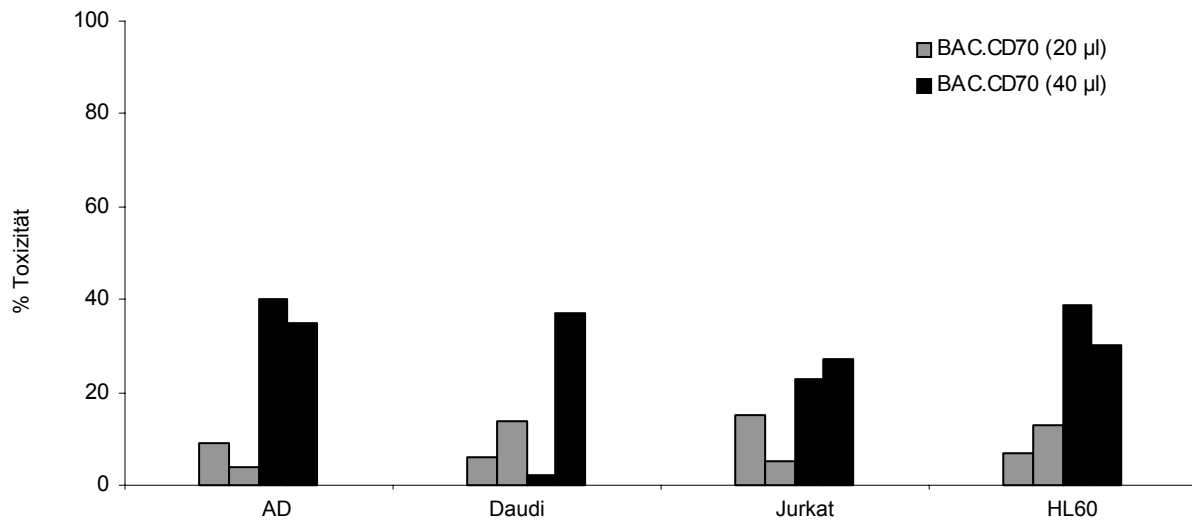


Abb. 4.11: Die Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren auf malignen hämatopoetischen Zelllinien

Jeweils 1×10^5 AD, Daudi, Jurkat und HL60 Zellen wurden mit BAC.CD70 transduziert und der prozentuale Anteil der Zytotoxizität 24h p.t. mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Es sind jeweils zwei Einzelexperimente mit unterschiedlichen eingesetzten Mengen an BAC.CD70 dargestellt.

Hinsichtlich der CD70 Expression zeigte sich, dass nach Transduktion mit 20 µl BAC.CD70 bei keiner der humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien eine Transgenexpression von ≥ 50 % gemessen werden konnte. Nach Transduktion der murinen Zelllinie A20 mit der gleichen Menge an BAC.CD70 wurde hingegen eine Transgenexpressionen von $91 \pm 7\%$ erreicht (s. Abb. 4.19). Durch eine weitere Verdoppelung der eingesetzten Menge an Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren konnten jedoch auf den humanen Zelllinien vergleichbare Werte mit einer durchschnittlichen CD70 Expression von $85 \pm 7\%$ erzielt werden.

Es zeigte sich allerdings auch, dass sich die Toxizität nach Transduktion mit 40 µl BAC.CD70 im Vergleich zur Transduktion mit 20 µl BAC.CD70 verdoppelte und bei durchschnittlich 29 ± 12 % lag.

Im Weiteren wurden primäre leukämische Blasten von 6 Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und von zwei Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) transduziert. Alle Patienten hatten zum Zeitpunkt der Probengewinnung einen hohen Blastenanteil ($> 70\%$) im Knochenmark bzw. peripheren Blut. Um die Blasten in der durchflußzytometrischen Messung von nicht-neoplastischen Zellen unterscheiden zu

können, erfolgte eine Antikörperdoppelfärbung. Die Proben der ALL-Patienten wurden mit CD70 als Marker des Transgens und mit CD19 als B-Zellmarker gefärbt. Bei den AML-Patientenproben wurde entsprechend CD70 und CD34 als Myeloblastenmarker verwendet. In der folgenden Abbildung ist die CD70 Expression der doppelt positiven Zellen (CD70 / CD19 bzw. CD70 / CD34) und die Zytotoxizität nach Transduktion mit BAC.CD70 dargestellt. Es wurden jeweils 1×10^5 Zellen mit 20 μl bzw. 40 μl BAC.CD70, also mit der vergleichbaren Vektormenge wie die humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien, transduziert (n = 6 bzw. n = 2) und die CD70 Expression der doppelt positiven Zellen sowie die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

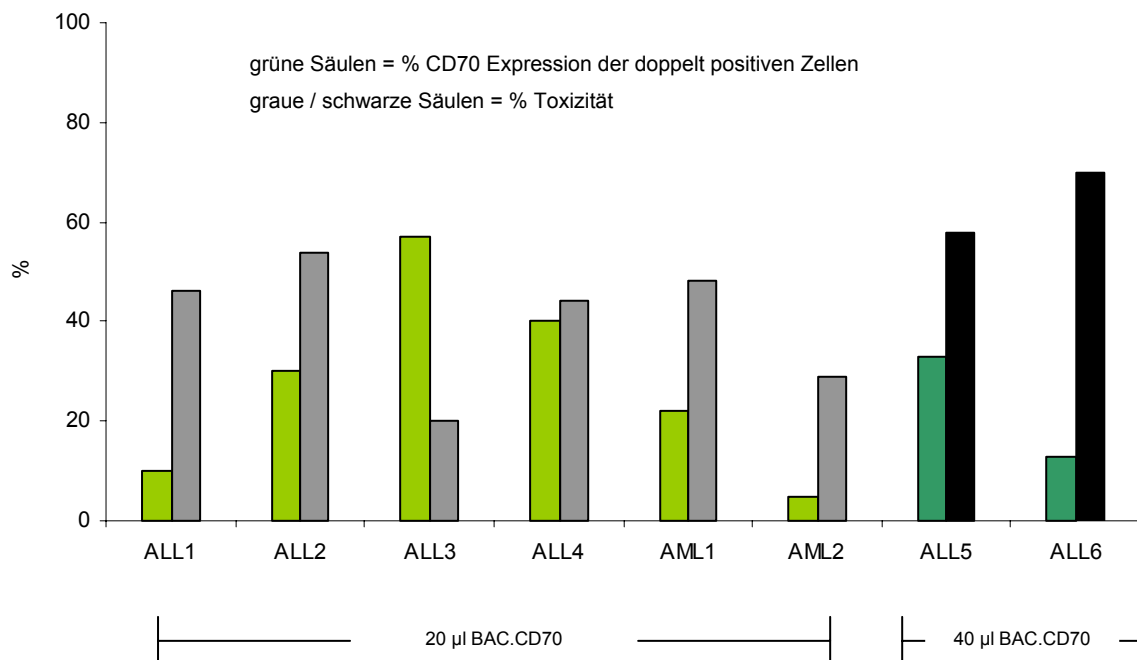


Abb. 4.12: Transgene CD70 Expression der doppelt positiven Zellen und die Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren

1×10^5 Primäre leukämische Blasten wurden mit BAC.CD70 transduziert und der prozentuale Anteil der CD70 Expression der doppelt positiven Zellen (CD70 / CD19 bzw. CD70 / CD34) und der Zytotoxizität 24h p.t. mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Es sind acht Einzelexperimente mit unterschiedlichen eingesetzten Mengen an BAC.CD70 dargestellt.

Wie aus der Abbildung 4.12 ersichtlich ist, konnte nachgewiesen werden, dass mittels Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren ein Gentransfer in primäre leukämische Blasten möglich ist. Die Variationsbreite der gemessenen CD70 Expression ist allerdings hoch (5% - 57%) und aufgrund der relativ hohen Zytotoxizität (20% - 54%) ist ein Verlust von bis zu etwa der Hälfte der transduzierten Zielzellen zu sehen.

Die Verdoppelung der eingesetzten Menge an BAC.CD70 führt nicht zu einer Zunahme der Transgenexpression, die Toxizität liegt bei 58% bzw. 70%.

4.5 IL-2 Expression in humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren

Neben den Untersuchungen bezüglich der Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 und der Zytotoxizität in humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien (s. Kap. 4.4) wurden auch Analysen zur Dauer der Sekretion des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 in humanen Zelllinien durchgeführt. Für die Experimente wurden als lymphoblastische Zelllinien AD (Prä-B-ALL), Daudi (Burkitt-Lymphom) und Jurkat (T-Zell-Leukämie) Zellen verwendet, die natürlicherweise kein IL-2 sezernieren.

In den Abbildungen 4.13 bis 4.15 ist die IL-2 Sekretion der oben genannten humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen (HSV.IL-2) und Helfervirus-freien (BAC.IL-2) HSV-1 Amplikonvektoren dargestellt. Pro Ansatz wurden 1×10^5 Zellen mit HSV.IL-2 und BAC.IL-2 einer äquivalenten TU, welche einer MOI = 5 im Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem entspricht, transduziert (n = 2). Als Kontrolle wurden nicht transduzierte Zellen der jeweiligen Zelllinie eingesetzt. Die IL-2 Sekretion wurde mittels ELISA an Tag 1, 2, 3 und 4 p.t. bestimmt.

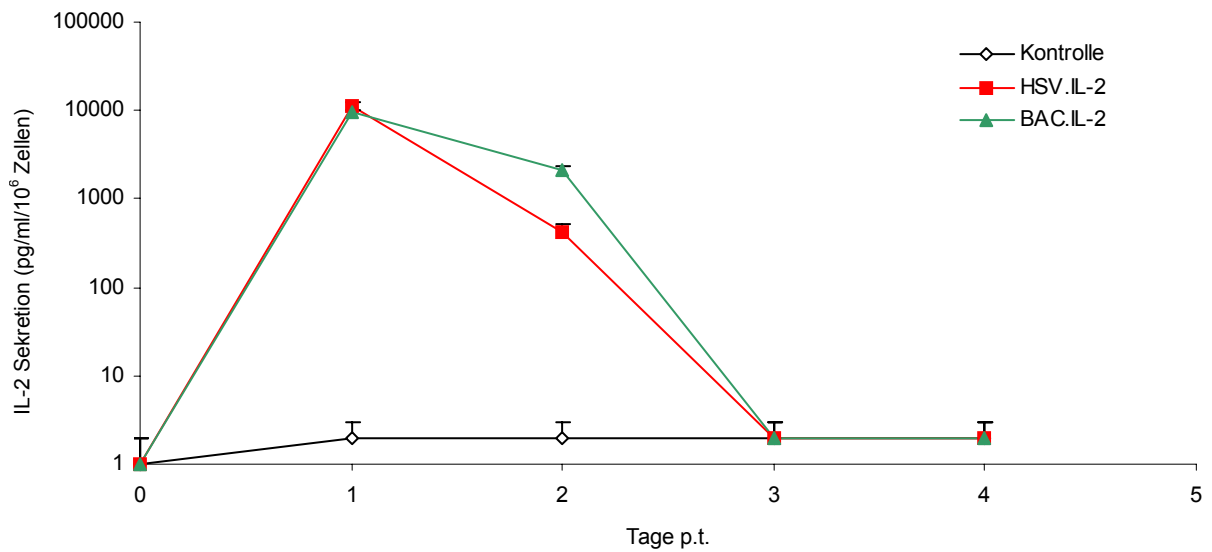


Abb. 4.13: Die IL-2 Sekretion der humanen Zelllinie AD

1×10^5 AD Zellen wurden mit HSV.I.L-2 und BAC.I.L-2 einer äquivalenten TU transduziert. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte Zellen eingesetzt. Die IL-2 Sekretion wurde mittels ELISA an Tag 1, 2, 3 und 4 p.t. bestimmt.

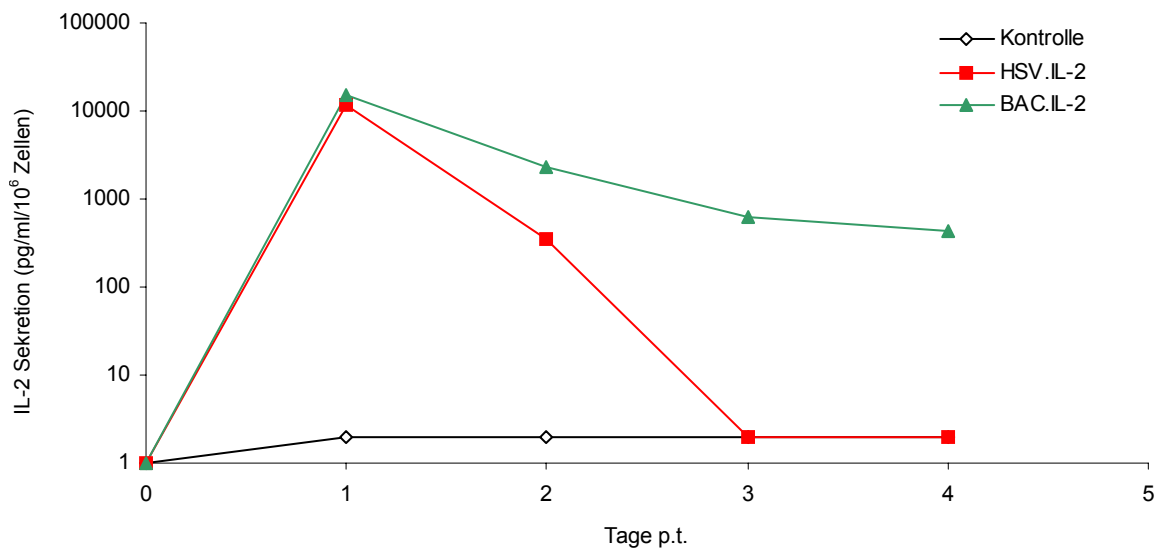


Abb. 4.14: Die IL-2 Sekretion der humanen Zelllinie Daudi

1×10^5 Daudi Zellen wurden mit HSV.I.L-2 und BAC.I.L-2 einer äquivalenten TU transduziert. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte Zellen eingesetzt. Die IL-2 Sekretion wurde mittels ELISA an Tag 1, 2, 3 und 4 p.t. bestimmt. Es ist ein Einzelexperiment dargestellt.

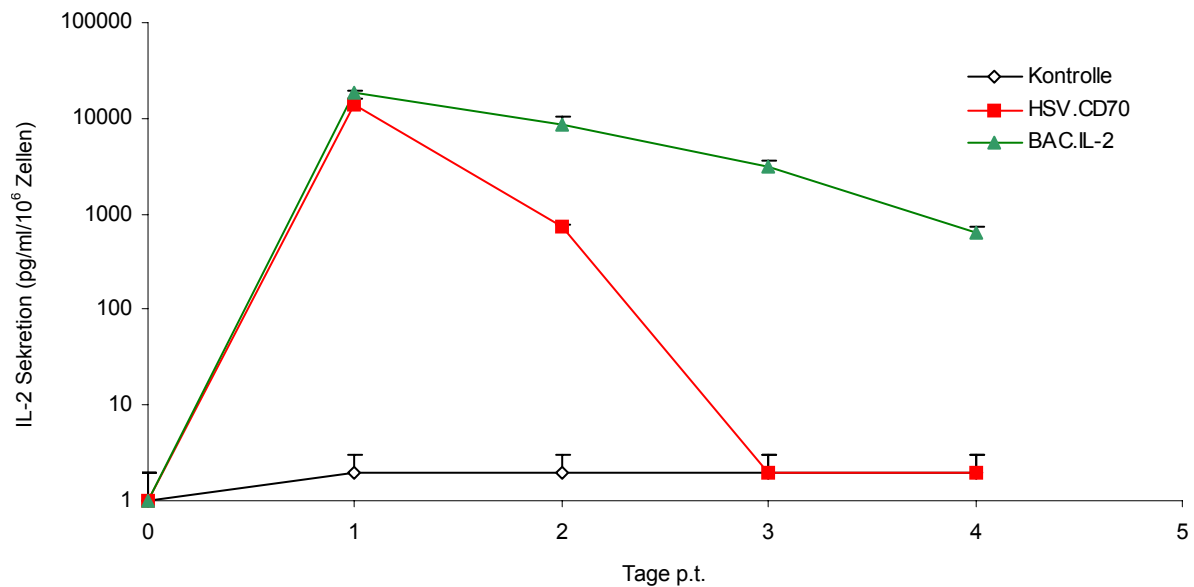


Abb. 4.15: Die IL-2 Sekretion der humanen Zelllinie Jurkat

1×10^5 Jurkat Zellen wurden mit HSV.IL-2 und BAC.IL-2 einer äquivalenten TU transduziert. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte Zellen eingesetzt. Die IL-2 Sekretion wurde mittels ELISA an Tag 1, 2, 3 und 4 p.t. bestimmt.

Die Abbildungen zeigen, dass nach Transduktion mit HSV.IL-2 bei allen Zelllinien die höchste IL-2 Konzentration 24 h p.t. gemessen werden kann. Danach fällt die IL-2 Konzentration schnell ab und erreicht bereits an Tag 3 nahezu den Wert des Background. Nach Transduktion mit BAC.IL-2 differieren die Ergebnisse zwischen den einzelnen Zelllinien. Während bei allen Zelllinien 24 h p.t. die höchste IL-2 Konzentration gemessen werden kann, fällt die Konzentration in den folgenden Tagen unterschiedlich stark ab. Nach Transduktion von Jurkat bzw. Daudi Zellen fällt die IL-2 Konzentration im Verlauf langsam auf 650 ± 70 pg/ml/10⁶ Zellen bzw. 430 pg/ml/10⁶ Zellen an Tag 4 ab. Bei AD Zellen fällt die IL-2 Konzentration vergleichbar mit dem Ergebnis nach Transduktion mit HSV.IL-2 schnell ab und erreicht an Tag 3 ebenfalls nahezu den Wert des Background.

4.6 Expression von herpesviralen Entry-Rezeptoren auf humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und primären leukämischen Blasten

Die Höhe der Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 und die Dauer der Sekretion des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 variieren nach Transduktion von humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und primären leukämischen Blasten mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie (s. Kap. 4.4 und 4.5).

Es ist bekannt, dass für die Einschleusung von HSV in Zellen von Säugetieren u.a. bestimmte Herpesviruseingangsmotoren (Hve) erforderlich sind (s. Kap. 1.4.1). Dies gilt auch für von HSV-abgeleitete Vektoren. Es stellt sich daher die Frage, ob eine unterschiedliche Transgenexpression durch fehlende oder vermindert vorkommende Hve-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der entsprechenden Zielzellen bedingt sein könnte. Um dieser Frage weiter nachzugehen wurde zunächst die Expression der drei charakteristischen Hve-Rezeptoren, HveA, HveB und HveC, auf verschiedenen humanen Zelllinien untersucht. Als lymphoblastische Zelllinien wurden AD (Prä-B-ALL), Daudi (Burkitt-Lymphom) und Jurkat (T-Zell-Leukämie) Zellen verwendet, sowie HL60 Zellen (humane AML) als myeloische Zelllinie. Für die Versuche wurde RNA aus jeweils $0,5-1 \times 10^6$ Zellen der entsprechenden Zelllinie isoliert und die Hve-Rezeptor-RNA mittels RT-PCR unter Verwendung von spezifischen HveA, -B und -C Primern nachgewiesen (n = 2-3). Der Nachweis von β -Aktin diente als interne Kontrolle, als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt.

In der Abbildung 4.16 ist ein Beispiel eines Agarosegels dargestellt, die Abbildung 4.17 zeigt einen Vergleich der Hve-Genexpression zwischen den einzelnen humanen Zelllinien.

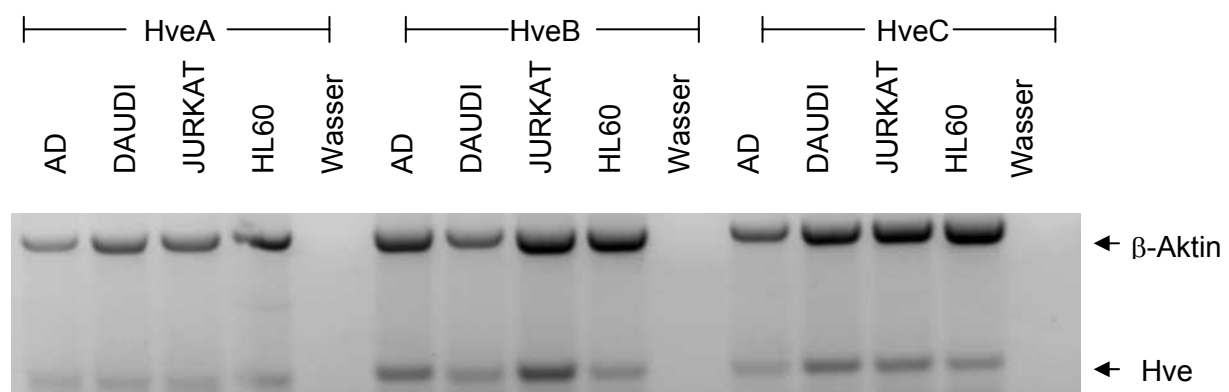


Abb. 4.16: Der Nachweis von Hve-Rezeptoren in humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien

Dargestellt sind die PCR Produkte nach RT-PCR auf einem Agarosegel. Die oberen Banden zeigen β -Aktin, das als interne Kontrolle diente, die unteren die verschiedenen Hve. Als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt.



Abb. 4.17: Vergleich der Hve-Genexpression in humanen Zelllinien

Die Hve-Rezeptor-RNA wurden mittels RT-PCR unter Verwendung von spezifischen HveA, -B und -C Primern nachgewiesen. Die semi-quantitative Bestimmung der Stärke der spezifischen Banden nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde mit Hilfe photometrischer Messung durchgeführt. In der Abbildung ist das relative Verhältnis der Hve- zur β -Aktin Genexpression für die einzelnen Zelllinien und die verschiedenen Hve-Rezeptoren dargestellt.

Wie in den Abbildungen 4.16 und 4.17 dargestellt, konnte die Expression aller drei Hve-Rezeptorgene in allen der oben genannten humanen Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen lymphoblastischen und myeloischen Zelllinien erkennbar.

Als nächstes wurde, auch im Hinblick auf die klinische Anwendung, die Expression der Hve-Rezeptorgene in primären leukämischen Blasten untersucht. Dazu wurde RNA aus Blasten von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) isoliert. Insgesamt wurde die RNA aus den Zellen von 15 ALL-Patienten mittels RT-PCR untersucht, bei denen entweder eine prä-B (n = 5) oder eine c-ALL (n = 10) diagnostiziert worden war. Die Expression von HveA, -B und -C Genen konnte in allen untersuchten primären leukämischen Blasten nachgewiesen werden (Abb. 4.18). Dabei ist die relative Hve-Genexpression des Hve A und -C mit der in den vorgenannten humanen Zelllinien vergleichbar, die des Hve B liegt in primären leukämischen Blasten jedoch tendenziell etwas höher.

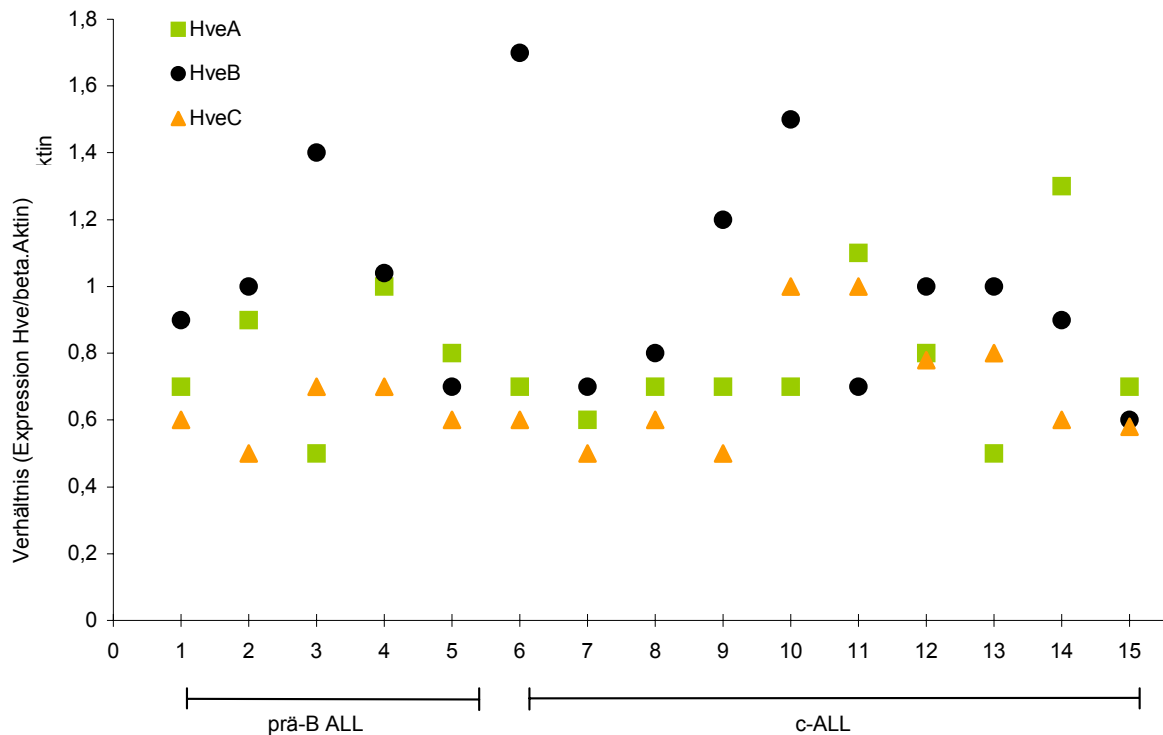


Abb. 4.18: Relative Hve-Genexpression in primären Leukämien

Die Hve-Rezeptoren wurden mittels RT-PCR unter Verwendung von spezifischen HveA, -B und -C Primern nachgewiesen. Die semi-quantitativ erfolgte Analyse der Stärke der spezifischen Banden nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde mit Hilfe photometrischer Messung durchgeführt. In der Abbildung ist das relative Verhältnis der Hve- zur β -Aktin Genexpression für die einzelnen akuten Leukämien und die verschiedenen Hve-Rezeptoren dargestellt.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass HveA und C, die insbesondere für die Einschleusung von HSV-1 benötigt werden, auf allen untersuchten Zellen zu gleichen Anteilen exprimiert werden. Es lässt sich daher kein Zusammenhang zwischen der in Kapitel 4.4 teilweise unterschiedlich hohen Transgenexpression und den auf der Zelloberfläche vorhandenen HSV-Rezeptorgenen erkennen.

4.7 Expression der immunmodulatorischen Moleküle CD70 und IL-2 in der murinen Zelllinie A20

Die Wirksamkeit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Leukämievakzine sollte später in einem murinen *in vivo*-Modell überprüft werden. Im Hinblick darauf wurde die

Expression der immunmodulatorischen Moleküle CD70 und IL-2 zunächst *in vitro* in den im syngenem Mausmodell eingesetzten A20 Zellen untersucht. Bei diesen Zellen handelte es sich um eine murine lymphoblastische Leukämiezelllinie.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden jeweils 1×10^5 A20 Zellen mit Helfervirus-abhängigen (HSV.CD70) und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (BAC.CD70) einer äquivalenten TU, welche einer MOI = 20 im Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem entspricht, transduziert (n = 3). Die CD70 Expression sowie die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, wurden 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

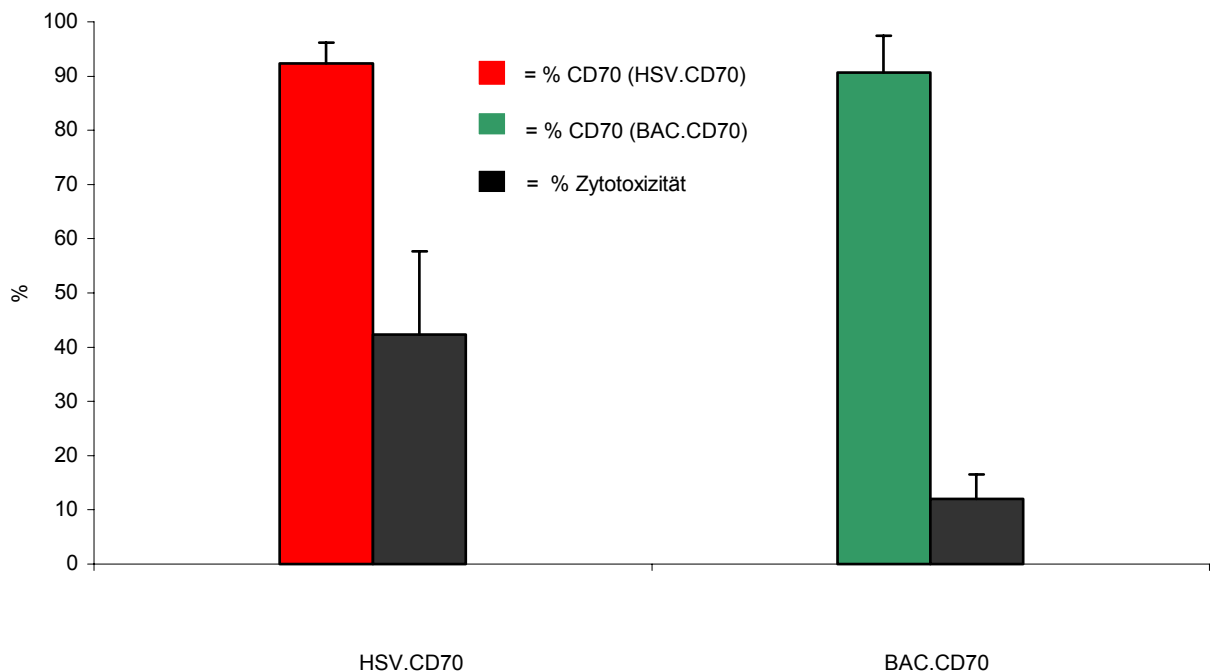


Abb. 4.19: Die CD70 Expression und die Zytotoxizität in A20 Zellen

Es wurden 1×10^5 A20 Zellen mit HSV.CD70 und BAC.CD70 einer äquivalenten TU transduziert. Die CD70 Expression, angegeben in Prozent und die Zytotoxizität wurden 24 h p.t. mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zytotoxizität ist dargestellt als der Anteil der toten Zellen in Prozent.

Die Ergebnisse zeigen eine gleich hohe prozentuale Transgenexpression 24 h p.t. mit Helfervirus-abhängigen und Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren. Die Zytotoxizität ist nach Transduktion mit BAC.CD70 im Vergleich zu der nach Transduktion mit HSV.CD70 signifikant ($p = 0,03$) erniedrigt.

Für die Induktion einer suffizienten Immunantwort ist eine Expression der immunmodulatorischen Gene über einen ausreichend langen Zeitraum erforderlich. Darum wurde in der folgenden Versuchsreihe die Transgenexpression und die Zytotoxizität über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht.

Es wurden jeweils 2×10^5 A20 Zellen mit HSV.CD70 und BAC.CD70 einer äquivalenten TU, welche einer MOI = 2 im Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem entspricht, transduziert (n = 3). Die CD70 Expression und die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 p.t. bestimmt.

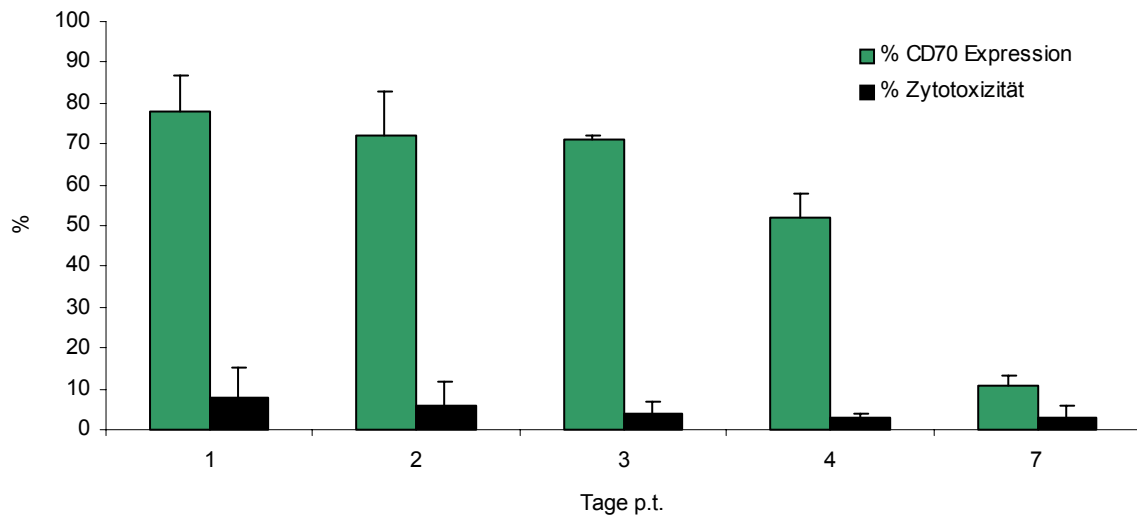


Abb. 4.20a: Der Verlauf der CD70 Expression und der Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren

2×10^5 A20 Zellen wurden mit BAC.CD70 transduziert. Die CD70 Expression und die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 p.t. bestimmt.

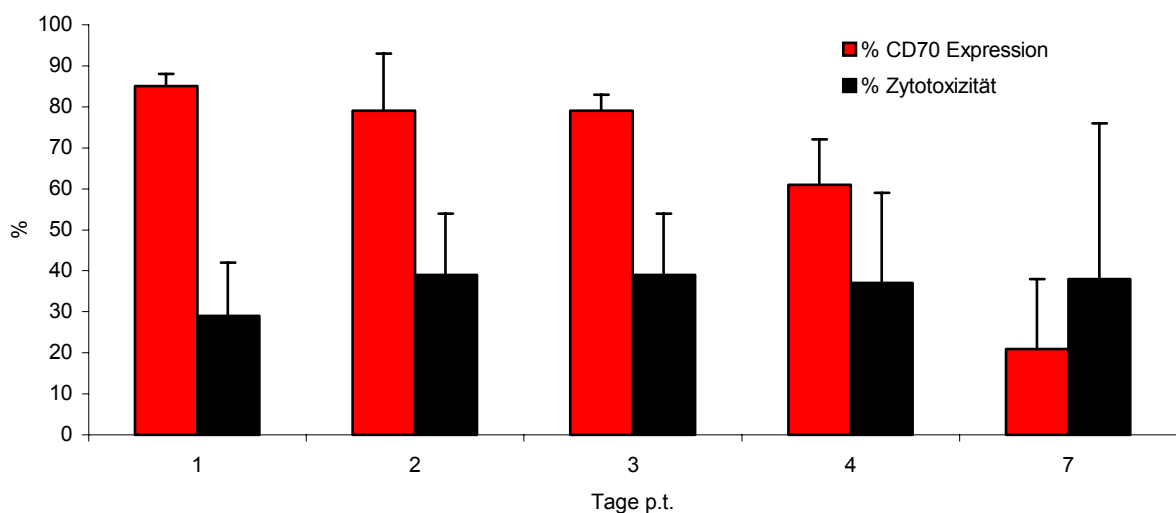


Abb. 4.20b: Der Verlauf der CD70 Expression und der Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren

2×10^5 A20 Zellen wurden mit HSV.CD70 transduziert. Die CD70 Expression und die Zytotoxizität, jeweils angegeben in Prozent, wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 p.t. bestimmt.

Wie in den Abbildung 4.20a und 4.20b dargestellt, lässt sich sowohl nach Transduktion mit BAC.CD70 als auch mit HSV.CD70 an den Tagen 1-3 p.t. eine Transgenexpression von > 70% messen. Die Transgenexpression fällt dann im weiteren Verlauf langsam ab und erreicht an Tag 7 p.t. einen Wert von $11 \pm 2\%$ (BAC.CD70) bzw. $21 \pm 17\%$ (HSV.CD70). Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,37$).

Die Zytotoxizität liegt nach Transduktion mit BAC.CD70 im Mittel an keinem der Tage höher als bei $8 \pm 7\%$. Nach Transduktion mit HSV.CD70 variiert die Zytotoxizität sehr stark innerhalb der einzelnen Experimente, liegt im Mittel aber an allen Tagen bei mindestens $29 \pm 13\%$. Die hohe Variationsbreite der Toxizität nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren sogar ein und derselben Vektorpräparation zeigte sich bereits in den unter Kapitel 4.2 dargestellten Titrationsexperimenten (s. Abb. 4.4) und bedingt die teilweise sehr hohen Standardabweichungen, insbesondere in einem über eine Woche gehenden Kinetikexperiment.

Die Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren führt also zu einer über mehrere Tage stabilen Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70. Damit wird eine vergleichbar langanhaltende Transgenexpression wie nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren erreicht, bei gleichzeitig erheblich geringerer Zytotoxizität.

Trotz einer geringen Zytotoxizität nach Transduktion von A20 Zellen mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren kommt es, wie nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren, zu einer deutlichen Abnahme der Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 an Tag 7 (Abb. 4.20a/b). Um die Frage zu beantworten wodurch diese Abnahme der Transgenexpression bedingt ist, wurden im Folgenden die absoluten Zellzahlen nach Transduktion HSV.CD70 und BAC.CD70 genauer untersucht.

In der Abbildung 4.21 sind die absoluten Zellzahlen nach Transduktion mit HSV.CD70 und BAC.CD70 mit einer äquivalenten TU, welche einer $MOI = 2$ im Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem entspricht, an den Tagen 1-7 p.t. exemplarisch dargestellt. Es handelte sich um die lebenden Zellen des jeweiligen Ansatzes, bestimmt als Trypan-Blau-negative Zellen. Hierbei wurde nicht nach CD70 negativen und CD70 positiven lebenden Zellen differenziert. Als Kontrolle dienten nicht transduzierte A20 Zellen. Die Ausgangsmenge vor der Transduktion lag bei 2×10^5 Zellen.

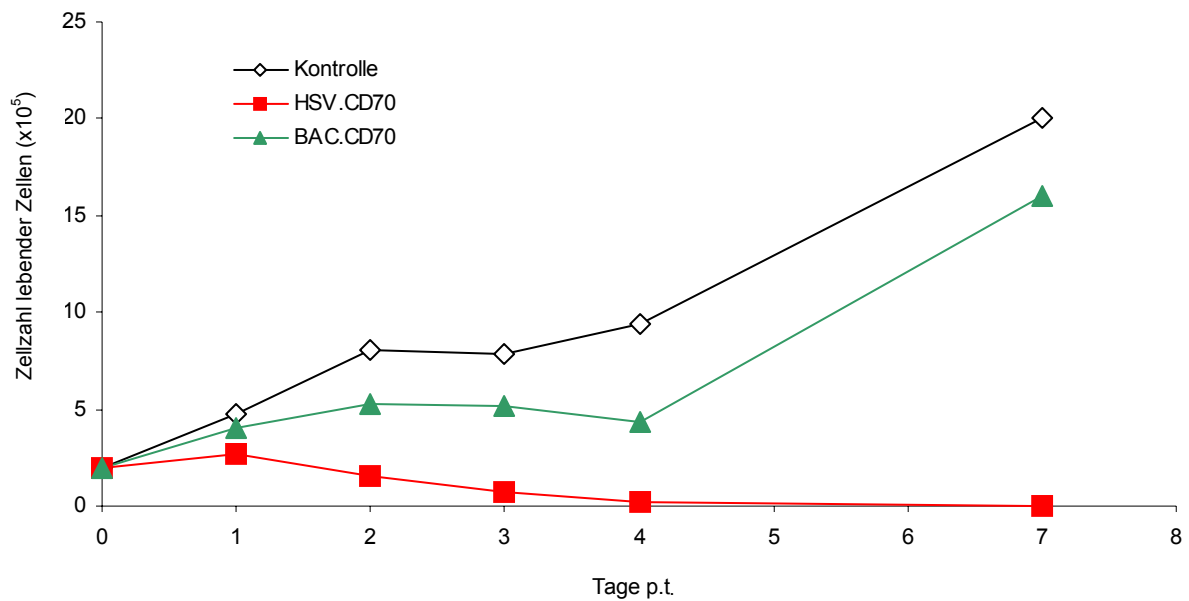


Abb. 4.21: Zellproliferation nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen und -freien HSV-1 Amplikonvektoren

2x10⁵ A20 Zellen wurden mit HSV.CD70 und BAC.CD70 transduziert und die Zellzahlen an den Tagen 1-7 p.t. bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte A20 Zellen eingesetzt.

Die Zellzahl fällt nach Transduktion mit HSV.CD70 rasch ab und erreicht an Tag 7 p.t. einen Wert von 0,2x10⁵ Zellen, während die Zellzahl nach Transduktion mit BAC.CD70 im Verlauf, ähnlich wie bei der mitgeführten Kontrolle, immer weiter ansteigt und an Tag 7 p.t. einen Wert von 16x10⁵ Zellen erreicht.

Die Betrachtung aller lebenden Zellen ermöglicht keine Differenzierung zwischen transgenetrischen und nicht-transgenetrischen Zellen. Daher sind in der Abbildung 4.22 die Zellzahlen ausschließlich der lebenden CD70 positiven Zellen an Tag 1-7 p.t. dargestellt. Berechnet wurden diese Werte, indem die Zellzahl mit dem Mittelwert (n = 3) der prozentualen CD70 Expression ins Verhältnis gesetzt wurde ((Mean % CD70 Expression / 100) x gezählte Zellzahl).

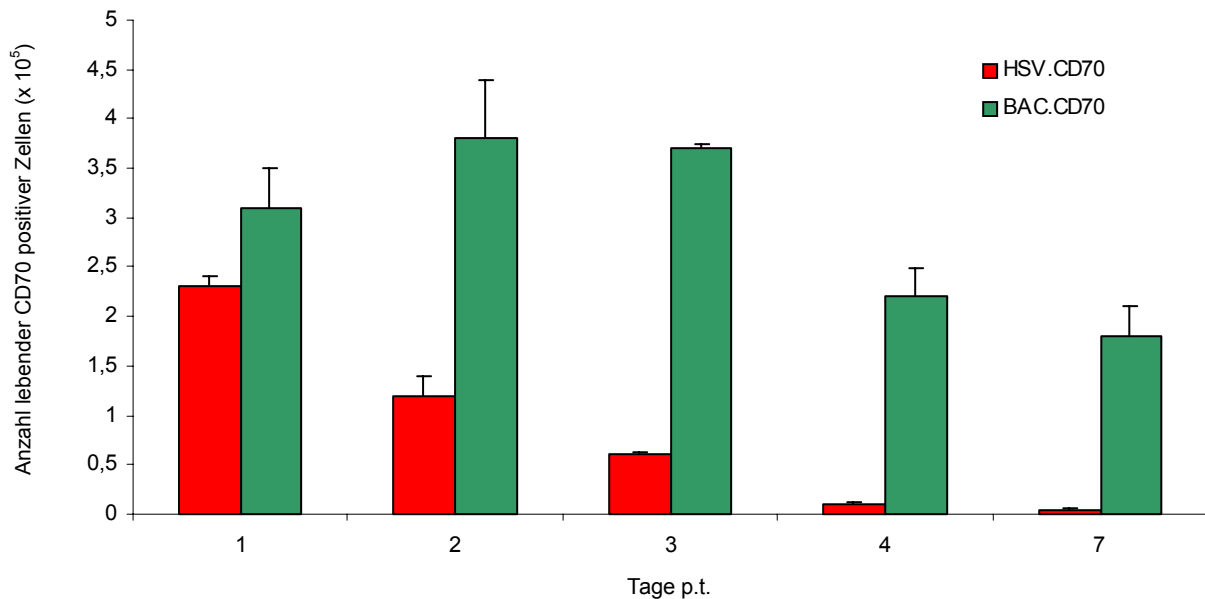


Abb. 4.22: Absolute Zellzahlen lebender CD70 positiver Zellen nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen und -freien HSV-1 Amplikonvektoren

2×10^5 A20 Zellen wurden mit HSV.CD70 und BAC.CD70 transduziert und die Zellzahlen an den Tagen 1-7 p.t. bestimmt.

Nach Transduktion mit BAC.CD70 bleibt die Zellzahl an Tag 1-3 p.t. annähernd stabil und nimmt dann im Verlauf weiter ab bis zu einem Wert von $1,8 \pm 0,3 \times 10^5$ Zellen an Tag 7 p.t. Im Gegensatz dazu fällt die Zellzahl nach Transduktion mit HSV.CD70 ab Tag 1 p.t. stetig ab und erreicht an Tag 7 p.t. einen Wert von $0,04 \pm 0,03 \times 10^5$ Zellen. Nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren sind an Tag 7 p.t. noch deutlich mehr transgentragende Zellen vorhanden als nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren. Bezogen auf die Zahl aller lebender Zellen an Tag 7 p.t. nach Transduktion mit BAC.CD70 ist der Anteil der immunogenen Zellen jedoch gering (16×10^5 Zellen vs. $1,8 \pm 0,3 \times 10^5$ Zellen).

Neben den Untersuchungen zur Kinetik der Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70, wurde auch eine Analyse zur Dauer der Sekretion des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen und Helfervirus-freien HSV Amplikonvektoren durchgeführt. Dazu wurden 1×10^5 A20 Zellen mit HSV.IL-2 und BAC.IL-2 einer äquivalenten TU transduziert und die IL-2 Sekretion mittels ELISA an Tag 1, 2, 3 und 4 p.t. im Überstand bestimmt ($n = 2$). Der Überstand wurde dabei täglich abgenommen. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte A20 Zellen eingesetzt.

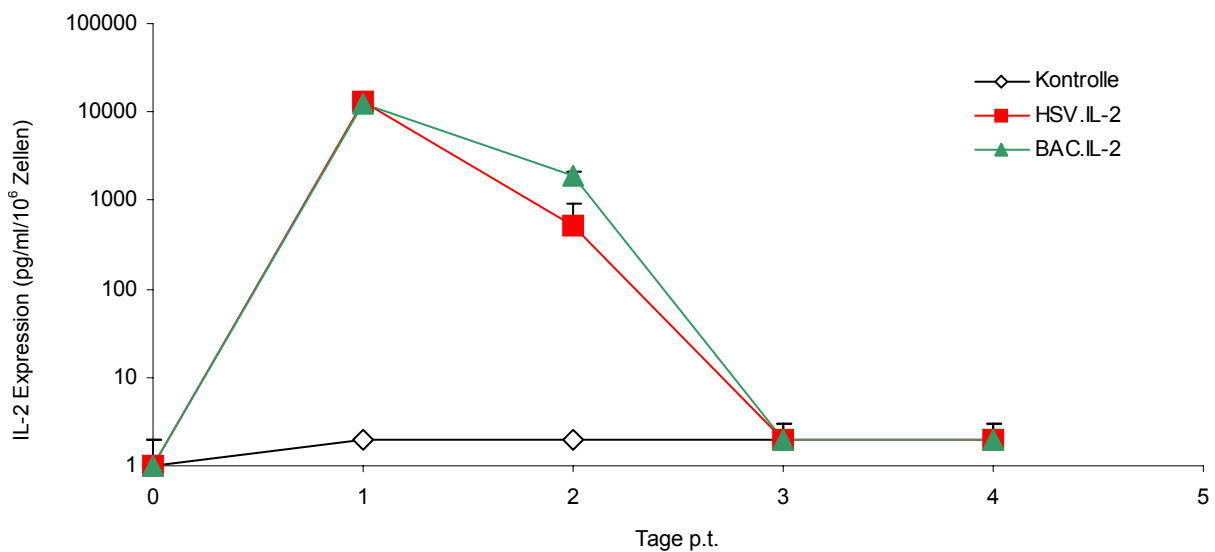


Abb. 4.23: Der Vergleich der IL-2-Sekretion nach Transduktion von murinen Leukämiezellen mit Helfervirus-abhängigen und -freien HSV-1 Amplikonvektoren

1×10^5 A20 Zellen wurden mit BAC.IL-2 und HSV.IL-2 transduziert. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte Zellen eingesetzt. Die IL-2 Sekretion wurde mittels ELISA an Tag 1, 2, 3 und 4 p.t. im Überstand bestimmt.

Nach Transduktion mit HSV.IL-2 bzw. BAC.IL-2 zeigt sich an den Tagen 1-4 p.t. ein identischer Sekretionsverlauf des Zytokins IL-2. Beide Amplikonvektoren bewirken die höchste IL-2 Sekretion 24 h p.t. Danach fällt die IL-2 Konzentration deutlich ab und erreicht an Tag 3 p.t. den Wert des Backgrounds.

4.8 Das A20-Mausmodell – ein Behandlungsmodell zur Leukämievakzination

Zur Überprüfung der Hypothese, dass Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren als Vektoren für den Gentransfer im Rahmen einer Leukämievakzine verwendet werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit das A20-Mausmodell eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein murines Behandlungsmodell (s. Material und Methoden). Eine antileukämische Immunantwort sollte durch die gleichzeitige Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 und des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 erzeugt werden. Als Vektoren zur genetischen Veränderung der A20 Zellen wurden Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren (BAC.CD70 bzw. BAC.IL-2) eingesetzt.

Zur „Tumorgabe“ (*Challenge*) wurden den Mäusen 1×10^5 unbestrahlte und genetisch nicht veränderte Blasten der murinen Zelllinie A20 (murine Prä-B-Leukämie) subkutan (s.c.) in die Flanke injiziert. Die Gabe der Leukämiezellen führte zur Entstehung einer soliden lymphoblastischen Tumormasse. Die Gabe der Vakzine erfolgte an Tag 4 und 14 nach der Leukämie-*Challenge* (Abb. 4.24).

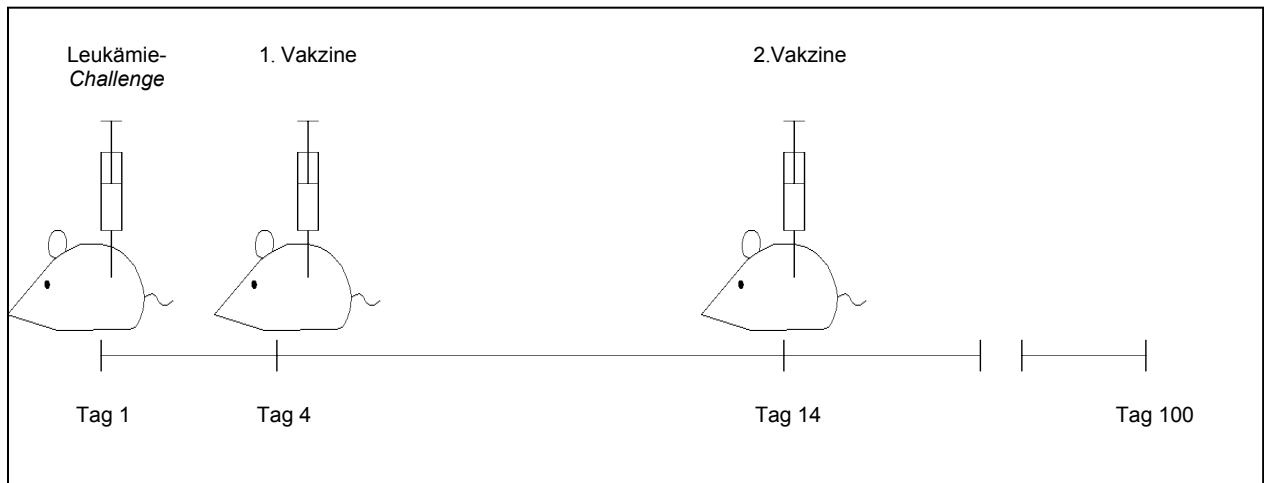


Abb. 4.24: Die Zeitliche Abfolge der Gabe der Leukämie-Challenge und der Vakzinezellen im murinen A20-Behandlungsmodell

An Tag 1 erhielten die Tiere 1×10^5 A20 Zellen als Leukämie-Challenge und nachfolgend an Tag 4 und 14 die genetisch modifizierte Vakzinezellen. Der Beobachtungszeitraum betrug 100 Tage, gerechnet ab dem Tag der Leukämie-Challenge.

Die verabreichte Vakzine bestand aus 2×10^5 A20 Zellen die vorher mit BAC.CD70 bzw. mit BAC.IL-2 transduziert und kurz vor der Injektion bestrahlt wurden. Zur Herstellung der Kombinationsvakzine wurden die mit BAC.CD70 und BAC.IL-2 transduzierten A20 Zellen vor der Bestrahlung gemischt.

Um die Immunkompetenz der als Vektor dienenden Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zu testen wurde ebenfalls eine Vakzine hergestellt, für die die A20 Zellen nur mit einem „leeren“ Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektor (BAC.vec) transduziert wurden, der demnach keine immunmodulatorischen Transgene enthielt.

Außer der Vakzine- und der Vektorkontrollgruppe wurden außerdem noch zwei Depletionsgruppen eingesetzt. Diese Depletionsgruppen dienten zur Darstellung der Beteiligung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen an der durch die Vakzine induzierten Immunantwort. Bei Beteiligung der genannten Zellen an einer antileukämischen Immunantwort führt eine Depletion mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern zu einem Ausbleiben der immunologischen Reaktion.

Die entsprechenden Antikörper wurden den Tieren vor der Gabe der Leukämiezellen und danach 1 x wöchentlich intraperitoneal injiziert. An Tag 4 und 14 erhielten die Tiere dieser Versuchsgruppen ebenfalls die Kombinationsvakzine mit CD70 + IL-2 exprimierenden Vakzinezellen. Als Kontrollgruppe wurden Tiere eingesetzt, die als Vakzine nicht transduzierte, bestrahlte A20 Zellen erhielten.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.25 bis 4.27 dargestellt.

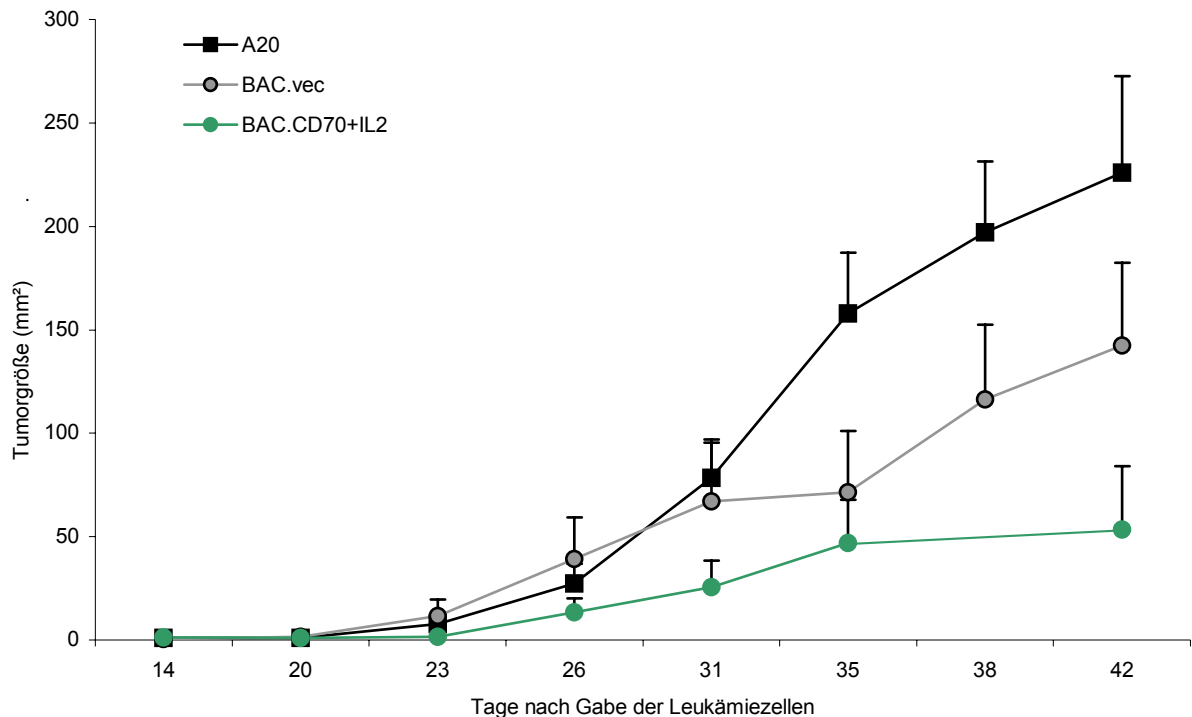


Abb. 4.25: Der Verlauf des Tumorwachstums in der Vakzinegruppe im Vergleich zu der A20- und der Vektorkontrollgruppe

Die Daten wurden aus insgesamt 2-3 Experimenten, mit jeweils 5-7 Tieren pro Versuchsgruppe, gepoolt. Die Mäuse erhielten zuerst eine „Tumorgabe“ mit A20 Zellen, gefolgt von 2 Vakzinegaben an Tag 4 und 14. Die Tiere der Kontrollgruppe ($n = 19$) erhielten nicht transduzierte aber bestrahlte A20 Zellen, die Mäuse der anderen dargestellten Gruppen bekamen Vakzinezellen, die vorher mit unterschiedlichen Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (BAC.vec, $n = 14$ und BAC.CD70+IL-2, $n = 14$) transduziert wurden. Die Tumorgöße ist in mm^2 angegeben und wurde durch Messungen mittels einer Schieblehre ermittelt.

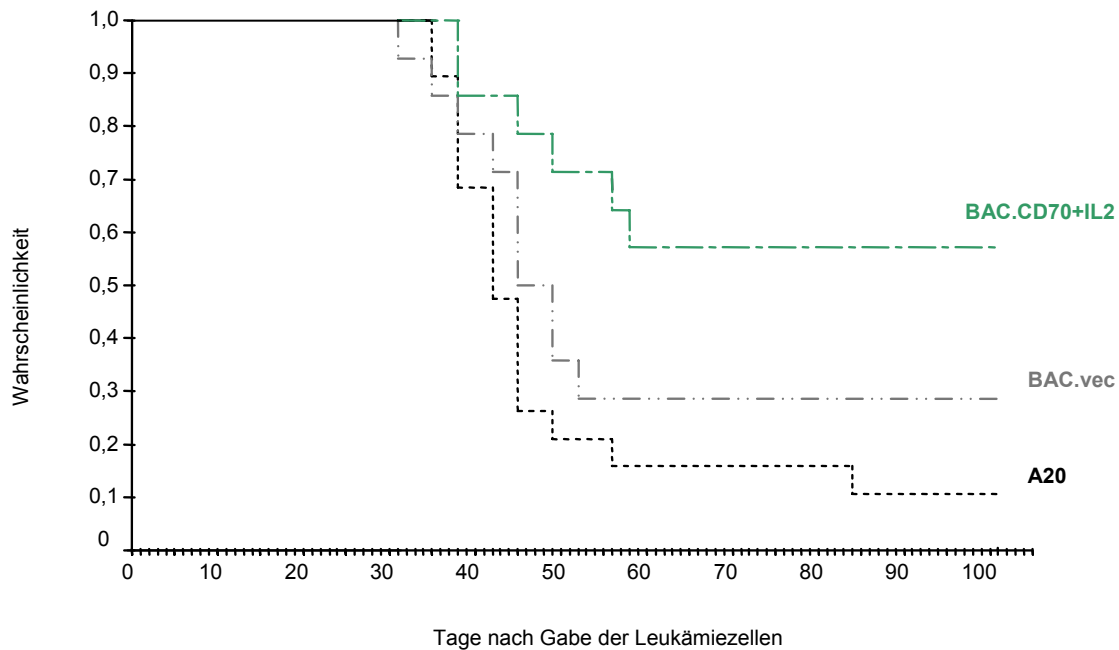


Abb. 4.26: Das Langzeitüberleben nach Gabe von genetisch modifizierten Vakzinezellen

Die Vakzinezellen wurden vor der Vakzinegabe mit (BAC.vec bzw. BAC.CD70+IL-2) transduziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten bestrahlte aber nicht transduzierte A20 Zellen. Die Ergebnisse sind in Form einer Kaplan-Meier-Schätzung dargestellt und basieren auf den in der Abbildung 4.23 dargestellten Daten. Die Linien repräsentieren die Überlebenswahrscheinlichkeit in den entsprechenden Versuchsgruppen.

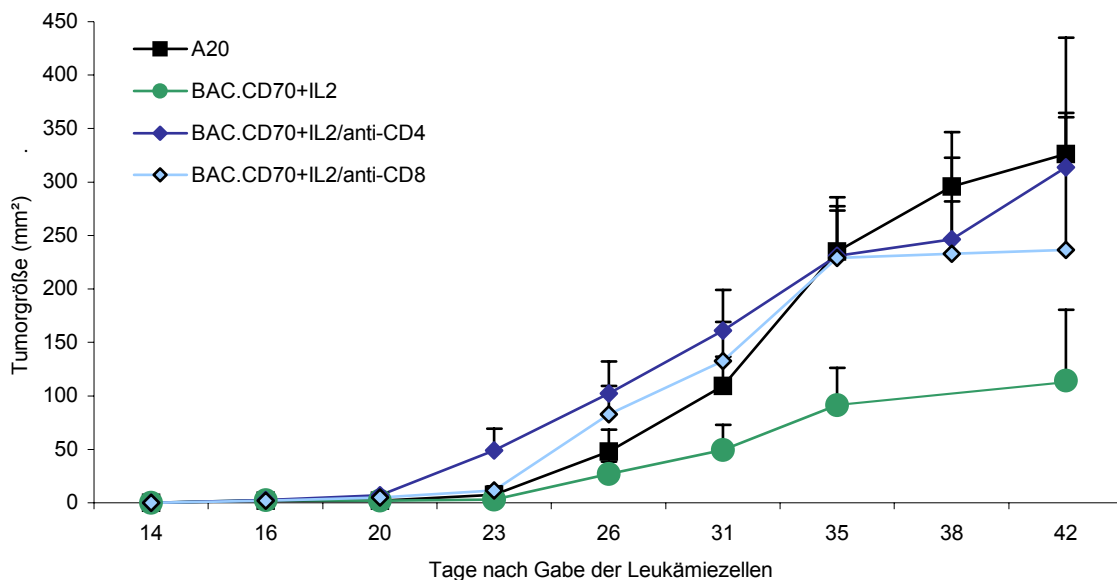


Abb. 4.27: Der Verlauf des Tumorwachstums in der Vakzinegruppe im Vergleich zu der A20-Kontrollgruppe und den beiden Depletionsgruppen

Die dargestellten Ergebnisse stammen aus einem Experiment mit 6-8 Mäusen pro Versuchsgruppe. Die Mäuse erhielten zuerst eine Tumorgabe mit A20 Zellen, gefolgt von 2 Vakzinegaben an Tag 4 und 14. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten nicht transduzierte aber bestrahlte A20 Zellen, während die Tiere der andern Gruppen

mit BAC.CD70+IL-2 transduzierte Vakzinezellen bekamen. Den Mäuse der Depletionsgruppen wurden zusätzlich 1 x wöchentlich T-Zell-spezifische monoklonale Antikörpern (anti-CD4 und anti-CD8) zur in vivo Depletion intraperitoneal injiziert.

Die Gabe von CD70 + IL-2 exprimierenden Vakzinezellen nach Transduktion der Zellen mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren führte zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Reduktion des Tumorwachstums. Das Langzeitüberleben konnte durch die Kombinationsvakzine ebenfalls signifikant ($p < 0,03$) verbessert werden mit Überlebensraten von 57% an Tag 100 nach Gabe der Leukämie-*Challenge*, verglichen mit Überlebensraten von 10% in der Kontrollgruppe. Die Vakzination mit BAC.vec hingegen zeigte ein ähnliches Tumorwachstum wie die Kontrollgruppe und auch das Langzeitüberleben konnte nicht verbessert werden.

Während das Tumorwachstum durch die Gabe der Kombinationsvakzine in der entsprechenden Versuchsgruppe signifikant reduziert werden konnte, wurde dieser antineoplastische Effekt durch die in vivo Depletion mit monoklonalen Antikörpern unterbunden. So zeigte sich trotz verabreichter Kombinationsvakzine ein mit der Kontrollgruppe identisches Tumorwachstum (Abb. 4.27).

5. Diskussion

Der erfolgreiche Einsatz von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zur Herstellung einer Leukämievakzine – ein wichtiger Schritt zur Weiterentwicklung dieses neuen immuntherapeutischen Ansatzes zur Behandlung der akuten Leukämie.

Die Entwicklung immunmodulatorischer Therapieansätze als ergänzende Behandlung für Patienten mit therapie-refraktären Leukämien, die mit den heute gängigen Therapien keine Vollremission erreichen bzw. ein Rezidiv erleiden, ist eines der führenden Ziele der aktuellen Forschung. In der vorliegenden Arbeit wurde eine auf leukämischen Blasten basierende Leukämievakzine entwickelt. Dazu wurden aus Leukämiezellen durch genetische Modifikation Vakzinezellen generiert, deren antigenpräsentierende sowie immunstimulatorische Kapazität über die transgene Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 und des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 verbessert werden sollte. Primäre Blasten der akuten Leukämie proliferieren *in vitro* nur wenig bzw. gar nicht. Da HSV auch in der Lage ist, nicht-mitotische Zellen zu infizieren haben sich zur genetischen Modifikation dieser Zellen in den letzten Jahren auf Herpes simplex Virus basierende Vektoren als ein attraktives Gentransfersystem erwiesen. Während bisher etablierte Vektorsysteme auf der Basis von Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren generiert wurden, ist neuerdings auch der Einsatz von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren möglich. Die Transduktion mit beiden auf HSV-basierenden Vektorsystemen führt in den Zielzellen zu einer transienten Genexpression, die aber für einen immunstimulatorischen Effekt der genetisch modifizierten Vakzinezellen ausreichend sein sollte. Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit nun die vergleichende Bewertung der Transgenexpression in Relation zur Zielzelltoxizität und Immunogenität nach Transduktion mit Helfervirus-freien und Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren durchgeführt werden. Dieser zunächst *in vitro* erhobene Vergleich der beiden Amplikonsysteme zeigte nach Transduktion der murinen Modellzelllinie A20 (murine PräB-Leukämie als Modell für die ALL) mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren eine gleich hohe Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 wie nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren. Gleichzeitig konnte nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren eine signifikant niedrigere Zielzelltoxizität im Vergleich zum Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem nachgewiesen werden. Dies war nicht nur unmittelbar nach der Transduktion, sondern auch langfristig der Fall (s. Abb. 4.20a/b). Die Betrachtung der Anzahl lebender, transgentragender Zellen nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren zeigt, dass die Zellen im Verlauf schnell

absterben (siehe Abb. 4.21). Die Abnahme der lebenden, transgentragenden Zellen nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren (siehe Abb. 4.22) hingegen ist jedoch weniger durch die Zytotoxizität bedingt, als v.a. durch die transiente Genexpression zu erklären. Da das Transgen nicht an die Tochterzelle weitergegeben werden kann, kommt es mit zunehmender Zellproliferation zu einer relativen Abnahme des Transgens.

Es stellt sich jedoch die Frage, ob die vermehrte Zellproliferation nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren *in vivo* einen Vorteil darstellt, denn dadurch bedingt liegt ein großer Anteil nicht-immunogener Zellen vor. Diese Zellen können hinsichtlich einer T-Zellantwort zur Induktion von Anergie führen, da sie keine kostimulatorischen Faktoren exprimieren. Eine weiterführende Betrachtung dieser Frage sollte im Rahmen der Überprüfung der Leukämievakzine *in vivo* im murinen A20-Mausmodell erfolgen.

Wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, führt die Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zu einer im Vergleich zum Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem signifikant niedrigeren Zytotoxizität. Eine Erklärung ist, dass bei der Herstellung dieser neuen Generation von auf Herpes simplex Virus Typ-1 basierenden Amplikonvektoren keine Helferviren eingesetzt werden. Die Rolle der Helferviren wird durch die Ko-Transfektion des transgentragenden Amplikonplasmids mit einem artifiziellen bakteriellen Chromosom (BAC) ersetzt. Dieses Konstrukt stellt die erforderlichen HSV-1 Proteine *in trans* bereit (Saeki et al., 2001 & 1998; Horsburgh et al., 1999; Stavropoulos et al., 1998). Im Fall des Helfervirus-abhängigen Vektorsystems hingegen entstehen im Ergebnis der Vektorpräparation neben den Amplikonvektoren unterschiedliche Mengen an „leeren“ Helferviruspartikeln, die zwar nicht das Transgen tragen, aber dennoch in der Lage sind, virale Proteine zu exprimieren (DeLuca et al., 1985). Bisher wurden v.a. die Expression herpesviraler Proteine für die erhöhte Zytotoxizität verantwortlich gemacht (Fraefel et al., 2000; Yoshinaga et al., 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließ sich aufzeigen, dass die Expression herpesviraler Proteine in der Zielzelle zwar zur Zytotoxizität beiträgt, ein hoher Teil der Zielzelltoxizität jedoch durch subzelluläre Zellpartikel bedingt ist, die bei der Lyse der Verpackungszellen entstehen. Eine Entfernung der subzellulären Zellpartikel mittels Ultraschallbehandlung oder Reinigung der Amplikonsuspension über einen Filter führt, wie in dieser Arbeit belegt werden konnte, mindestens zu einer Halbierung der Zytotoxizität, bei gleichbleibender Transduktionseffizienz.

So ist die niedrigere Zielzelltoxizität von nur etwa 10% nach Transduktion der murinen Modelzelllinie A20 mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren sowohl auf ein Fehlen herpesviraler Proteinexpression, als auch auf die Abwesenheit von zelltoxischen subzellulären Komponenten in der Vektorpräparation zu erklären. Dies ist darauf

zurückzuführen, dass bei der Herstellung von Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren eine zweimalige Zellyse notwendig ist (s. Material und Methoden), während bei der Herstellung der neuen Generation von auf HSV-1 basierenden Amplikonvektoren ein Präparationsschritt mit nachfolgender Zellyse eingespart werden kann. Dieser Aspekt stellt dementsprechend einen weiteren Vorteil im Vergleich zum Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem dar.

Im Hinblick auf die Entwicklung einer Leukämievakzine für die zukünftige klinische Anwendung wurden verschiedene humane Leukämie-/Lymphomzelllinien und primäre leukämische Blasten hinsichtlich der Transgenexpression und der Zytotoxizität nach herpesviraler Transduktion untersucht. Das Prinzip des Gentransfers mittels viraler Vektoren besteht darin, sich der Hülle und damit dem Eindringmechanismus des Wildtypvirus zu bedienen, um fremde DNA in die Zielzellen zu befördern. Entscheidend für die Einschleusung von Herpes simplex Viren in die Zellen sind, neben anderen Oberflächenmolekülen, vor allem sogenannte Herpesviruseingangsmotoren (Hve), wobei HveA, HveB und HveC unterschieden werden. HSV Typ-1 scheinen dabei bevorzugt HveA und HveC zur Einschleusung zu verwenden, während die meisten HSV Typ-2 sich des HveB bedienen (Frampton et al., 2005; Geraghty et al., 1998; Mauri et al., 1998; Warner et al., 1998; Montgomery et al., 1996). Bisher konnte gezeigt werden, dass HveA beispielsweise auf B-Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) (Eling et al., 2000) und HveB auf humanen Keratinozyten sowie primären aktivierten T-Lymphozyten (Warner et al., 1998) exprimiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmalig nachgewiesen werden, dass die in den Transduktionsexperimenten verwendeten humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien AD, Daudi, Jurkat und HL60 jeweils alle drei Hve-Rezeptoren zu gleichen Anteilen besitzen. Dies trifft insbesondere auch für HveA und HveC zu, die primär zur Einschleusung von auf HSV-1 basierenden Amplikonvektoren notwendig sind. Die Untersuchung primärer leukämischer Blasten humaner Prä-B- bzw. c-ALLs zeigte vergleichbare Ergebnisse, wobei eine tendenziell höhere Expression des HveB gemessen werden konnte (siehe Abb. 4.17). Aufgrund dieser Ergebnisse schienen Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren prädestiniert für den Gentransfer in die vorgenannten Zellen zu sein.

Nach Transduktion der lymphoblastischen Zelllinien AD (Prä-B-ALL), Daudi (Burkitt-Lymphom) und Jurkat (T-Zell-Leukämie), sowie der myeloischen Zelllinie HL60 (humane AML) mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren konnte eine Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 von ca. 80% erzielt werden (siehe Abb. 4.10). Damit wurde eine gleich hohe Transgenexpression wie nach Transduktion der murinen Modellzelllinie A20, die sowohl zur Titrierung der Vektorpräparationen diente, als

auch später in einem Mausmodell eingesetzt werden sollte, erreicht. Die eingesetzte Menge an Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren lag dabei nur doppelt so hoch wie bei den murinen Zellen, obwohl diese eine deutlich höhere Permissivität besitzen als humane Zellen. Im Vergleich zur Transduktion der vorgenannten Zelllinien mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren einer äquivalenten TU, welche einer MOI = 20 im Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem entsprach, konnte, in Abhängigkeit von der Zelllinie, nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren eine bis zu 4-fach höhere Transgenexpression gemessen werden. Dabei war die Zytotoxizität nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Amplikonvektoren deutlich niedriger bzw. vergleichbar mit der im Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem (Zibert et al., nicht veröffentlichte Daten).

Die Transduktion von primären leukämischen Blasten mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zeigte eine große Varianz in Bezug auf die CD70 Expression (5% - 57%) bei einer hohen Zytotoxizität. Trotzdem konnte durch diese Experimente erstmals der Beweis erbracht werden, dass Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren in der Lage sind genetisches Material in primäre humane Leukämiezellen einzuschleusen, denn diese Zellen haben sich in der Vergangenheit häufig als resistent gegenüber der Transduktion mit klinisch zugelassenen Vektoren erwiesen (Stripecke et al., 2000; Mascarenhas et al., 1998). Daher ist der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer erfolgreichen Transduktion von primären humanen leukämischen Blasten mit Hilfe von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren ein wichtiger Schritt in Richtung auf die Herstellung einer effizienten Leukämievakzine für die klinische Anwendung.

Da für die *in vivo* Überprüfung der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Leukämievakzine eine Kombinationsvakzine eingesetzt werden sollte, wurden zunächst *in vitro* nicht nur die Expressionsraten des immunmodulatorischen Moleküls CD70 nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen bzw. Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren untersucht, sondern auch die Sekretion des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2. Dieser spielt eine Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort.

Allgemein konnte gezeigt werden, dass nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren 24h p.t. sowohl in der murinen Modellzelllinie A20 wie auch in verschiedenen humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien eine gleich hohe IL-2 Sekretionsrate wie nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren erzielt werden konnte (siehe Abb. 4.13 bis 4.15 und Abb. 4.23). Die Betrachtung der IL-2 Sekretion über einen längeren Zeitraum zeigte jedoch Unterschiede in der Höhe der messbaren IL-2-Konzentration zwischen den unterschiedlichen Zelllinien und eingesetzten Amplikonvektoren. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Transgenexpression einerseits abhängig ist von der

Permissivität einer Zelle, die v.a. durch die Anwesenheit bzw. Dichte bestimmter Entry-Rezeptoren (Hve) auf der Zelloberfläche bestimmt ist, die ein Eindringen des Amplikonvektors in die Zelle ermöglichen. Andererseits ist sie, insbesondere bei nicht integrierenden Vektorsystemen, von der Proliferationskapazität einer Zielzelle abhängig. So kann bei gleicher Transgeneffizienz, definiert als die Anzahl von Konkameren des Amplikonplasmids, die in die Zielzelle gelangen, bei unterschiedlich schneller Proliferation verschiedener Zielzellen eine unterschiedlich hohe Transgenexpression resultieren. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang natürlich auch die Verpackungseffizienz des Vektorsystems und es ist zu beachten, dass eine unbekannte Menge von verpackten Konkameren des Amplikonplasmids pro Amplikonpartikel vorliegt.

Die nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen bzw. Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren beobachteten Ergebnisse resultieren daher am ehesten aus einem komplexen Zusammenwirken der dargestellten Einflussfaktoren. Abschließend bleibt jedoch festzuhalten, dass nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren eine gleich gute Sekretion des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 wie nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen Amplikonvektoren gemessen werden konnte.

Die Herstellung einer Leukämievakzine durch transgene Expression immunmodulatorischer Moleküle auf leukämischen Lymphoblasten war das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit. Zur genetischen Modifikation der Leukämiezellen wurden Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren eingesetzt. Bei dieser neuen Generation von auf HSV-1 basierenden Vektoren handelt es sich, wie bei den Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren, um replikationsdefekte HSV-1 Vektoren. Durch die Deletion bestimmter essentieller Replikationsgene wird eine Replikation bzw. die Bildung von Wildtypviren im Wirtsorganismus und damit eine systemische HSV-Infektion verhindert.

Die Wirksamkeit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Leukämievakzine hinsichtlich der Induktion einer antileukämischen Immunantwort wurde am A20-Mausmodell überprüft. Dabei handelt es sich um ein Behandlungsmodell, das die Situation bei bestehender Resterkrankung nachstellt, d.h. zuerst wurden den Tieren murine Leukämiezellen (A20 Zellen) appliziert, die zur Entstehung einer soliden lymphoblastischen Tumormasse führten. In einem zweiten Schritt wurden dann die Vakzinezellen verabreicht, um zu überprüfen, ob durch die Stimulation einer antileukämischen Immunantwort das Auswachsen der Leukämie bzw. des lymphoblastischen Tumors verhindert werden konnte.

Im Vergleich zu vielen soliden Tumoren, bei denen das Vorkommen von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche stark reduziert ist oder völlig fehlt, exprimieren Leukämiezellen viele MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Aufgrund von fehlenden oder nur wenigen exprimierten kostimulatorischen Signalen kommt es dennoch meistens nicht zu einer protektiven

antileukämischen Immunantwort. Ohne kostimulatorische Signale kann der Kontakt der T-Zelle mit dem Antigen sogar die Induktion von Anergie seitens der T-Zelle zur Folge haben (Chambers et al., 2001; Alexandroff et al., 2000). Die murine Prä-B lymphoblastische Zelllinie A20, die im Rahmen des gewählten Mausmodells als Modell für die ALL eingesetzt wurde, trägt dementsprechend, genau wie humane B-ALLs, auf ihrer Oberfläche normalerweise nur sehr geringe Mengen an kostimulatorischen Molekülen (Guinn et al., 1999; Trentin et al., 1997; Tsukada et al., 1997;). Über die genetische Modifikation der A20 Zellen *in vitro* durch Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren sollten Vakzinezellen generiert werden, die *in vivo* kostimulatorische Moleküle exprimieren und so eine protektive antileukämische Immunantwort induzieren sollten. Wie in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, führte bei schnell proliferierenden B-Zell Erkrankungen eine Kombination von mehreren immunmodulatorischen Molekülen zu einer größeren Effektivität der Leukämievakzine (Vereecque R. et al., 2000; Zibert et al., 2000; Stripecke R. et al., 1999; Nakazaki Y. et al., 1998; Dunussi-Joannopoulos et al., 1997; Dilloo D. et al., 1996). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombinationsvakzine mit einer gleichzeitigen Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 und des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 eingesetzt. Das kostimulatorische T-Zell Molekül CD70, bei dem es sich um ein Mitglied der TNF Familie handelt (Hintzen et al., 1994; Goodwin et al., 1993), ist entscheidend an der B-Zell-T-Zell-Interaktion beteiligt. Wie CD80 stimuliert es die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen sowie die Produktion von inflammatorischen T-Zell Zytokinen (Brown et al., 1995; Hintzen et al., 1995 Kobata et al., 1994). Vor allem aber stimuliert es zusätzlich die Ausbildung von T-Gedächtniszellen (Borst et al., 2005; Kazuyoshi Takeda et al., 2000) und ist essentiell für die Expansion von CD8⁺ T-Zellen, sowohl bei der Primärantwort als auch insbesondere bei einem neuerlichen Antigenkontakt (Taraban et al., 2004). Das Zytokin IL-2 führt zu einer zusätzlichen Verstärkung der Aktivierung von natürlichen Killerzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass die Gabe von CD70+IL-2 exprimierenden Vakzinezellen nach Transduktion von A20 Zellen mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Reduktion des Tumorwachstums führte. Auch das Langzeitüberleben konnte durch die Kombinationsvakzine signifikant ($p < 0,03$) verbessert werden mit Überlebensraten von 57% an Tag 100 nach Gabe der Leukämiezellen. In der Kontrollgruppe wurden an Tag 100 nur noch Überlebensraten von 10% erreicht. Verglichen mit bereits vorliegenden Daten nach Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren zeigte die neue Generation von auf HSV-1 basierenden Vektoren demnach eine vergleichbar gute Effizienz der Kombinationsvakzine (Zibert et al., 2005).

Zudem konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die durch die Kombinationsvakzine bedingte antileukämische Immunantwort über eine Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen stattfindet. Tiere, die vor Gabe der Leukämiezellen und dann in wöchentlichen Abständen eine Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erhielten, zeigten trotz der erhaltenen Kombinationsvakzine ein mit der Kontrollgruppe identisches Wachstum des lymphoblastischen Tumors.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, inwieweit bereits der Vektor an sich zur Induktion einer antileukämischen Immunantwort beiträgt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden A20 Zellen mit einem „leeren“ Helfervirus-freien Vektor (BAC.vec) transduziert, der keine immunmodulatorischen Moleküle trug. Tiere, die diese Vakzinezellen erhielten, zeigten ein leicht verlangsamtes Tumorwachstum jedoch kein verbessertes Langzeitüberleben im Vergleich zur Kontrollgruppe. Entsprechende bereits vorhandene Untersuchungen zu Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren hingegen zeigten für einen „leeren“ Helfervirus-abhängigen Vektor (HSV.vec) eine vergleichbar protektive Wirkung wie für die auf Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren basierenden Kombinationsvakzine mit CD70+IL-2 exprimierenden Vakzinezellen (Zibert et al., 2005). Erklärbar sind diese Ergebnisse durch immunogen wirkende HSV-Proteine, die von Vakzinezellen exprimiert werden, welche zuvor mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren transduziert wurden (Matzinger P.,1998) und zur Induktion von *cross-priming* Effekten führen. Dabei kommt es zur Präsentation von exogenen Antigenen, wie beispielsweise Fragmenten abgestorbener leukämischer Zellen, auf professionellen APZ und nachfolgend zur Induktion einer antileukämischen T-Zell-Antwort. Neben diesem positiven Effekt hinsichtlich der Stimulation einer antileukämischen Immunantwort birgt die Expression von herpesviralen Proteinen jedoch auch immer das Risiko der Induktion nicht absehbarer Nebenwirkungen für den Wirtsorganismus. Daher bietet der Einsatz Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren zur Generierung von Vakzinezellen für eine Leukämievakzine mehrere Vorteile. Einerseits ist alleine durch die Gabe von CD70+IL-2 exprimierenden Vakzinezellen nach Transduktion von A20 Zellen mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren die Stimulation einer protektiven antileukämischen Immunantwort möglich. Andererseits besteht ein geringeres Risiko zur Ausbildung von Nebenwirkungen im Wirtsorganismus, da kaum immunogen wirkende herpesvirale Proteine exprimiert werden. Darüber hinaus bietet das Helfervirus-freie Amplikonsystem die Möglichkeit die Effektivität immunmodulatorischer Moleküle gezielt zu testen, da Störfaktoren wie die Induktion von sowohl immunstimulierenden als auch immunsupprimierenden Effekten wegfallen.

Nach Transduktion von A20 Zellen mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zeigte sich *in vitro*, wie eingangs dargestellt, im Verlauf mehrer Tage eine zunehmende Proliferation der A20 Zellen. Dadurch bedingt lag ein hoher Anteil nicht-immunogener Zellen vor, die in

Bezug auf eine T-Zellantwort die Induktion von Anergie zur Folge haben können. Wie die Ergebnisse der *in vivo* Überprüfung der entwickelten Leukämievakzine im murinen A20-Mausmodell hinsichtlich des Tumorwachstums und des Langzeitüberlebens belegen, führt die Vakzine nicht zur Induktion einer generalisierten Anergie, sondern zu einer T-Zell abhängigen antileukämischen Immunantwort.

Zusammenfassend bietet die neue Generation HSV-1 basierter Amplikonvektoren erstens die Möglichkeit zur Herstellung einer Amplikonsuspension, die weniger subzelluläre Zellpartikel enthält. Denn durch die direkte Ko-Transfektion des transgtragenden Amplikonplasmids mit einem artifiziellem bakteriellen Chromosom (BAC) lässt sich im Vergleich zum Helfervirus-abhängigen Amplikonsystem ein Präparationsschritt mit nachfolgender Zellyse einsparen. Zweitens entsteht eine Amplikonsuspension, die keine „leeren“ Helferviruspartikeln im Ergebnis der Vektorpräparation enthält, die herpesvirale Proteine exprimieren. Beides ist im Hinblick auf die Reduktion der Zytotoxizität von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch die Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren *in vitro* eine hohe Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD70 bei einer geringen Zielzelltoxizität in den untersuchten humanen und murinen Leukämiezelllinien erreicht werden konnte. Auch eine ausreichend hohe Sekretion des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 konnte mittels Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Zudem wurde erstmalig der Beweis erbracht, dass primäre leukämische Blasten mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren erfolgreich transduziert werden können, denn diese Zellen haben sich in der Vergangenheit häufig als resistent gegenüber der Transduktion mit den bisher klinisch zugelassenen Vektoren erwiesen.

In der *in vivo* Überprüfung hinsichtlich der Wirksamkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Leukämievakzine im A20 Mausmodell konnte durch Vakzinezellen, die zuvor mittels Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren genetisch modifiziert wurden durch die alleinige Ko-Expression der immunmodulatorischen Moleküle CD70 und IL-2 eine protektive antileukämische Immunantwort induziert werden.

Der erfolgreiche Einsatz von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zur Herstellung einer Leukämievakzine – ein wichtiger Schritt zur Weiterentwicklung dieses neuen immuntherapeutischen Ansatzes zur Behandlung der akuten Leukämie!

6. Literaturverzeichnis

Adida C., Crotty P.L., McGrath J., Berrebi D., Diebold J., Altieri D.C. (1998). Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am. J. Pathol.* **152**,43

Agematsu K., Kobata T., Sugita K., Freeman G. J., Beckmann M. P., Schlossman S. F., and Morimoto C. (1994). Role of CD27 in T cell immune response. Analysis by recombinant soluble CD27. *J.Immunol.* **153**,1421-1429

Agematsu K., Nagumo H., Oguchi Y., Nakazawa T., Fukushima K., Yasui K., Ito S., Kobata T., Morimoto C., and Komiyama A. (1998). Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. *Blood.* **91**,173-180

Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H., and Komiyama A. (2000). CD27: a memory B-cell marker. *Immunol.Today.* **21**,204-206

Alexandroff A.B., Jackson A.M., Paterson T., Haley J.L., Ross J.A., Longo D.L., Murphy W.J., James K and Taub D.D. (2000). Role for CD40 – CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol. Immunol.* **37**,515-526

Arai J., Yasukawa M., Ohnishi H., Kakimoto M., Hasegawa A., Fujita S. (2001). Identification of telomerase reverse transcriptase derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* **97**,2903

Arens R., Schepers K., Nolte M.A., van Oosterwijk M.F., van Lier R.A., Schumacher T.N., van Oers M.H. (2004). Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8⁺ T cell formation. *J Exp Med.* **199(11)**,1595-605

Bazan, J.F. (1992). Unravling the structure of IL-2. *Science.* **257**,410-413

Bender F.C., Whitbeck J.C., Lou H., Cohen G.H., Eisenberg R.J. (2005). Herpes simplex virus glycoprotein B binds to cell surfaces independently of heparan sulfate and blocks virus entry. *J Virol.* **79(18)**,11588-97

Blachère Nathalie E. et al. (2006). IL-2 Is Required for the Activation of Memory CD8⁺ T Cells via Antigen Cross-Presentation. *The Journal of Immunology.* **176(12)**,7288-300

Borst J., Hendriks J., Xiao Y. (2005). CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol.* **17(3)**,275-81

Brown G.R., Meek K., Nishioka Y., Thiele D.L. (1995). CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced proliferation and cytolytic activity in CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol.* **154**,3686-3695

Bullock T.N., Yagita H. (2005). Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8⁺ T cell responses in the absence of CD4⁺ T cells. *J Immunol.* **174(2)**, 710-7

Burmester G.-R., Pezzetto A. (1998). Taschenatlas der Immunologie, Kapitel Tumorimmunologie, Georg Thieme Verlag

- Cardoso A.A., Veiga J.P., Ghia P., Afonso H.M., Haining W.N., Sallan S.E., Nadler L.M.** (1999). Adoptive T-cell therapy for B-cell acute lymphoblastic leukemia: preclinical studies. *Blood*. **94(10)**,3531-40
- Chambers C.A., Kuhns M.S., Egen J.G. and Allison J.P.** (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* **19**,565-594
- Creutzig U., Henze G., Bielack S., Herold R., Kaatsch P., Klussmann J.-H., Graf N., Reinhardt D., Schrappe M., Zimmermann, M. und Jürgens H.** (2003). Krebserkrankungen bei Kindern: Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren. *Deutsches Ärzteblatt* **100** **13**,A-842/B-712/C-665
- Daubenberger C.** Start Sonderheft Immunologie `97. Die Funktion der T-Zellen. Herausgeber: *Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH*
- DeLuca N.A., McCarthy A.M. and Schaffer P.A.** (1985). Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J Virol.* **56**,558-570
- Dilloo D. et al.** (1996). Combined chemokine and cytokine gene transfer enhances antitumor immunity. *Nat Med.* **2**,1090-1095
- Dilloo D et al.** (1997). A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood.* **89**,119-127
- Dunussi-Joannopoulos K., Weinstein H.J., Arceci R.J., Croop J.M.** (1997). Gene therapy with B7.1 and GM-CSF vaccines in a murine AML model. *J Pediatr Hematol.* **19**,536-540.
- Durkop H., Anagnostopoulos I., Bulfone-Paus S., Stein H.** (1997). Expression of several members of the TNF-ligand and receptor family on tonsillar lymphoid B cells. *Br J Haematol.* **98(4)**,863-8
- Eling D.J., Johnson P.A., Sharma S., Tufaro F., Kipps T.J.** (2000). Chronic lymphocytic leukemia B cells are highly sensitive to infection by herpes simplex virus-1 via herpesvirus-entry-mediator A. *Gene Ther.* **7(14)**,1210-6
- Fehervari Z., Yamaguchi T., Sakaguchi S.** (2006). The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity. *Trends Immunol.* **27(3)**,109-11
- Foreman N.k., Rill D.R., Coustan-Smith E., Douglass E.C. and Brenner M.K.** (1993). Mechanisms of selective killing of neuroblastoma cells by natural killer cells and lymphokine activated killer cells. Potential for residual disease eradication. *Br J Cancer.* **67**,933-938
- Fraefel C., Jacoby D.R., Lage C., Hilderbrand H., Chou J.Y., Alt F.W., Breakefield X.O. and Majzoub J.A.** (1997). Gene transfer into hepatocytes mediated by helper virus-free HSV/AAV hybrid vectors. *Mol Med.* **3**,813-825
- Fraefel C., Jacoby D.R. and Breakefield X.O.** (2000). Herpes simplex virus type 1-based amplicon vector systems. *Adv Virus Res.* **55**,425-51
- Frampton et al.** (2005). Equine Herpesvirus 1 Utilizes a Novel Herpesvirus Entry Receptor. *J Virol.* **79(5)**,3169-3173

- Geller A.I., Breakefield X.O.** (1988). A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science*. **241**,1667-1669
- Gemsa D., Kalden J.R., Resch K.** (1997). Immunologie. Kapitel 11 Tumoren: Entstehung, Metastasierung und immunologische Abwehrmechanismen, 4. neuüberarbeitete und erweiterte Auflage, *Georg Thieme Verlag*
- Geraghty R.J. et al.** (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science*. **280**,1618-1620
- Glorioso J.C., Mata M., Fink D.J.** (2003). Therapeutic gene transfer to the nervous system using viral vectors. *J Neurovirol.* **9**,165-172
- Goodwin R.G. et al.** (1993). Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell*. **73**,447-456
- Gottlieb D.J., Prentice H.G., Heslop H.E., Bello-Fernandez C., Bianchi A.C., Glazka A.R., and Brenner M.K.** (1989). Effects of recombinant Interleukin 2 administration on cytotoxic function following high dose chemo-radiotherapie for haematological malignancy. *Blood*. **74**, 2335-2342
- Guinn B.A., DeBenedette M.A., Watts T.H., Berinstein N.L.** (1999). 4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine. *J Immunol.* **162**,5003-5010
- Hendriks, J., Gravestien, L. A., Tesselaar, K., van Lier, R. A., Schumacher, T. N., and Borst, J.** (2000). CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat.Immunol.* **1**,433-440
- Handgretinger R. Bruchelt G., Kimming A., Dopler R., Niethammer D. and Treuner J.** (1989). In vitro induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in patients with neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol.* **6**,307-317
- Herold B.C. et al.** (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol.* **75 (Pt 6)**,1211-1222
- He L., Feng H., Raymond A., Kreeger M., Zeng Y., Graner M., Whitesell L., Katsanis E.** (2001). Dendritic cell peptide immunization provides immunoprotection against bcr-abl-positive leukemia in mice. *Cancer Immunother.* **50**,31
- Hintzen R.Q. et al.** (1994). Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of the TNF gene family. *J Immunol.* **152**,1762-1773
- Hintzen R.Q., Lens S.M., Koopman G., Pals S.T., Spits H., van Lier R.A.** (1994). CD70 represents the human ligand for CD27. *Int Immunol.* **6(3)**,477-80
- Hintzen R.Q. et al.** (1995). Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol.* **154**,2612-2623
- Holler E., Kolb H.J., Mittermüller J., Kaul M., Ledderose G., Duell Th., Seeber B., Schleuning M., Hintermeier-Knabe R., Ertl B., Kempeni J., Wilmans W.** (1995) Modulation of acute Graft-versus-host- disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor α (TNF α) release in the course of pretransplant conditioning :Role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF α (MAK 195F). *Blood*. **86 (3)**,890-899.

- Horsburgh B.C. et al.** (1999). Allele replacement: an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther.* **6**,922-930
- Isomaki P., Clark J.M., Panesar M., Cope A.P.** (2005). Pathways of T cell activation and terminal differentiation in chronic inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* **4**(3),287-93.
- Jacquot, S., Kobata, T., Iwata, S., Morimoto, C., and Schlossman, S. F.** (1997). CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J.Immunol.* **159**,2652-2657
- Johnson P.A., Miyanochara A., Levine F., Cahill T., Friedmann T.** (1992). Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* **66**,2952-2965
- Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M.** (1998). Medizinische Mikrobiologie, Kapitel 2: Grundlagen der Immunologie, 9. überarbeitete und neugestaltete Auflage. *Georg Thieme Verlag*
- Kazuyoshi T., Hideo O., Hayakawa Y., Hisaya A., Atsuta M., Kobata T., Kobayashi K., Yagita M.I.H. and Okumura K.** (2000). CD27-Mediated Activation of Murine NK Cells. *The Journal of Immunology.* **164**,1741-1745
- Kobata T. et al.** (1994). CD27 is a signal-transducing molecule involved in CD45RA⁺ naive T cell costimulation. *J Immunol.* **153**,5422-5432
- Kobata T., Jacquot S., Kozlowski S., Agematsu K., Schlossman S. F., and Morimoto C.** (1995). CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**,11249-11253
- Kolb H.-J., Schmidt Ch., Barret J.A., Schendel D.J.** (2004). Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood.* **103**(3),767-776.
- Kutubuddin M. et al.** (1999). Eradication of pre-established lymphoma using herpes simplex virus amplicon vectors. *Blood.* **93**,643-654
- Le Bon A. et al.** (2006). Direct Stimulation of T Cells by Type I IFN Enhances the CD8⁺ T Cell Response during Cross-Priming. *The Journal of Immunology.* **176**(8),4682-9
- Mascarenhas L., Stripecke R., Case S.S., Xu D., Weinberg K.I., Kohn D.B.** (1998). Gene delivery to human B-precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood.* **92**,3537-3545
- Matzinger P.** (1998). An innate sense of danger. *Semin Immunol.* **10**,399-415
- Mauri D.N. et al.** (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity.* **8**,21-30
- Minev B., Hipp J., Firat H., Schmidt J.D., Langlade-Demoyen P., Zanetti M.** (2000). Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**,4796
- Molldrem J.J., Lee P.P., Wang C., Champlin R.E., Davis M.M.** (1999). A PR1-human leukocyte antigen-A-2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **59**,2675

- Molldrem J.J., Lee P.P., Wang C., Felio K., Kantarjian H.M., Champlin R.E., Davis M.M.** (2000). Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* **6**,1018
- Montgomery R.I., Warner M.S., Lum B.J., Spear P.G.** (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.* **87**,427-436
- Moralic C., Ferec C.** (2006) Graft versus host disease. *Pathol Biol (Paris)*. **54(5)**, 304-308
- Morimoto, S., Kanno, Y., Tanaka, Y., Tokano, Y., Hashimoto, H., Jacquot, S., Morimoto, C., Schlossman, S. F., Yagita, H., Okumura, K., and Kobata, T.** (2000). CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. *J. Immunol.* **164**,4097-4104
- Nagumo, H. and Agematsu, K.** (1998). Synergistic augmentative effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interactions on B-cell immunoglobulin synthesis. *Immunology.* **94**,388-394
- Nagumo, H., Agematsu, K., Shinozaki, K., Hokibara, S., Ito, S., Takamoto, M., Nikaido, T., Yasui, K., Uehara, Y., Yachie, A., and Komiyama, A.** (1998). CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells. *J. Immunol.* **161**,6496-6502
- Nakazaki Y. et al.** (1998). Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine hematopoietic tumor cells and their cooperative enhancement of antitumor immunity. *Gene Ther.* **5**,1355-1362
- Oshimi K., Oshimi Y., Akutusu M., Takei Y., Saito H., Okada M. und Mizoguchi H.** (1986). Cytotoxicity of interleukin 2 activated lymphocytes for leukemia and lymphoma cells. *Blood.* **68**,938-948
- Roizman B., Knippe D.** (2001). Herpes simplex viruses and their replication. In: Knippe D, Howley R (eds). *Virology*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, Pa, 2001, pp. 2511-2574.
- Roskrow M.A., Zibert A., Souquet M., Dilloo D.** (1999). Tumor vaccines – application to childhood cancer. *Klin. Pädiatr.* **211**,336-346
- Saeki Y. et al.** (1998). 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.* **9**,2787-2794
- Saeki Y. et al.** (2001). Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Mol Ther.* **3(4)**,591-601
- Schrappé M., und Creutzig U.** (Zugriff 12/2005). Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter, *AWMF online* (<http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/025-014.htm>)
- Sena-Esteves M., Saeki Y., Fraefel C. and Breakefield X.O.** (2000). HSV-1 amplicon vectors – simplicity and versatility. *Mol Ther.* **2**,9-15
- Spaete R.R., Frenkel N.** (1982). The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. *Cell.* **30**,295-304

Spear P.G. et al. (1992). Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol.* **313**,341-353

Stavropoulos T.A., Strathdee C.A. (1998). An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J Virol.* **72**,7137-7143

Stripecke R. et al. (1999). Combination of CD80 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor coexpression by a leukemia cell vaccine: preclinical studies in a murine model recapitulating Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hum Gene Ther.* **10**,2109-2122

Stripecke R. et al. (2000). 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.* **96(4)**,1317-1326

Taraban V.Y., Rowley T.F. and Al-Shamkhani A. (2004). Cutting Edge: A Critical Role for CD70 in CD8 T Cell Priming by CD40-Licensed APCs. *J.Immunol.* **173**,6542-6546

Tolba K.A., Bowers W.J., Hilchey S.P., Haltermann M.W., Howard D.F., Giuliano R.E., Federoff H.J. and Rosenblatt J.D. (2001). Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **98**,287-295.

Trentin L. et al. (1997). B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules. *Cancer Res.* **57**,4940-4947

Troeger A., Meisel R., Moritz T. and Dilloo D. (2005). Immunotherapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – not just a case for effector cells. *Bone Marrow Transplantation.* **35**,59-64

Tsukada N. et al. (1997). The heterogeneous expression of CD80, CD86 and other adhesion molecules on leukemia and lymphoma cells and their induction by interferon. *J Exp Clin Cancer Res.* **16**,171-176

Verecque R. et al. (2000) Gene transfer of GM-CSF, CD80 and CD154 cDNA enhances survival in a murine model of acute leukemia with persistence of a minimal residual disease. *Gene Ther.* **7**,1312-1316

Wang Y., Mukherjee S., Fraefel C., Breakefield X.O. and Allen P.D. (2002). Herpes simplex virus type 1 amplicon vector-mediated gene transfer to muscle. *Hum Gene Ther.* **13**,261-273

Ward P.L. and Roizman B. (1994). Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen [published erratum appears in Trends Genet 1994 Oct;10(10):380]. *Trends Genet.* **10**,267-274

Warner M.S. et al. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology.* **246**,179-189

Wikipedia (Zugriff 11.2.2007). Graft-versus-Host-Reaktion und Graft-versus-Malignancy. (www.wikipedia.de/Graft-versus-Host-Reaktion.html)

Wikipedia (Zugriff 11.2.2007). Leukämie. (www.wikipedia.de/leukaemie.html)

WuDunn D., Spear P.G. (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol.* **63**,52-58

Yang F.C., Agematsu K., Nakazawa T., Mori T., Ito S., Kobata T., Morimoto C. and Komiyama A. (1996). CD27/CD70 interaction directly induces natural killer cell killing activity. *Immunology.* **88**,289-293

Yang F. and Yang X-F. (2005). New Concepts in Tumor Antigens: Their Significance in Future Immunotherapies for Tumors. *Cellular & Molecular Immunology.* **2(5)**,331-341

Yasukawa M. et al. (1998). CD4(+) cytotoxic T-cell clones specific for bcr-abl b3a2 fusion peptide augment colony formation by chronic myelogenous leukemia cells in a b3a2-specific and HLA-DR-restricted manner. *Blood.* **92**:3355

Yiallourous M., Misbach E. und Henze G. (Zugriff 20.11.2006). Akute lymphoblastische Leukämie (ALL). *kinderkrebsinfo.de* (http://www.kinderkrebsinfo.de/e9035/e9060/index_ger.html)

Yiallourous M., Herold R. und Creutzig U. (Zugriff 20.11.2006). Akute myeloische Leukämie (AML). *kinderkrebsinfo.de* (http://www.kinderkrebsinfo.de/e9035/e9060/index_ger.html)

Yoshinaga S. et al. (1998). 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. *Human Gene Therapie.* **9**,2787-2794

Zambello R., Trentin L., Facco M., Siviero M., Galvan S., Piazza F., Perin A., Agostini C., Semenzato G. (2000). Analysis of TNF-receptor and ligand superfamily molecules in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood.* **96(2)**,647-54

Zibert A. et al. (2000). Leukemia cells transduced with HSV-1 amplicons expressing CD70 and IL-2 stimulate a protective anti-leukemic immune response. *Blood.* **96**,804a

Zibert A., Thomassen A., Müller L., Nguyen L., Glouchkova L., Fraefel C., Roskrow M., Meisel R. and Dilloo D. (2005). Herpes simplex virus type-1 amplicon vectors for vaccine generation in acute lymphoblastic leukemia. *Gene Therapy.* **12(23)**,1707-1717

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
amp ^r	Antibiotikaresistenzgen gegen Ampicillin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
Aqua dest.	destillierte Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAC	bakterielles artifizielles Chromosom
bp	<i>base pair</i>
BSA	Albumine Bovine Serum
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium ²⁺
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>Fluorescence Activate Cell Sorter</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	<i>forward light scatter</i>
g	Gramm
G418	Geneticin 418
Gy	Gray
h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HSV	Herpes simplex Virus

Hve	<i>herpes virus entry mediator</i>
HPV 16	humanes Papillomavirus 16
IL-2	Interleukin-2
ICP	<i>infected cell protein</i>
kb	Kilobasen
LiCl	Lithiumchlorid
M	Mol
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
Mg ²⁺	Magnesium ²⁺
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
n	Anzahl
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ori	Replikationsursprung
pac	Verpackungssignal
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
p.t.	post transductionem
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s.	siehe
SD	Standardabweichung
sek.	Sekunde
s.o.	siehe oben
SSC	<i>sideward light scatter</i>
Strep	Streptomycin

s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tox	Toxizität / Zytotoxizität
TU	<i>Transducing unit</i>
TZR	T-Zellrezeptor
U	<i>unit</i>
u.U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
vhs	<i>virion host shutoff protein</i>
Vol.	Volumen
vs.	versus
v/v	Volumenprozent
ZPE	zytophatischer Effekt
z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

8. Zusammenfassung

Akute Leukämien sind bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems, die unbehandelt innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tod führen. Die Entwicklung immunmodulatorischer Therapieansätze als ergänzende Behandlung für Patienten mit therapie-refraktären Leukämien ist ein führendes Ziel der aktuellen Forschung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Eignungsprüfung von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren zur genetischen Modifikation von primären humanen Blasten im Rahmen der Generierung einer Leukämievakzine zur immuntherapeutischen Behandlung der ALL.

Hierzu wurden die immunstimulatorischen Moleküle CD70 und IL-2 mittels Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren *ex vivo* in Leukämiezellen eingebracht, um durch die transgene Expression dieser kostimulatorischen Signale die Immunogenität der Zellen so zu steigern, dass sie als Leukämievakzine zur Stimulation einer effektiven und leukämiespezifischen Immunantwort appliziert werden konnten.

In einem ersten Schritt wurden zunächst sowohl Helfervirus-abhängige HSV-1 Amplikonvektoren als auch Helfervirus-freie HSV-1 Amplikonvektoren hinsichtlich der nach Transduktion erzielten Transgenexpression und Zytotoxizität *in vitro* untersucht. Zu diesem Zweck wurden einerseits zur Wirksamkeitsprüfung der Vakzinationsstrategie im Mausmodell die murine Zelllinie A20 und andererseits im Hinblick auf eine spätere klinischen Anwendung auch unterschiedliche humane Zelllinien sowie primäre leukämische Blasten mit den verschiedenen Amplikonvektoren transduziert und die Expression des kostimulatorischen Oberflächemoleküls CD70 bzw. des Zytokins IL-2 sowie die Zytotoxizität bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren *in vitro* eine Expression des kostimulatorischen Oberflächemoleküls CD70 von ca. 80% bei einer geringeren oder ähnlich hohen Zielzelltoxizität im Vergleich zur Transduktion mit Helfervirus-abhängigen HSV-1 Amplikonvektoren in allen untersuchten humanen und murinen Leukämiezelllinien erreicht werden konnte. Auch eine ausreichend hohe Sekretion des löslichen immunmodulatorischen Faktors IL-2 konnte mittels Helfervirus-freier HSV-1 Amplikonvektoren in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Zudem wurde erstmalig der Beweis erbracht, dass primäre leukämische Blasten mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren erfolgreich transduziert werden konnten. Diese Zellen hatten sich in der Vergangenheit häufig als resistent gegenüber der Transduktion mit bisher klinisch zugelassenen Vektoren erwiesen. Unter der Annahme, dass eine erfolgreiche Transduktion mit Herpes simplex basierten Vektoren vor allem dann stattfinden kann, wenn alle drei HSV-Rezeptorgene (HveA, -B, -C) auf der Oberfläche der Zielzellen vorhanden sind, wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die untersuchten humanen Leukämie-/Lymphomzelllinien und primären leukämischen Blasten die entsprechenden Rezeptoren besitzen und ob es einen Zusammenhang zwischen den auf der Zelloberfläche vorhandenen HSV-Rezeptorgenen und der Transgenexpression gibt. So konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass alle vorgenannten Zellen jeweils alle drei HSV-Rezeptorgene auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ein direkter Zusammenhang zwischen den auf der Zelloberfläche vorhandenen HSV-Rezeptorgenen und der z.T. in Abhängigkeit der entsprechenden Zielzelle unterschiedlichen Transgenexpression konnte nicht gezeigt werden.

Abschließend wurde der antineoplastische Effekt einer Leukämievakzine *in vivo* untersucht, die durch den Gentransfer der immunstimulatorischen Moleküle CD70 und IL-2 mit Hilfe von Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren *ex vivo* hergestellt wurde. Hierzu wurden Mäusen mit einer hochmalignen und rasch dissimulierenden präB-Zellerkrankung syngene Leukämiezellen, die nach Transduktion mit Helfervirus-freien HSV-1 Amplikonvektoren transgen CD70 und IL-2 exprimierten, als Vakzine appliziert. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die verabreichte Kombinationsvakzine *in vivo* zur Induktion einer protektiven, anti-leukämischen Immunantwort führte. Das Langzeitüberleben konnte mit Überlebensraten von 57% an Tag 100 nach der Gabe der Leukämiezellen (Tumorgabe/Challenge) durch die Kombinationsvakzine im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Überlebensraten von nur 10% signifikant ($p < 0,03$) verbessert werden. Durch die geringere Expression von herpesviralen Proteinen im Helfervirus-freien Amplikonsystem sind zudem erstens weniger unerwünschte Nebenwirkungen im Wirtsorganismus zu erwarten. Zweitens bietet das Helfervirus-freie Amplikonsystem die Möglichkeit die Effektivität immunmodulatorischer Moleküle gezielt zu testen, da Überlagerungen durch sowohl immunstimulierende als auch –supprimierende Effekte wegfallen.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

- Name Anja Lorzynski, geb. Thomassen
- Anschrift Hermann Löns-Weg 13
42697 Solingen
- Email anja.lorzynski@gmx.de
- Geburtsdatum: 11.11.1977
- Geburtsort: Düsseldorf

Schulbildung:

- 1997 Abitur (Gesamtnote „sehr gut“ (1,5)), Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium in Düsseldorf-Benrath

Hochschulausbildung:

- 1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Gesamtnote: „gut“ (2,0))
- September 2000-
April 2002 Dissertation im Labor für Experimentelle Hämatologie und Stammzelltransplantation der Klinik für Kinder- Onkologie - Hämatologie und -Immunologie am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Prof. Dr. med. Göbel)

Praktisches Jahr:

- 2003-2004
 1. Tertial: Innere Medizin am Spital Zimmerberg in Wädenswil, Lehrkrankenhaus der Universität Zürich, Schweiz
 2. Tertial: Chirurgie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 3. Tertial: Pädiatrie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Facharztausbildung:

- seit April 2005 Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Nephrologie, Sana-Klinikum Remscheid GmbH

Publikationen:

- Zibert A., Thomassen A., Müller L., Nguyen L., Glouchkova L., Fraefel C., Roskrow M., Meisel R. and Dilloo D. (2005). Herpes simplex virus type-1 amplicon vectors for vaccine generation in acute lymphoblastic leukemia. Gene Therapy. 12(23),1707-1717
- Thomassen A., Zibert A., Quang H., Glushkova L. and Dilloo D. (2001). A new generation of HSV BAC vectors for preparation of leukemia vaccines. 43rd ASH Annual Meeting, Orlando, Florida.
- Zibert A., Thomassen A., Ackermann B., Müller L., Dilloo D. (2001). Human dendritic cells can be effectively transduced by new generation helper virus-free herpes simplex amplicon vectors. 43rd ASH Annual Meeting, Orlando, Florida.

10. Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mir während dieser Zeit immer unterstützend zur Seite standen. Ebenso danke ich meiner Familie als stets ermutigende Wegbegleiter. Mein Dank gilt insbesondere meinem Mann, der mir oft mit Rat und Tat zur Seite stehen musste.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau PD Dr. med. D. Dilloo für die Betreuung meiner Doktorarbeit und insbesondere für die daraus resultierende Möglichkeit wissenschaftlich zu arbeiten. Bei Herrn Dr. A. Zibert möchte ich mich an dieser Stelle für die geduldige und hilfreiche Unterstützung hinsichtlich der Einarbeitung in die Geheimnisse des Laboralltags bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Dr. H. Bülle für die kritische Korrektur des Manuskripts meiner Dissertation.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Kolleginnen und Kollegen des KMT-Labors der Kinderklinik der HHU Düsseldorf, die während meiner Dissertation immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten.