

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Etablierung einer optimierten Helferzelllinie
zum Genvektortransfer in humane B-Zellen**

von

Eva Hettich

aus

Dachau

2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt betreut und von Prof. Dr. Horst Domdey vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 07. November 2006



Eva Hettich

Dissertation eingereicht am 30. Juni 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Tag der mündlichen Prüfung: 07. November 2006

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hettich, E., Janz, A., Zeidler, R., Pich, D., Hellebrand, E., Weissflog, B., Moosmann, A. and Hammerschmidt, W. (2006) Genetic design of an optimized packaging cell line for gene vectors transducing human B-cells. *Gene Therapy*, **13**, 844-856

*für meine Eltern, meine Oma
und Christian*

1	Einleitung	1
1.1	Virale Genvektoren als Gentransfersysteme	2
1.2	Die Familie der Herpesviren	4
1.2.1	Das Epstein-Barr-Virus	5
1.2.2	Der Vermehrungszyklus von EBV	7
1.2.3	EBV-basierte Verpackungszelllinie	10
1.3	Maligne Lymphome	13
1.3.1	Chronisch-Lymphatische Leukämie der B-Zellen	13
1.4	Das Immunsystem	15
1.4.1	Angeborene Immunantwort	15
1.4.2	Erworbene Immunantwort	15
1.5	Gentherapie der Chronisch-Lymphatischen Leukämie	17
1.5.1	Zelluläre Defekte der Chronisch-Lymphatischen Leukämie	17
1.5.2	Aktivierung der Immunantwort durch CD40L-Stimulierung	18
1.6	Aufgabenstellung	20
2	Material	22
2.1	Zelllinien und Bakterienstämme	22
2.1.1	Zelllinien und andere Zellen	22
2.1.2	<i>E. coli</i> -K12-Bakterienstämme	24
2.2	Plasmide	24
2.2.1	Expressionsplasmide und Genvektoren	24
2.2.2	maxi-EBV-Plasmide	27
2.3	Oligodesoxynukleotide	27
2.4	Enzyme, Proteine und Antikörper	29
2.5	Chemikalien, Standards und Kits	30
2.6	Zellkulturmedien	33
2.6.1	Medien für prokaryontische Zellen	33
2.6.2	Medien für eukaryontische Zellen	34
2.7	Stammlösungen und Puffer	34
2.8	Sonstiges Material	37
2.9	Geräte und Software	39

3	Methoden	42
3.1	Bakterienkultur.....	42
3.1.1	Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien	42
3.1.2	Transformation und Elektroporation von <i>E. coli</i>	42
3.1.2.1	Transformation	42
3.1.2.2	Elektroporation	43
3.2	Zellkultur und Arbeiten mit Viren.....	43
3.2.1	Grundtechniken der Zellkultur.....	43
3.2.1.1	Zellkulturbedingungen	43
3.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	44
3.2.1.3	Lagerung von Zellen über längere Zeiträume.....	45
3.2.1.4	Isolation von humanen primären Lymphozyten aus Vollblut oder Gewebe	45
3.2.2	Transfektion und Virusaufarbeitung.....	46
3.2.2.1	Stabile Transfektion von Zellen und Selektion stabiler Zellklone mit Hygromycin.....	46
3.2.2.2	Transiente Transfektion und Generierung infektiöser Viruspartikeln	46
3.2.2.3	Konzentration von Virusüberständen.....	47
3.2.3	Infektion mit Virusüberständen und Infektionsinhibierung	47
3.2.3.1	Infektion von Zellen für Immunfluoreszenz-Analyse oder Durchflusszytometrie (FACS)	47
3.2.3.2	Infektion von primären B-Zellen mit maxi-EBVs zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz	48
3.2.4	Zellanalysen	49
3.2.4.1	Immunfluoreszenz-Färbung.....	49
3.2.4.2	Durchflusszytometrie	49
3.2.4.3	Nachweis der IFN- γ -Produktion nach spezifischer Stimulierung der T-Zellen mittels ELISA.....	50
3.2.4.4	Konfokale Lasermikroskopie.....	50
3.3	DNA-Arbeitstechniken	51
3.3.1	Präparative Plasmidreinigung.....	51
3.3.1.1	Aufreinigung von Plasmiden ohne Endotoxine	51
3.3.1.2	Präparation von EBV-Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	51

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	Homologe Rekombination in <i>E. coli</i> zur Konstruktion von maxi-EBV-Mutanten.....	52
3.3.3	Isolierung genomischer DNA aus primären B-Zellen.....	52
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
3.3.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese...	53
3.3.6	Southern-Blot-Hybridisierung.....	53
3.3.7	Plasmid-Rückgewinnung	54
3.3.8	Konstruktion der Genvektoren	54
3.3.8.1	Genvektor p2924	55
3.3.8.2	Genvektoren p3100 und p3326	55
3.3.8.3	Genvektoren p3303 und p3304	56
3.3.8.4	Genvektor p3460	56
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Generierung der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII+.....	57
4.1.1	Klonierung des maxi-EBV-Helfergenoms p2831	58
4.1.1.1	Homologe Rekombination der maxi-EBV-Plasmide in <i>E. coli</i>	59
4.1.1.2	Genealogie der maxi-EBV-Plasmide	59
4.1.1.3	Bestätigung des maxi-EBV-Helfergenoms.....	61
4.1.2	Etablierung einer stabilen optimierten Verpackungszelllinie.....	66
4.1.3	Optimierung der Verpackungseffizienz der Verpackungszelllinie	69
4.1.4	Verifizierung des maxi-EBV-Genoms der Verpackungszelllinie 293-VII+	71
4.1.5	Infektion von primären B-Zellen mit rekombinanten EBV-Partikeln zur Bestimmung der Transformationseffizienz.....	73
4.2	Transduktion.....	75
4.2.1	Verpackung von EBV-basierten Genvektoren durch 293-VII+.....	75
4.2.1.1	Transfektion und Virusproduktion	76
4.2.1.2	Genvektoren	80
4.2.1.2.1	Klonierung des therapeutischen Genvektors mit hCD40L	80
4.2.1.2.2	Kontroll-Genvektoren.....	83
4.2.1.3	Klonierung des <i>E. coli</i> -Stammes DH10B <i>Amp^r/Tet^r</i> (amber).....	85

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Infektion von B-Zelllinien und humanen B-Zellen mit rekombinanten Viruspartikeln generiert mit 293-VII+	86
4.2.2.1	Infektion unterschiedlicher B-Zelltypen	87
4.2.2.2	Infektion mit CD40L	89
4.2.2.3	T-Zell-Assay mittels Interferon- γ -ELISA	91
4.2.3	Exosomen	93
4.2.3.1	Vergleich der Infektionseigenschaften von rekombinantem EBV und Exosomen	96
4.2.3.2	Mikroskopische Analyse des Übertrags durch Exosomen	98
4.2.3.3	Immunantwort gegen das CMV-Protein pp65	99
5	Diskussion	102
5.1	Berücksichtigung aller sicherheitsrelevanten Aspekte bei der Konstruktion der Verpackungszelllinie 293-VII+	103
5.1.1	Genetische Modifizierung des Helfergenoms p2831	103
5.1.2	Etablierung der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII+	104
5.2	B-Zell-spezifische Transduktion	106
5.2.1	Rekombinante EBV-Partikel aus der optimierten Verpackungszelllinie infizieren B-Zellen	106
5.2.2	Exosomen übertragen Fremdproteine auf B-Zellen	108
5.3	Ausblick	111
6	Zusammenfassung	112
7	Abkürzungen	114
8	Literaturverzeichnis	118

1 EINLEITUNG

Zehn Jahre nachdem James Watson und Francis Crick die Struktur der DNA aufgeklärt hatten, legte der amerikanische Wissenschaftler und spätere Nobelpreisträger Joshua Lederberg mit seiner Idee, menschliche Zellen auf chromosomaler Ebene gezielt zu verändern, 1963 den Grundstein für die Gentherapie (Lederberg, 1963). Seither wird daran gearbeitet, geeignete Gentransfersysteme zu entwickeln.

In der Gentherapie sind zwei Fragen von zentraler Bedeutung: Wie spezifisch lässt sich der genetische Defekt einer Erkrankung verändern? Und wie stabil bleibt das therapeutische Gen in der Zielzelle? Monogene Erkrankungen, wie etwa die Immunschwächekrankheit SCID-X1, ließen sich prinzipiell durch Gentherapie gezielt behandeln, aber die Mehrzahl der Erkrankungen mit genetischem Hintergrund werden von mehr als einem defekten Gen verursacht. Selbst wenn ein passender therapeutischer Ansatz gefunden ist, muss das therapeutische Gen die Zielzelle erreichen. Für diesen Transport von Genen in humane Zellen wurden sehr früh virale Gentransfersysteme etabliert. Da Viren selbst Krankheiten hervorrufen können, müssen sie für klinische Anwendungen „entschärft“ werden, aber dennoch die Fähigkeit und Kapazität behalten, Zellen zu infizieren und therapeutisch relevante Gene zu transportieren. Ein häufiges Problem ist dabei die Herstellung dieser rekombinanten Viren ohne Verunreinigung durch Wildtypvirus. Deshalb müssen je nach Art des verwendeten Virusvektors geeignete Verpackungszelllinien als Helfersysteme entwickelt werden.

Unter den möglichen Viren fällt das zur Familie der Herpesviren gehörende Epstein-Barr-Virus (EBV) durch einige interessante Eigenschaften auf. So ermöglicht die Fähigkeit zur latenten Infektion eine episodale und stabile Weitergabe des EBV-Genoms an die Tochterzellen ohne Integration in die chromosomale DNA. Ein ausgeprägter B-Zelltropismus erhöht zusätzlich die Sicherheit eines zielgerichteten Gentransfers. In Vorarbeiten konnte bereits die erste auf EBV-basierte Verpackungszelllinie etabliert werden (Delecluse, 1999). Für mögliche klinische Anwendungen galt es nun, unter Berücksichtigung aller sicherheitsrelevanten Aspekte, eine optimierte Verpackungszelllinie zu generieren. Die Genvektoren, die damit hergestellt werden, könnten etwa bei einer Gentherapie gegen die Chronisch-Lymphatische Leukämie der B-Zellen (B-CLL) eingesetzt werden.

1.1 Virale Genvektoren als Gentransfersysteme

Ein Transgen kann entweder auf viralem Weg oder auf nicht-viralem in eine eukaryontische Zielzelle übertragen werden. Nicht-viraler Gentransfer erfolgt mit freier Plasmid-DNA durch Elektroporation und Mikroinjektion direkt in die Zelle oder durch DNA, die mit kationischen Lipiden oder Polymeren komplexiert wird, über Endozytose (Gresch, 2004, Li, 2001, Niidome, 2002). Größter Nachteil der nicht-viralen Methoden ist die allgemein geringe Transfektionsineffizienz *in vivo* besonders bei primären Zellen, eine hohe Zellsterblichkeit sowie bei einem Endozytose-abhängigen Transfer die Abhängigkeit vom Zellzyklus, wodurch eine ausreichende Aufnahme und Expression des Transgens in einer großen Anzahl von Zielzellen nicht gewährleistet ist.

Viren bestehen nur aus Nukleinsäure und Kapsid, einige Arten wie die Herpesviren besitzen um das Kapsid aus Proteinen zusätzlich eine Hülle, die aus zellulär abgeleiteten Membranen gebildet wird. Viren besitzen keinen eigenen Stoffwechsel, für ihre Vermehrung brauchen sie die Unterstützung lebender Zellen. Diese Bedingung hat Viren im Laufe der Evolution optimal angepasst, ihre Abhängigkeit resultiert in einer sehr hohen Infektionseffizienz.

Je nach Erkrankung kann es erwünscht sein, dass sich das therapeutische Gen in das Genom der Zelle integriert. Dadurch wird es nach der Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben und das Genprodukt kann über längere Zeit exprimiert werden. Ohne Integration in das Chromosom der Zielzelle dünnt sich das therapeutische Gen im Regelfall nach mehreren Zellteilungen aus. Außerdem muss sichergestellt werden, dass therapeutische Proteine an der richtigen Stelle in der richtigen Konzentration synthetisiert und Gene nicht etwa durch Methylierung abgeschaltet werden (Calos, 1996).

Von ersten Erfolgen auf dem Gebiet der Gentherapie konnten im Jahr 2000 Pariser Ärzte berichten, als Kleinkinder mit der bislang unheilbaren Immunschwächekrankheit SCID-X1, die Betroffene in ein steriles Isolierzelt zum Schutz vor Infektionen verbannt, geheilt wurden (Cavazzana-Calvo, 2000). Als Genfähren wurden modifizierte Retroviren benutzt. Drei der 18 behandelten Kinder entwickelten jedoch binnen zwei Jahren eine Leukämie (Check, 2002), ein Junge verstarb. Ursache für diese Leukämien war die Integration des therapeutischen Genvektors in unmittelbarer Nähe des Promotors des Proto-Onkogens LMO-2, wodurch dieses aktiviert wurde (Hacein-Bey-Abina, 2003).

Aber auch das Transgen selbst ist in Verdacht geraten, T-Zell-Leukämie zu verursachen. Retroviren werden sehr häufig als Gentransfersystem eingesetzt, da sie mit etwa 9kb Größe eine einfache Genomstruktur und eine überschaubare Anzahl an Genen besitzen. Dies erleichtert die Konstruktion einer geeigneten Verpackungszelllinie, die das Helfergenom und das therapeutische Plasmid beinhalten muss (Miller, 2000). Das Helfergenom kann direkt auf das Wildtyp-Provirus aufbauen, in dem die Verpackungssignale deletiert wurden. Es synthetisiert die für Viruspartikel essenziellen Kapsid- und Hüllproteine, sowie die für die Replikation benötigte Reverse Transkriptase. Das Plasmid enthält die bis zu 8kb große therapeutische Expressionskassette und die regulatorischen *cis*-Elemente, zu denen die Verpackungssignale gehören. Dadurch wird sichergestellt, dass nur das therapeutische Plasmid, nicht aber das Helfergenom in Viruspartikel verpackt wird. Modernere retrovirale Verpackungszelllinien basieren auf einzeln integrierte Expressionskassetten, die für die viralen Kapsid-, Hüll- und Nichtstrukturproteine kodieren. Bis auf lentivirale Retroviren infizieren die meisten Retroviren nur proliferierende Zellen und integrieren dort ins Zellgenom (Kalpana, 1999, Kay, 2001, Miller, 1990, Roe, 1993). Dies gewährleistet einerseits eine gleichbleibende Expression des Transgens über einen langen Zeitraum, andererseits kann eine unbeabsichtigte Aktivierung von benachbarten Genen nicht ausgeschlossen werden kann, wie im Fall der SCID-X1-Gentherapie (Cavazzana-Calvo, 2000, Check, 2002).

Anders als Retroviren infizieren Adenoviren effizient auch ruhende Zellen verschiedener Gewebe (Benihoud, 1999, Hitt, 1997, Kovesdi, 1997). Mit adenoviralen Vektoren lassen sich therapeutische Gene mit bis zu 30kb Größe transportieren. 1996 wurde erstmals eine auf Adenovirus-basierte Verpackungszelllinie für den gentherapeutischen Ansatz gegen die Chronisch-Lymphatische Leukämie der B-Zellen veröffentlicht (Cantwell, 1996). Mittlerweile wurden für gentherapeutische Anwendungen beinahe alle Virusgene durch zelluläre Gene ersetzt (Christ, 2000, Gorziglia, 1999, Lusky, 1998) und ein Helfersystem entwickelt (Catalucci, 2005, Morsy, 1999). Da Adenoviren auch episomal ohne Integration in der Zelle persistieren können, ist es schwierig, die optimale Dosis zu finden. Mit Adenovirus-basierten Gentherapien konnten bereits Erfolge verbucht werden (Balague, 2000, Morral, 1999, Morral, 1998), nach einer *in vivo*-Injektion verstarb allerdings der 18-jährige Jesse Gelsinger 1999 an einer toxischen Überdosis ($3,8 \times 10^{13}$ Viruspartikel). Neuere Vektoren mit Deletionen in einigen viralen Genen sind

besser verträglich (Lundstrom, 2003, Schiedner, 1998), durch hybride Vektoren aus Adeno- und Adeno-assoziierten Viren ist nun auch eine verlässliche aber ungerichtete chromosomale Integration möglich (Lieber, 1999).

Herpesviren galten lange Zeit als zu groß und daher zu komplex, um als Gentransfersystem zu dienen. Indessen ermöglicht es gerade die Genomgröße von bis zu 250kb, therapeutische DNA-Abschnitte von mehr als 100kb aufzunehmen (Hammerschmidt, 1988b). Somit können ganze Genloci mit ihren regulatorischen Elementen in Zielzellen übertragen werden. Diese nicht-viralen Sequenzen können koordiniert oder simultan exprimiert werden (Krisky, 1998). Da Herpesviren wie EBV nach Primärinfektion latent und episomal in der humanen Wirtszelle persistieren, ist eine Weitergabe an die Tochterzellen ohne Integration möglich. Von Vorteil kann auch das enge Wirts- und Zellspektrum von EBV sein.

Obwohl EBV mit einigen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wird (siehe Kapitel 1.2.1), hofft man, mit einem sicheren EBV-basierten Vektorsystem die durch andere virale sowie nicht-virale Vektorsysteme schwer zugänglichen humanen B-Lymphozyten gentherapeutisch behandeln zu können (Buschle, 1990). Die Onkogene von EBV sind bekannt, das Risiko der Transformation kann durch deren Deletion eliminiert werden. Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einem EBV-Genvektorsystem war die Konstruktion einer Verpackungszelllinie, die EBV-Genvektoren in eine Hülle verpackt (Delecluse, 1999). Voraussetzung hierfür war die Klonierung des gesamten EBV-Genoms in einen bakteriellen Vektor. Entbehrliche und potentiell gefährliche Gene können nun einfach deletiert werden. Rekombinantes EBV lässt sich somit in ausreichenden Mengen und hohen Konzentrationen herstellen.

1.2 Die Familie der Herpesviren

Herpesviren gehören mit einem Durchmesser von 100 bis 130nm zu den größten Viren. Sie werden aufgrund ihrer Pathogenität, der Zelltypen, die sie infizieren, und ihrer Vermehrungseigenschaften in drei Unterfamilien (α -, β - und γ -Herpesviren) eingeteilt. EBV ist eines der beiden bekannten humanen Herpesviren der γ -Unterfamilie. Das Cytomegalovirus (CMV), welches einen Vertreter der β -Unterfamilie darstellt, besitzt mit bis zu 250kb das größte Herpesvirusgenom. Alle Herpesviren heben sich durch ein besonders komplexes Verhalten bei der Infektion von vielen anderen Viren ab. Nach primärer Infektion persistieren alle den Menschen befallenden Herpesviren lebenslang

meist asymptomatisch im infizierten Wirt. Dabei werden unterschiedliche Organsysteme des Menschen latent infiziert.

Alle bekannten humanen Herpesviren haben ein doppelsträngiges, sehr komplexes DNA-Genom von 100 bis 250kb, die für bis zu 230 Gene kodieren. Die virale, lineare DNA ist in ein inneres Nukleokapsid eingebaut, einen Ikosaeder aus verschiedenen Proteinen. Beim Austritt aus der Wirtszelle wird das Nukleokapsid umhüllt mit Zytoplasmamembran der Zelle, in der sich verschiedene virale Glykoproteine eingelagert haben. Zwischen Hülle und Kapsid liegt bei Herpesviren das Tegument, eine Ansammlung zahlreicher Proteine, über deren Funktion wenig bekannt ist. Herpesviren vermehren sich nach Adsorption, Phagozytose und dem Enthüllen, wobei Hüllmembran und Kapsid abgebaut werden, im Zellkern der Wirtszelle. Nach der Maturierung werden neue Viren ausgeschleust und dabei wieder umhüllt (siehe auch Kapitel 1.2.2).

1.2.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus zeichnet sich durch einen extrem engen Wirts- und Zelltropismus aus. Infiziert werden humane Epithelzellen in Schleimhäuten von Nase, Hals und Rachen, sowie mit weitaus höherer Effizienz B-Lymphozyten. Innerhalb der Familie der Säugetiere können allein nahe verwandte Primaten infiziert werden. Daher sind Tiermodellversuche derzeit nur sehr begrenzt möglich.

EBV wurde 1964 zum ersten Mal von Anthony Epstein und Yvonne Barr in London beschrieben. Sie hatten das Virus aus den Zellen des Burkitt-Lymphoms isoliert (Epstein, 1964). Seit 1968 ist bekannt, dass EBV der Erreger der Infektiösen Mononukleose, nach dem Kinderarzt Emil Pfeiffer auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt, ist (Henle, 1967). EBV ist weltweit verbreitet, bislang kann eine EBV-bedingte Erkrankung nur symptomatisch behandelt werden.

Eine Übertragung findet durch Tröpfcheninfektion bei engem Kontakt statt. Zuerst wird das Virus von Epithelzellen phagozytiert, dort kommt es zu einer intensiven Vermehrung der Viren sowie zum Befall von B-Lymphozyten (Nemerow, 1989, Thorley-Lawson, 1996). Die akute Phase der Infektion geht mit einer massiven Proliferation der B-Lymphozyten einher, die zu einer starken T-Zellaktivierung und damit zu den klinischen Symptomen, wie Schwellung der Lymphknoten am Hals gekoppelt mit Fieber, führt. Bei Menschen mit einer intakten Immunabwehr werden die infizierten

B-Lymphozyten durch die zytotoxischen T-Lymphozyten weitgehend beseitigt und so die Erkrankung überwunden. Dennoch tragen alle Infizierte nach überstandener Krankheit lebenslang EBV⁺ B-Lymphozyten und Antikörper gegen EBV im Blut. Außerdem scheiden seropositive Menschen lebenslang Viren, die die Epithelzellen der Schleimhaut infiziert haben und dort regelmäßig lytisch replizieren, mit dem Speichel aus (Gerber, 1972). Die infizierten B-Zellen proliferieren nicht mehr und werden somit vom Immunsystem nicht detektiert (Kieff, 1996). Durchschnittlich eine von 10^5 B-Zellen im peripheren Blut eines gesunden seropositiven Menschen ist latent mit EBV infiziert (Kieff, 2001, Rickinson, 2001). Dabei liegt das Genom als histonbepacktes, episomales Plasmid in mehreren Kopien im Zellkern vor.

Je höher die hygienischen Standards, desto später kommen Menschen mit EBV erstmals in Kontakt. Im frühen Kindesalter verläuft die Infektion meist inapparent, nur wenige Menschen erkranken schwer (Faulkner, 2000). 90% der über Dreißigjährigen in Deutschland sind mit EBV infiziert. Eine Reaktivierung zum lytischen Infektionszyklus mit Bildung infektiöser Partikel ist möglich, jedoch bleibt sie im Gesunden symptomlos (Liebowitz, 1998). Bei Patienten mit geschwächter Immunabwehr, zum Beispiel nach HIV-Infektion, einer Immunsuppression nach Organtransplantation oder bei angeborenen Immundefekten, kann es in Folge der unkontrollierten Vermehrung der B-Lymphozyten zur Entwicklung von Lymphomen kommen, die später maligne entarten können.

In vivo sind einige humane Tumore bekannt, die kausal mit EBV assoziiert werden (Liebowitz, 1998, Niedobitek, 1999, Rickinson, 1996, Rickinson, 2001). Man nimmt an, dass EBV als Kofaktor an der Entstehung des Burkitt-Lymphoms beteiligt ist (Rowe, 1992). Diese Tumorerkrankung des lymphatischen Systems meist im Ober- bzw. Unterkiefer kommt vorwiegend bei jungen Menschen in Zentralafrika vor. Ebenso wird das Nasopharynxkarzinom mit EBV in Zusammenhang gebracht. Diese Krebsart, die die Schleimhäute und die lymphatischen Gewebe im Nasen- und Rachenraum betrifft, ist in Südostasien und China sehr verbreitet. Auch in Hodgkin-Lymphom-Zellen findet man EBV (Rickinson, 1996). Nach Analyse verschiedener EBV-Stämme aus unterschiedlichen Infektionen geht man davon aus, dass keine krankheitsspezifischen Subtypen existieren (Bornkamm, 1980). Das Genom des EBV-Stammes B95-8 wurde als erstes vollständig kloniert und sequenziert, da die B95-8-Zelllinie mehr Virus produzierte als andere damals bekannte EBV-Zelllinien (Baer, 1984, Miller, 1972,

Skare, 1980). Das B95-8-Genom umfasst 172kb, die für etwa 90 verschiedene Proteine kodieren und ist der Standard-EBV-Stamm, im späteren Verlauf auch als Wildtyp-EBV bezeichnet. Primäre B-Zellen, die *in vitro* mit EBV infiziert und zur Proliferation aktiviert wurden, nennt man lymphoblastoide Zelllinien (LCL) (Henle, 1967, Pope, 1968, Rickinson, 2001). LCLs exprimieren die sechs EBV-nukleären Antigene (EBNA)-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP, sowie die drei latenten Membranproteine (LMP)-1, -2A und -2B. Diese Transformation von ruhenden primären B-Zellen durch EBV ist einzigartig und stellt ein klassisches Modellsystem für die Proliferationskontrolle von Zellen *in vitro* dar.

1.2.2 Der Vermehrungszyklus von EBV

Das zelluläre Oberflächenmolekül CD21, auch Komplementrezeptor CR2 genannt, ist der dominante Rezeptor, an den das virale Glykoprotein gp350/220 (gp350) bindet, welches wiederum den überwiegenden Teil der Infektiosität von EBV vermittelt (Nemerow, 1989, Nemerow, 1987, Nemerow, 1985). Der Eintritt von EBV in die Wirtszelle ist in Abb. 1 dargestellt.

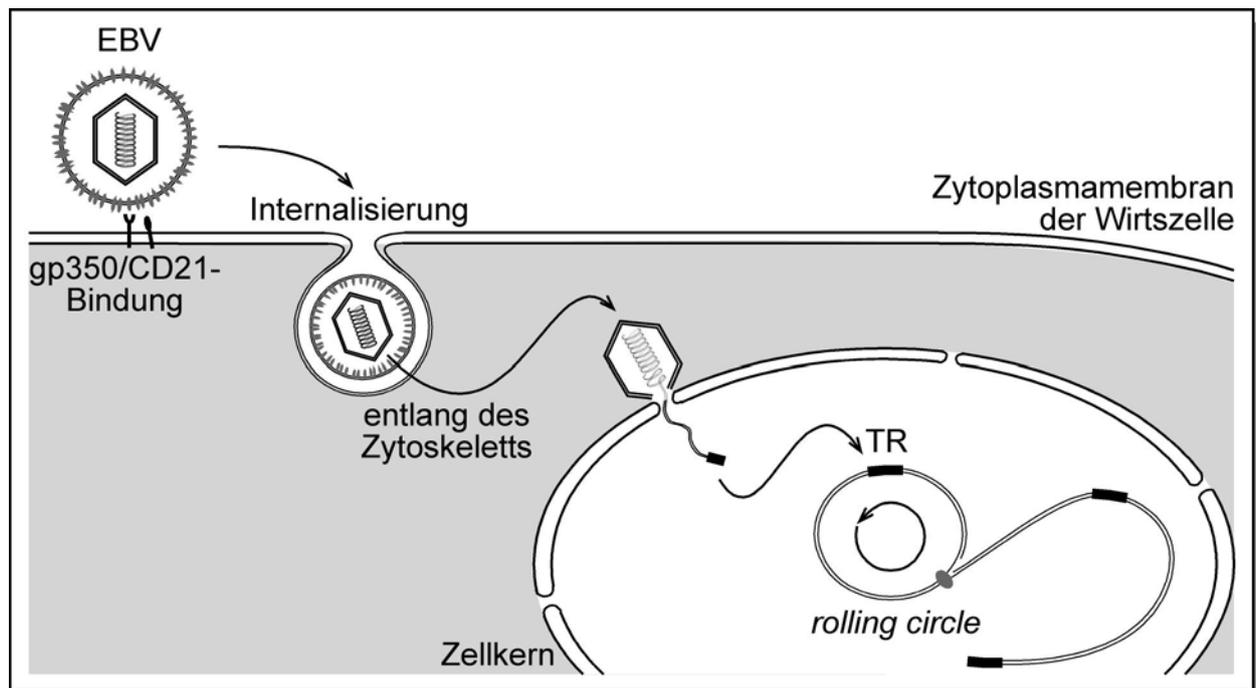


Abb. 1 Eintritt von EBV in die Wirtszelle

Nach Adsorption mittels Bindung von gp350/220 (gp350) an CD21 und Internalisierung in die Zytosolmembran der Wirtszelle wird EBV ins Zytoplasma freigesetzt und wandert entlang des Zytoskeletts zum Zellkern. An einer Kernpore gelangt die virale DNA aus dem Kapsid in den Kern. Nach Zirkularisierung an den terminalen repetitiven Verpackungssignalen (TR) der linearen DNA transkribiert die Wirtszelle das virale Genom in rotierendem Mechanismus (*rolling circle*).

Da die Replikation im Zellkern stattfindet, wandert das Virus mit Hilfe der Nukleoproteine am Zytoskelett entlang zum Kern. Dort lagert es sich an eine Kernpore, streift das Kapsid ab und die lineare Nukleinsäure gelangt in den Kern. Über die terminalen repetitiven Verpackungssignale wird die doppelsträngige virale DNA zirkularisiert. Wahrscheinlich verläuft die DNA-Synthese unidirektional über den so genannten *rolling circle*-Mechanismus ab. Die Zelle beginnt, das virale Erbgut zu amplifizieren. Dabei entstehen Genom-Konkatemere, die an den TR geschnitten werden. Die für das Virus nötigen Bausteine werden synthetisiert, Strukturproteine für Viruspartikel und Nicht-Strukturproteine für die Replikation gebildet.

Nach der Reihenfolge des Auftretens ihrer Genprodukte werden lytische Gene als sehr frühe (*immediate-early*), frühe (*early*) oder späte (*late*) Gene bezeichnet. Die sehr frühen Gene kodieren meist für Transkriptionsfaktoren, die die nachfolgenden Gene direkt oder indirekt induzieren. Das virale Genprodukt BZLF1 gehört dazu und bindet am lytischen Replikationsursprung (*oriLyt*), von dem aus die Replikation des viralen Genoms erfolgt (Countryman, 1985, Hammerschmidt, 1988a). Virale Proteine, die im Zytoplasma synthetisiert worden sind, gelangen in den Zellkern zurück. Aus den so gebildeten Bausteinen werden neue Viren im Zytoplasma einzeln in Kapside zusammengebaut. Im finalen Stadium der Reifung werden die viralen Partikel durch Modifizierung der Kapsid-Vorläuferproteine oder Konformationsänderung infektiös.

Die Hülle von EBV wird vermutlich von der inneren Kernmembran gebildet, die auch virale Hüllproteine enthält, welche inkorporiert und später glykosyliert werden. Viruspartikel akkumulieren zwischen äußerer und innerer Membran und werden in Vesikeln durch das Zytoplasma an die Zelloberfläche transportiert. Eventuell kann EBV auch in das Endoplasmatische Retikulum knospen. In diesem Fall werden virale Partikel mittels intrazellulärer Membranen über den Golgi-Apparat in Vesikel geschleust. Diese werden dann an die Zytoplasmamembran gebracht, mit der sie fusionieren. Es kann sein, dass EBV die Hülle vor dem Ausschleusen einmal wechselt, in diesem Fall wird die endgültige Hülle durch Knospung an der Zytoplasmamembran gebildet (Gong, 1990). Darauf wird das Virus aus der Zelle freigesetzt. Mit der Freisetzung der Viren stirbt die Zelle.

Das Ausschleusen wird immer gesteuert von viralen Proteinen, eventuell initiiert eine hohe lokale Konzentration an viralen Proteinen und Genom-Moleküle diesen Vorgang. Häufig werden diese Produkte in Vesikeln und anderen subzellulären Strukturen

gesammelt, die als Einschlusskörperchen im Lichtmikroskop sichtbar sind. Auch eine hohe Konzentration von Syntheseprodukten, etwa Hüllproteinen, an der Zellmembran starten das Knospen, auch *budding* genannt. In der Literatur ist der Austritt einiger Viren in den Zusammenhang mit Exosomen gebracht worden (Flanagan, 2003, Gould, 2003, Masciopinto, 2004, Nguyen, 2003, Vazirabadi, 2003). Exosomen sind kleine mit Proteinen gefüllte Membranvesikel endosomalen Ursprungs, die im Zytoplasma vieler Zellen von multivesikulären Körperchen eingeschlossen und nach deren Fusion mit der Zytoplasmamembran *in vivo* und *in vitro* sezerniert werden (Février, 2004, Johnstone, 1987, Pisitkun, 2004, Thery, 2002a, Thery, 2002b, Vazirabadi, 2003). Exosomen transportieren bestimmte Proteine in ihrem Inneren (Hicke, 2001a, Hicke, 2001b, Johnstone, 1987, Katzmann, 2001, Pisitkun, 2004, Thery, 2002a, Thery, 2002b, Vazirabadi, 2003). Eventuell wird das Knospen von Viren durch Entstehung von Exosomen erleichtert (Gould, 2003).

EBV bevorzugt nach Primärinfektion die latente Phase in den B-Zellen des infizierten Wirtes. Im Zellkern einer infizierten Zelle liegt das virale Genom als extrachromosomales Episom in zwei bis 250 Kopien vor (Metzenberg, 1990, Sugden, 1979). Dabei repliziert die virale DNA synchron zum Zellzyklus über den plasmidalen Replikationsursprung (*oriP*), der *cis*-aktiv mit dem Zellgenom interagiert. Die wenigen viralen Proteine, die in dieser latenten Phase exprimiert werden, werden für die Immortalisierung der infizierten Zellen und für die stabile Weitergabe des viralen Genoms an die Tochterzelle benötigt (Davenport, 1999, Hammerschmidt, 1989, Tomkinson, 1993, Yates, 1991). *In vitro* werden in dieser Phase nur 11 virale latente Gene exprimiert. Daraus entstehen die EBV-nukleären Antigene EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP, sowie die latenten Membranproteine LMP-1, -2A und -2B. Im Gegensatz zu LCLs werden in der latenten Phase noch EBER1 und EBER2, zwei nicht polyadenylierte RNAs, transkribiert. EBNA1 bindet an *oriP* und ist dafür zuständig, dass das virale Genom in latent infizierten Zellen episomal erhalten bleibt (Yates, 1985).

Der Mechanismus in latent infizierten Zellen, der *in vivo* zu einer Reaktivierung des lytischen Zyklus führt, ist selten und wird vermutlich über methylierte Motive vermittelt (Bhende, 2004). Durch chemische Reagenzien wie Natrium-Butyrat oder Phorbol-12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat (TPA) kann der lytische Zyklus induziert werden, das virale Genprodukt BZLF1 ist dabei essenziell (zur Hausen, 1978). Die Eigenschaften der latenten Infektion und einer möglichen Induktion durch BZLF1, sowie

der *cis-trans*-Aktivität von EBV wurden bei der Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie ausgenutzt.

1.2.3 EBV-basierte Verpackungszelllinie

Durch den Einbau eines prokaryontischen F-Plasmids und des Chloramphenicol-Resistenzgens in das Genom des B95-8-Stammes ist es gelungen, das virale Genom in *E. coli* selektiv zu klonieren. Beliebige EBV-Proteine können nun genetisch manipuliert werden (Delecluse, 1998). Dieses maxi-EBV-Genom genannte Konstrukt wurde zusätzlich mit einer Hygromycin-Resistenz (*Hyg^r*) und dem Gen für das verstärkt grün fluoreszierende Protein (eGFP, *enhanced green fluorescence protein*) unter Kontrolle des CMV-Promotors ausgestattet. Die Karte des maxi-EBV-Plasmids p2089 ist in Abb. 2 dargestellt.

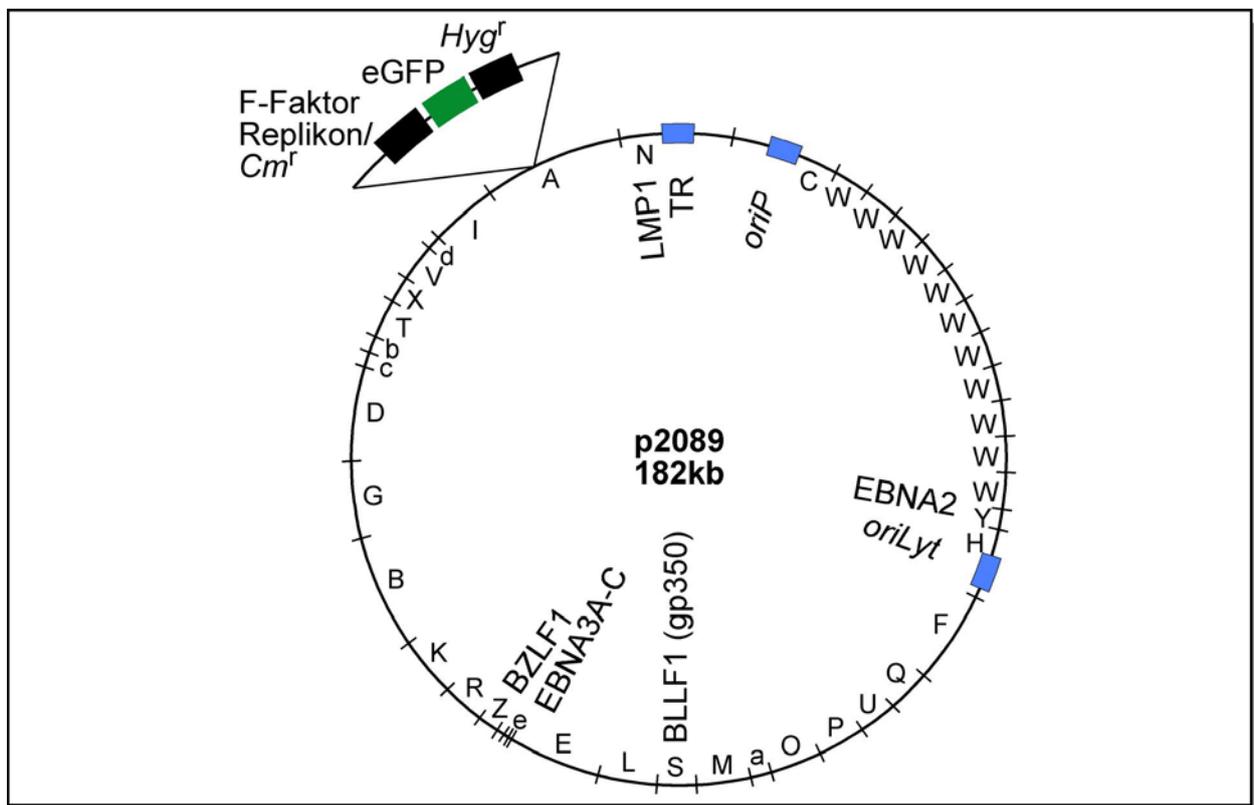


Abb. 2 Karte des maxi-EBV-Plasmids p2089

Die eingefügte prokaryontische Kasette trägt den F-Faktor für die Amplifikation in *E. coli* und das Chloramphenicol-Resistenzgen (*Cm^r*) für eine erfolgreiche Selektion in Bakterien. Das eGFP-Gen und das Hygromycin-Resistenzgen (*Hyg^r*) erlauben eine Selektion in eukaryontischen Zellen. Nach *Bam*HI-Verdau wurde das Genom buchstäblich nach den Fragment-Längen eingeteilt.

Mit diesem Genom wurden humane embryonale Nierenzellen (293HEK, *human embryonic kidney cells*) transfiziert. So entstand die Zelllinie 293-2089, die nach

Induktion in der Lage ist, infektiöse, eGFP-kodierende Viren zu produzieren. Diese zeigen Wildtyp-Eigenschaften, sie sind in der Lage, B-Zellen zu transformieren. Das Plasmid kann sowohl in *E. coli* als auch in eukaryontischen Zellen replizieren.

Zur Verpackung von EBV-basierten Genvektoren ist ein Helfersystem nötig, welches das Verpacken von rekombinanten viralen Vektoren ermöglicht. Gleichzeitig muss verhindert werden, dass bei der Herstellung infektiöser Viren das Helfergenom selbst verpackt wird. Ein erster Schritt dahin führte über die Deletion der terminalen repetitiven Verpackungssignale TR mittels homologer Rekombination in *E. coli*. Eine stabile Transfektion in 293HEK-Zellen führte zur ersten EBV-basierten Verpackungszelllinie TR⁻²/293 (Delecluse, 1999).

Durch transiente Expression des Transaktivators BZLF1, der die lytische Phase von EBV einleitet, können transfizierte Plasmide, die sowohl TR als auch den lytischen Replikationsursprung *oriLyt* tragen, verpackt und somit rekombinante Viren hergestellt werden. Das EBV-basierte Verpackungssystem ist schematisch in Abb. 3 dargestellt. Mit der Zelllinie TR⁻²/293 konnte bereits gezeigt werden, dass sich eGFP mit rekombinantem EBV auf B-CLL-Zellen übertragen lässt (Wendtner, 2003). Das Modellsystem im Labor, mit dem sich die Infektiosität der generierten, rekombinanten Viren testen lässt, ist die Infektion von Raji-Zellen.

Trotz Deletion der TR sind zwischen dem Helfergenom von TR⁻²/293 und den zu verpackenden EBV-basierten Genvektoren Rekombinationen möglich, wodurch infektiöses Wildtyp-EBV entstehen kann. Um die Frequenz der Rekombination zu verringern und die Entstehung von transformierendem Wildtyp-EBV bei einer Anwendung für therapeutische Zwecke zu verhindern, müssen Homologien reduziert und riskante Gene im Helfergenom zusätzlich ausgeschaltet werden. Hier bietet sich die Deletion der latenten Gene EBNA2, EBNA3A, EBNA3C und LMP1 an, die für die EBV-vermittelte Transformation essenziell sind (Cohen, 1989b, Hammerschmidt, 1989, Kaye, 1993, Tomkinson, 1993). EBNA2 wird als eines der ersten Proteine nach Infektion exprimiert und wirkt als Transaktivator zellulärer und viraler Gene. Auch LMP1 wird von EBNA2 induziert (Abbot, 1990).

Ein mögliches Anwendungsgebiet für den Einsatz von EBV-basierten Genvektoren stellt die somatische Gentherapie der Chronisch-Lymphatischen Leukämie der B-Zellen dar, die zu den malignen Lymphomen gehört.

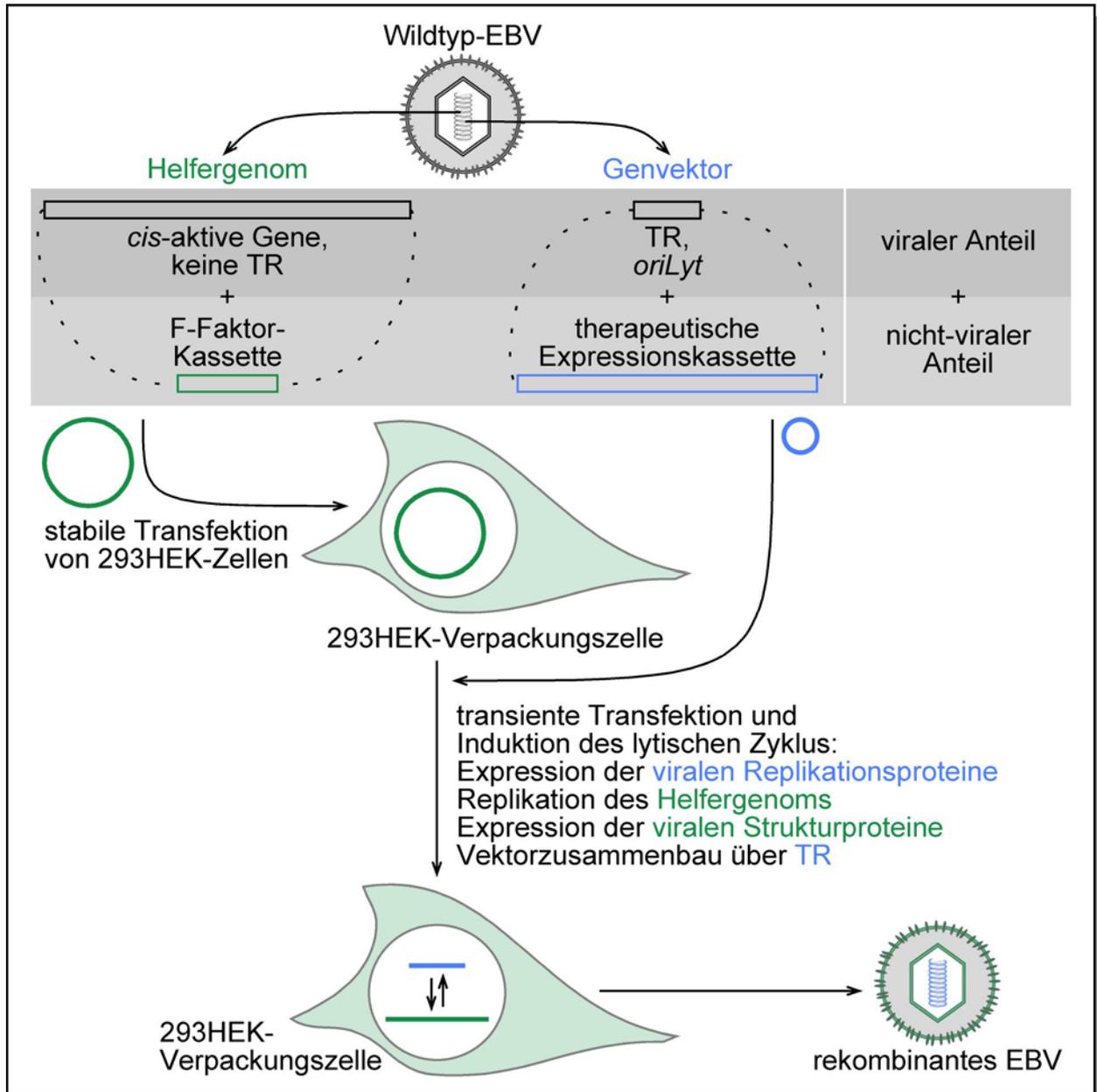


Abb. 3 Schematische Darstellung des EBV-basierten Verpackungssystems

Vom Genom des EBV-Stammes B95-8 wird ein Helfergenom durch Klonierung der prokaryontischen F-Faktor-Kassette auf die virale DNA generiert, welche *cis*-aktive Gene besitzt, aber keine TR. Durch stabile Transfektion von 293HEK-Zellen entsteht eine Verpackungszelllinie, die Genvektoren in rekombinante EBV-Partikel verpacken kann. Ein verpackbarer Genvektor trägt als minimale Anteile viraler DNA TR und *oriLyt*, sowie eine therapeutische Expressionskassette. Nach transienter Transfektion einer 293HEK-Verpackungszelllinie und Induktion des lytischen Zyklus durch BZLF1 wird rekombinantes EBV hergestellt.

1.3 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome stellen eine äußerst heterogene Gruppe von Tumorerkrankungen dar und werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt, Hodgkin-Lymphome (HL) und Nicht-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Innerhalb der NHL unterscheidet man indolente, aggressive und sehr aggressive Lymphome (Hiddemann, 1996). Das von EBV verursachte Burkitt-Lymphom zählt zu den sehr aggressiven Lymphomen. Die Chronisch-Lymphatische Leukämie gehört zu den indolenten NHL mit langsamem Verlauf. In 95% der Fälle handelt es sich dabei um eine Erkrankung der B-Zellen, in nur 5% sind T-Zellen leukämisch.

1.3.1 Chronisch-Lymphatische Leukämie der B-Zellen

Die Chronisch-Lymphatische Leukämie der B-Zellen macht nahezu 30% aller Leukämieerkrankungen aus und ist damit die häufigste Form von malignen Lymphomen in den Industriestaaten (Foerster, 1993). Männer tragen ein doppelt so hohes Risiko an B-CLL zu erkranken wie Frauen. Das Risiko steigt mit dem Alter an (Montserrat, 1995). Der Krankheitsverlauf ist über Jahre hinweg meist asymptomatisch (Dighiero, 1991). Nicht selten wird B-CLL zufällig diagnostiziert, weil im Blutaussstrich eine Vermehrung der Lymphozyten auf 60% bis annähernd 100% der gesamten Leukozyten erkennbar ist. Im Unterschied dazu beträgt der Anteil im gesunden Menschen etwa 30%. Auch die Zahl der Erythrozyten wird verringert, die der Thrombozyten sogar um zwei Drittel (Diehl, 1999). Phänotypisch können B-CLL-Zellen durch Expression von CD19, CD5 und CD23 sowie einer schwachen Expression oder Abwesenheit von CD22, FMC7, CD79b und den Immunglobulin-Oberflächenmolekülen IgM und IgD bestimmt werden. Häufig findet man Deletionen auf den Chromosomen 6 (6q21), 11 (11q22-q23), 13 (13q14) und 17 (17p13), sowie eine Trisomie des Chromosoms 12, die Ursache dieser Mutationen ist jedoch unbekannt (Stilgenbauer, 2000).

Lange Zeit galt das Dogma, B-CLL entstünde aus einer monoklonalen, sich langsam teilenden CD5⁺ B-Zelle in Blut, Knochenmark oder Lymphgewebe (Freedman, 1987, O'Brien, 1995, Rozman, 1995). Heute spricht man von zwei Untergruppen auf zellulärer Ebene (Caligaris-Cappio, 1999, Fais, 1998). Eine Form ist weniger aggressiv, sie geht von Gedächtnis-B-Zellen aus und trägt Mutationen in den IgV_H-Genen, die für das Protein im variablen Teil der schweren Kette (*variable region of heavy chain*) in Immunglobulinen kodieren. Vermutlich geht dieser Form eine T-Zell-abhängige

Stimulierung durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs, *antigen-presenting cells*) voraus (Hamblin, 2002). Die aggressivere Form ist nicht mutiert und entsteht aus naiven B-Zellen nach unkonventioneller Stimulierung, häufig kann eine Expression von CD38 und eine erhöhte Abhängigkeit von der Tyrosinkinase ZAP-70 nachgewiesen werden (Damle, 1999, Hamblin, 1999). Die Untergruppen der B-CLL stammen jeweils von einer Mutterzelle, einer Plasma-B-Zelle oder einer Gedächtnis-B-Zelle ab, somit kommt es nie zu einem Wechsel zwischen der nicht mutierten und der mutierten Form (Fais, 1998, Kipps, 2003). Abhängig von der Hämoglobinkonzentration, der Thrombozytenzahl, Lymphozytenzahl, sowie der Anzahl der beteiligten Regionen wird B-CLL in drei Stadien unterteilt, wobei das Stadium A derart heterogen ist, dass weitere Unterteilungen nötig werden (Binet, 1981) (siehe Tab. 1).

Tab. 1 B-CLL wird nach Binet in verschiedene Stadien eingeteilt.

CLL-Stadien (Binet)	Definition					Medianes Überleben (in Jahren)
	Hämoglobin (g/ml)	Thrombozyten (pro ml)		Lymphozyten (pro ml)	beteiligte Regionen ^α	
AI	> 0,12	und	> 1×10^8	< 3×10^7	-	5 (83%)
AII	> 0,12	und	> 1×10^8	> 3×10^7	< 2	5 (62%)
B	> 0,11	und	> 1×10^8	> 3×10^7	≈ 3	6
C	< 0,11	und/oder	< 1×10^8	> 3×10^7	unabhängig	2
gesund	≈ 0,15	und	≈ 3×10^8	≈ 2×10^6	-	

^α Lymphknoten (zervikal, axillär oder inguinal), Milz und/oder Leber, vgl. (Pangalis, 2002)

In der Regel wird für Patienten mit den Stadien Binet A oder B eine Behandlung erst dann erforderlich, wenn die Erkrankung klinische Symptome verursacht, wenn große Lymphome den Patienten behindern oder gefährden oder wenn ein schnelles Fortschreiten der Erkrankung offensichtlich ist. Das Stadium Binet C wird sofort behandelt. Übliche Chemotherapieansätze sind dabei die Gabe von alkylierenden Agenzien wie Chlorambucil oder Zyklophosphamide, sowie Purinanaloga und Kortikosteroide (Dighiero, 1998). Eventuell wird begleitend eine Strahlentherapie bei schmerzhaften tumorartigen Manifestationen eingesetzt. Neuere Verfahren setzen auf Stammzell-Transplantationen oder monoklonale Antikörper, wie den gegen CD52 gerichteten humanisierten Antikörper Alemtuzumab/Campath-1H oder den gegen CD20 gerichteten Antikörper Rituximab (Kipps, 2000a). Eine Heilung der B-CLL ist bislang

nicht möglich (Guipaud, 2003, Kipps, 1995, Montserrat, 1995).

Eine erste klinische Studie in Phase I behandelt B-CLL mittels Adenovirus-basierter Gentherapie, wobei der CD40-Ligand (CD40L), auch CD154 genannt, in B-CLL-Zellen geschleust wird (Wierda, 2000). *In vitro* konnte dadurch das Expressionsniveau von kostimulatorischen Molekülen wie CD54, CD80 und CD86 gesteigert und die Immunogenität der transfizierten Zellen erhöht werden (Kato, 1998).

1.4 Das Immunsystem

Zum besseren Verständnis des Prinzips, auf dem das in dieser Arbeit angewandte Gentherapiemodell beruht, soll hier das Immunsystem des Menschen grob skizziert werden.

1.4.1 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort wird auch unspezifische Abwehr genannt, sie sichert eine erste und besonders schnelle Abwehr. Nicht-körper-eigene Substanzen werden durch Komplementfaktoren, Lysozym und letztendlich durch Abwehrzellen, wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder Phagozyten, eliminiert. Vermutlich war eine Überreaktion des Komplementsystems der Grund, dass der Patient Jesse Gelsinger kurz nach Injektion der rekombinanten Adenoviren ins Koma fiel und nach wenigen Tagen an Multiorganversagen verstarb. NK-Zellen sind vor allem spezialisiert auf die Abwehr von Viren und Tumorzellen. Die beteiligten Zellen informieren andere Immunzellen durch Botenstoffe, die zu den Phagozyten zählenden Makrophagen können den Zellen des erworbenen Immunsystems sogar als APCs Fragmente des lysierten Fremdproteins liefern und somit eine erworbene Immunantwort hervorrufen.

1.4.2 Erworbene Immunantwort

Die erworbene Immunantwort, auch spezifisch oder adaptiv genannt, arbeitet im Vergleich zur angeborenen langsamer. Einige Tage dauert die Aktivierung der T-Zellen, die zwingend eine Präsentation von Peptidfragmenten durch APCs erfordert. Dabei wird das Antigen den naiven T-Zellen in den so genannten *major histocompatibility complexes* (MHCs) vorgeführt. Beim Menschen unterscheidet man dabei HLA-Klasse I und II (humanes Leukozyten-Antigen). Naive B-Zellen tragen auf ihrer Membran viele Oberflächen-Immunglobuline, die Antikörper des Blutplasmas. Bindet ein Antigen an mehrere dieser Ig, löst diese Antikörpervernetzung in der B-Zelle die Internalisierung

des Antigen-Antikörper-Komplexes in das Zytoplasma und seine Aufbereitung aus, so dass Antigenfragmente über HLA-Moleküle präsentiert werden. Eine für das Antigen spezifische T-Zelle muss über Rezeptor-Ligand-Bindung an die Antigen-präsentierende Zelle andocken, die Bindung wird verstärkt. Dadurch wird die T-Zelle aktiviert. Abb. 4 stellt die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung mittels CD40L dar.

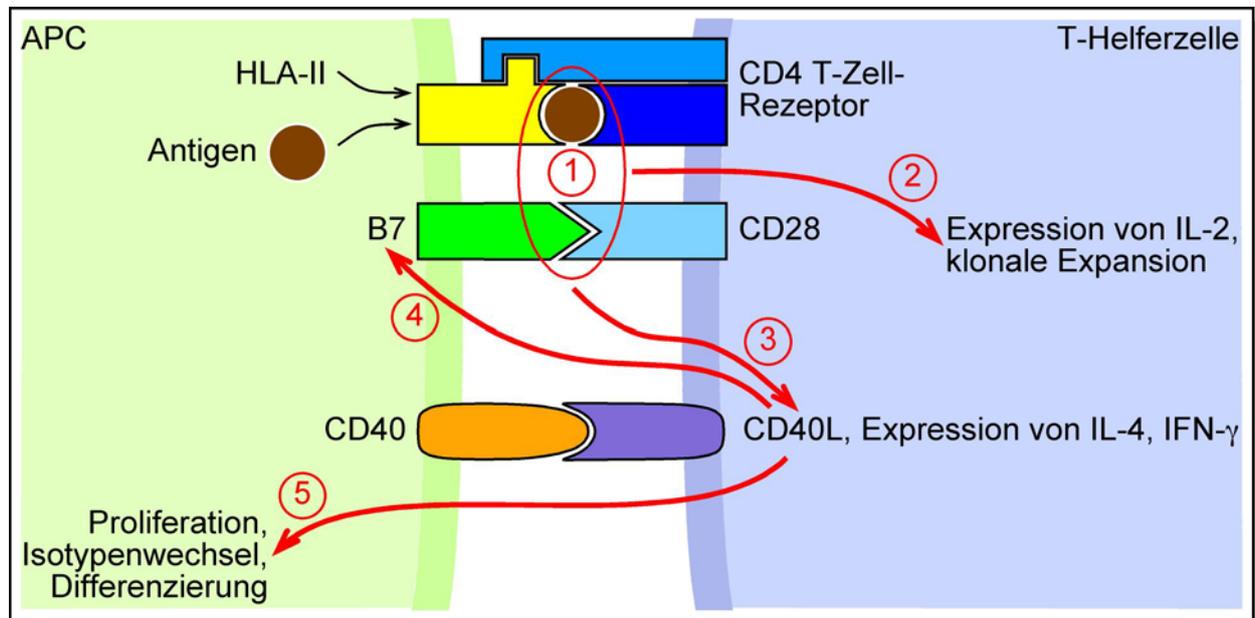


Abb. 4 Schematische Darstellung der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung mittels CD40L (Erklärung im Text)

Aktivierung (1) bedeutet in diesem Fall das Erkennen von HLA durch den T-Zell-Rezeptor bei gleichzeitiger Bindung eines B7-Proteins an CD28 auf der T-Zelle. B7-Proteine sind einzelkettige Glykoproteine und werden auch kostimulatorische Moleküle genannt. CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sind sich in der Struktur sehr ähnlich, sie besitzen beide einen extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Bereich am N-Terminus, eine Transmembran-Domäne und einen C-terminalen zytoplasmatischen Bereich (Lenschow, 1996). Das Doppelsignal löst in der T-Zelle die Expression von Interleukin-2 (IL-2) aus (2), das eigentliche Signal für die klonale Expansion dieser T-Zelle (Mueller, 1989). Naive T-Zellen, die CD8 exprimieren, werden nach HLA-Klasse I-Antigen-Präsentation zu zytotoxischen T-Zellen und treiben infizierte Zellen oder Tumorzellen in die Apoptose. Aus naiven $CD4^+$ Zellen werden nach HLA II-assoziiierter Antigen-Präsentation T-Helferzellen. Bei einer Antigenbindung ohne Kostimulation durch B7-Proteine wird die T-Zelle dagegen inaktiviert. Diese periphere Immuntoleranz wird auch als Anergie bezeichnet.

Erkennt der CD4-assoziierte T-Zell-Rezeptor einer T-Helferzelle das Antigen, so exprimiert die T-Zelle auf der Oberfläche CD40L (3), der an den CD40-Rezeptor (CD40) auf der B-Zelle bindet (Banchereau, 1994). Der CD40L einer aktivierten T-Helferzelle induziert die Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle (4) auf APCs (Fanslow, 1994, Matthews, 2000, McDyer, 2002). Eine Blockierung des CD40L durch Antikörper inhibiert die vom T-Zell-Kontakt abhängige B-Zell-Stimulierung. Erst dieses zweite Signal und die Sezernierung von IL-4 und Interferon-gamma (IFN- γ) durch die T-Zelle aktiviert die B-Zelle (5) und löst deren klonale Selektion, die Sekretion von IgM sowie die Differenzierung zu Plasmazellen aus (Roy, 1995, Shinde, 1996). Dabei kann von der Expression des IgM auf die von IgA, IgG oder IgE umgeschaltet werden, was als Klassen- oder Isotypenwechsel bezeichnet wird. Gleichzeitig wird eine Apoptose dieser B-Zelle blockiert. Für B-Zellen ist die Interaktion zwischen CD40 und CD40L zur Proliferation, Differenzierung und zum Isotypenwechsel essenziell (Armitage, 1992, Banchereau, 1991a, Clark, 1994, Rousset, 1991, Spriggs, 1992).

Verschiedene Studien haben bereits das Potential von CD40L als Molekül (Banchereau, 1994, Miga, 2000) für Immuntherapien gegen B-Zell-Tumore dargestellt (Buhmann, 1999, Kato, 1998, Van den Hove, 1997, Wierda, 2000). Die Fähigkeit von Tumorzellen, Antigen zu präsentieren, wird durch CD40L erhöht, die gesteigerte Expression der kostimulatorischen Moleküle, Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und ICAM-3, *intercellular adhesion molecule*), sowie MHC-Moleküle kann eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auslösen (Kato, 1998, Wierda, 2000). Der humane CD40L (hCD40L) ist ein 33kDa großes trimeres Typ-II-Membran-Glykoprotein der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie aus 261 Aminosäuren. Überwiegend wird CD40L auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert (Hollenbaugh, 1992), teilweise auf CD8⁺, NK-Zellen (Carbone, 1997) und aktivierten Thrombozyten (Henn, 2001). Das humane Homolog hat zur murinen cDNA 83% Ähnlichkeit, zum murinen Protein 77%.

1.5 Gentherapie der Chronisch-Lymphatischen Leukämie

1.5.1 Zelluläre Defekte der Chronisch-Lymphatischen Leukämie

Patienten mit Chronisch-Lymphatischer Leukämie sind anfälliger gegenüber Infektionen, das Gleichgewicht der Blutzellen ist gestört (Kipps, 1995). In der Lymphozytenfraktion von B-CLL-Patienten überwiegen mit bis zu 90% die leukämischen B-Zellen. Häufig werden die Oberflächen-Immunglobuline nur schwach

exprimiert, die Aufbereitung zur Präsentation von HLA ist gestört und ineffektiv (Cantwell, 1997, Takahashi, 2001, Wierda, 2000). B-CLL-Zellen sind nicht in der Lage, allogene T-Zellen in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR, *mixed leukocyte reaction*) zu stimulieren (Dazzi, 1995, Wolos, 1979). Darüber hinaus unterliegen sie nicht der Apoptose, ihr Zustand entspricht der G0/G1-Phase des Zellzyklus.

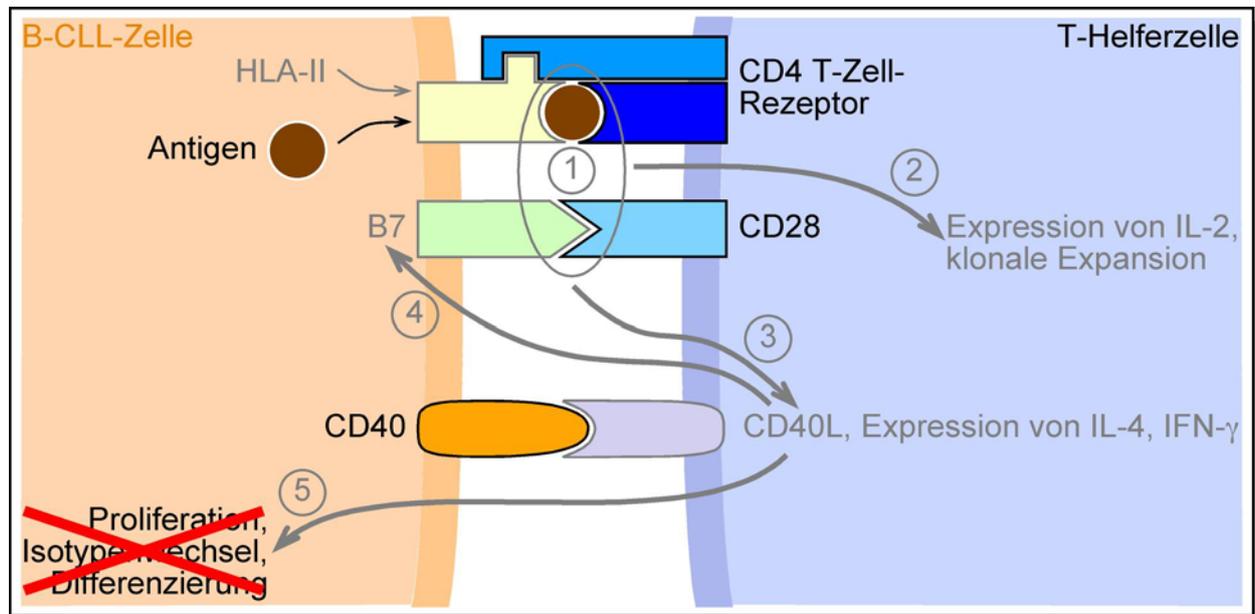


Abb. 5 Ausbleibende B-Zell-Aktivierung durch fehlende Interaktion zwischen B-CLL-Zellen und T-Helferzellen (vgl. Abb. 4)

Auch die Kostimulation durch die B7-Proteine ist herabreguliert, dadurch exprimieren T-Zellen keine aktivierenden Zytokine und verfallen in einen anergischen Zustand (Dazzi, 1995, Freedman, 1990). Außerdem exprimieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit B-CLL nur geringste Mengen an CD40L, wodurch eine B-Zell-Aktivierung ausbleibt (Ayanlar-Batuman, 1986, Fernandez, 1977, Kay, 1986, Kipps, 2000b, Ranheim, 1995, Van den Hove, 1997). Abb. 5 zeigt die fehlende B-Zellaktivierung im Patienten mit B-CLL.

1.5.2 Aktivierung der Immunantwort durch CD40L-Stimulierung

In verschiedenen Ansätzen konnte bereits gezeigt werden, dass die Transfektion von CD80 oder CD86 in murine Tumorzellen eine starke Antitumor-T-Zellantwort auslöst (Baskar, 1995, Chen, 1992, Matulonis, 1995, Townsend, 1993). Durch Stimulierung mittels CD40 können B-Zellen ebenfalls zur Expression der kostimulatorischen Moleküle aktiviert werden (Buhmann, 1999, Shamash, 1995, Van den Hove, 1997, Yellin, 1994). Eine phänotypische Veränderung der B-CLL-Zellen durch Expression von

CD40L nach Transduktion lässt sie in einer MLR zu effizienten T-Zell-Stimulatoren werden (Kato, 1998).

Die Arbeitsgruppe von Thomas Kipps unternahm den ersten Versuch der Gentherapie der B-CLL. Sie infizierten B-CLL-Zellen mit einem replikationsdefekten Adenovirus-Vektor, der den murinen CD40L (mCD40L) exprimiert. In der klinischen Phase I konnte eine Immunantwort bereits nach einmaliger Infusion nachgewiesen werden. Die Zahl der leukämischen Zellen wurde *in vitro* ebenso reduziert wie die Größe der Lymphknoten, was mit einem Anstieg von T-Zellen einherging (Chu, 2002, Wierda, 2000). Darüber hinaus waren diese Zellen in der Lage, *in vitro* zytotoxische T-Lymphozyten auch gegen nicht infizierte B-CLL-Zellen zu induzieren, ein so genannter *bystander*-Effekt. IL-12, IFN- γ und die Zahl an CD4⁺ T-Zellen sowie spezifischen T-Zellen stiegen innerhalb von 1 bis 4 Wochen nach Behandlung. Gleichzeitig sank die Zahl an B-CLL-Zellen (Wierda, 2000). Abb. 6 stellt die Interaktion zwischen zytotoxischer T-Zelle und B-CLL-Zelle dar nach Anwendung einer CD40L-Gentherapie.

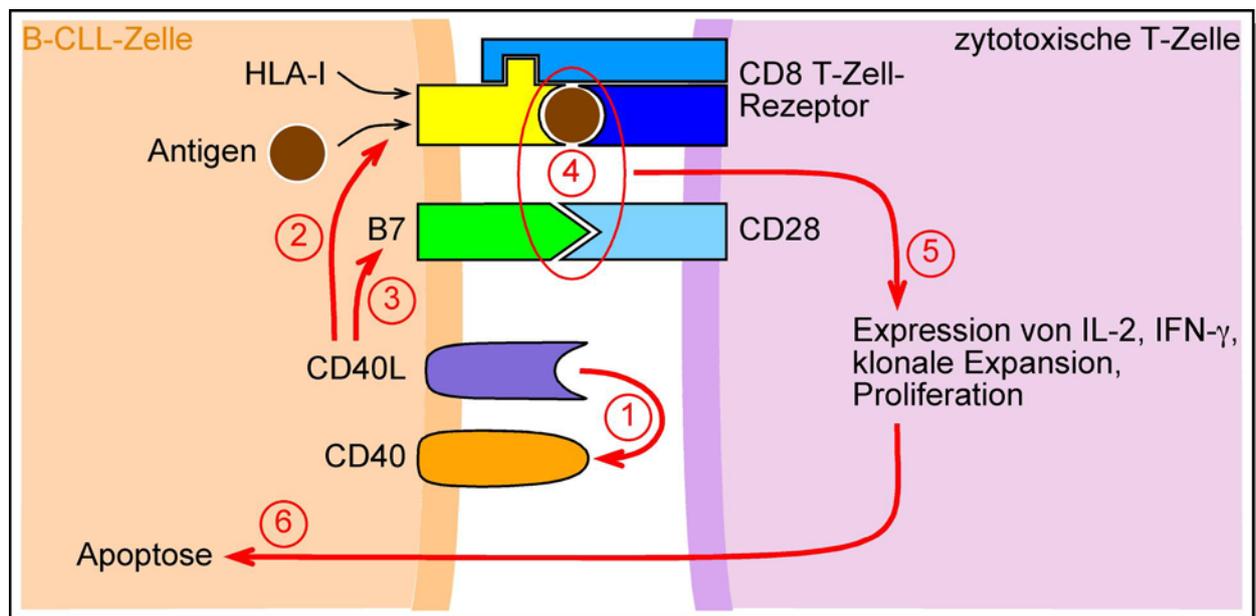


Abb. 6 Schematische Darstellung der Reaktion zwischen zytotoxischen T-Zellen und B-CLL-Zellen nach Transfektion von CD40L

Die Expression von CD40L auf einer B-CLL-Zelle (1) aktiviert diese und umliegende B-CLL-Zellen (*bystander*-Effekt). Darüber hinaus werden die Antigen-Präsentation (2) und die Expression von kostimulatorischen Molekülen (3) gesteigert. Dieses Doppelsignal wiederum aktiviert eine zytotoxische T-Zelle (4) und führt zur Expression von IL-2 und IFN- γ , sowie zur klonalen Expansion und Proliferation der T-Zelle (5). Die aktivierte T-Zelle treibt die B-CLL-Zelle in die Apoptose (6).

Weitere gentherapeutische Ansätze gegen B-CLL basieren auf einem CD80- oder CD40L-Transfer durch Herpes-Simplex-virale Vektoren (Tolba, 2001). Auch adeno-assoziierte Viren wurden bereits als Vektoren eingesetzt, um in B-CLL-Zellen die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins eGFP oder des mCD40L zu erzeugen (Wendtner, 2002). Der humane CD40L wurde mit Lentivirus-basierten Vektoren auf B-CLL-Zellen übertragen (Bonamino, 2004). Durch einen sogenannten interzellulären *bystander*-Transfer von genetisch modifizierten hCD40L-exprimierenden Fibroblasten auf B-CLL-Zellen konnte hCD40L auch übertragen werden (Biagi, 2003).

1.6 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte für B-Zell-Tumore ein EBV-basiertes Vektorsystem generiert werden, als Anwendungsbeispiel diene die Chronisch-Lymphatische Leukämie der B-Zellen. In einer *ex vivo*-Gentherapie sollen B-CLL-Zellen nach einem Transfer von rekombinanten CD40L-kodierenden Genvektoren den humanen CD40-Liganden exprimieren und eine Immunantwort hervorrufen.

Ein EBV-basiertes Verpackungssystem eignet sich in besonderem Maße für eine Gentherapie gegen B-Zellen, da diese CD21 exprimieren und somit eine natürliche Bindungsstelle für EBV bieten. Die hohe Spezifität und Infektionseffizienz von EBV soll Grundlage des Gentransfersystems in B-Zellen sein. Im Fall der B-CLL lassen sich somit gezielt nur B-CLL-Zellen infizieren. Das System der bereits etablierten Verpackungszelllinie sollte hier, wie bereits in Kapitel 1.2.3 erwähnt, für sichere therapeutische Anwendungen optimiert werden.

Zu diesem Zwecke sollte eine neue sichere Verpackungszelllinie generiert werden, die alle derzeitigen Kenntnisse über Etablierung und Transformation von EBV berücksichtigt. Für therapeutische Aspekte war es unerlässlich, alle potenziell onkogenen Bereiche auf dem Helfergenom zu deletieren, aber dennoch die minimale Ausstattung an Genen und regulatorischen Elementen bereitzuhalten, die für eine stabile Etablierung in den Verpackungszellen und den Zusammenbau von Viruspartikeln nötig sind.

Bei der Klonierung des therapeutischen Genvektors sollte zudem auf bakterielle Resistenzgene durch Verwendung des *supF*-Systems verzichtet werden. Um die Wahrscheinlichkeit der Rekombination mit dem Helfergenom zu verringern, sollte das therapeutische Plasmid eine möglichst geringe Homologie aufweisen. Obwohl früher

gezeigt wurde, dass sich der Transfer in B-CLL-Zellen und die Expression von hCD40L vermutlich durch Blockierung der Protein-Synthese oder limitierte Genexpression an der Oberfläche (Cantwell, 2001) schwieriger erweist, wurde zugunsten des humanen Therapiesystems entschieden und geringere Effizienzen in Kauf genommen (Kato, 1998, Wierda, 2000).

Im Laufe dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass wohl weitaus mehr Viren-ähnliche Partikel als rekombinantes EBV gebildet werden, die auch in der Lage sind, Gene bzw. deren Proteine zu transportieren. In Hinblick auf mögliche Impfstoffe wurden deshalb Vorversuche unternommen, die das Phänomen des nicht-viralen Gentransfers genauer erkunden.

2 MATERIAL

2.1 Zelllinien und Bakterienstämme

Sämtliche verwendete Zelllinien und Bakterien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung für Genvektoren (Wolfgang Hammerschmidt) der gsf, München. Die mit einem Stern (*) gekennzeichnete Zelllinie wurden von mir hergestellt.

2.1.1 Zelllinien und andere Zellen

Zelllinie Beschreibung

293-2089	293HEK-Zelllinien mit stabil transfiziertem maxi-EBV-Plasmid p2089, produziert nach Induktion grün fluoreszierendes Wildtyp-EBV (Delecluse, 1998)
293HEK	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch Einführung der E1a und E1b Gene von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham, 1977), bezogen bei DSMZ - Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Deutschland
293-VII+*	293HEK-Verpackungszelllinien mit stabil transfiziertem maxi-EBV-Plasmid p2831, produziert nach Induktion und Transfektion eines TR ⁺ Genvektors rekombinantes EBV (Hettich, 2006)
B95-8	durch EBV-Infektion von Krallenaffen-PBMCs entstandene lymphoblastoide Zelllinie (Miller, 1972)
B-CLL-Zellen, frisch	B-Zellen von freiwilligen Spender mit Chronisch-Lymphatischer Leukämie, isoliert über Ficoll, als Blut erhalten vom Universitätsklinikum Großhadern
<i>buffy coats</i>	Leukozytenkonzentrate aus 500ml Blut anonymer Spender, erhalten von der Landeslinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Salzburg
CD40L-Feeder	murine L-Zellen (Bindegewebsfibroblasten), stabil mit CD40-Ligand transfiziert (Garrone, 1995)

- f46P autologe polyklonale und CMV-spezifische T-Zelllinie, durch wiederholte Restimulation der T-Zellen mit bestrahlten pp65-LCLs generiert, spezifisch für das CD8-restringierte pp65-Epitop RIPHERNGFTVL, freundlicherweise von Andreas Moosmann zur Verfügung gestellt
- HeLa humane Zervixkarzinomzelllinie, bezogen bei ATCC - American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA (Jones, 1971)
- Jurkat humane Zelllinie der T-Zell-Leukämie
- LenL5 immortalisierte EBV⁻ B-Blasten-Zelllinie, generiert aus PBMCs von gesunden humanen Spender, benötigen Stimulierung durch CD40L-Feeder und 2ng/ml IL-4, freundlicherweise von Andreas Moosmann zur Verfügung gestellt
- PBMC primäre B-Lymphozyten wurden aus Blut gesunder Spender oder Adenoiden bzw. Tonsillen über einen Ficoll-Gradienten aufgereingt; die T-Zellen wurden dabei durch Zugabe von Erythrozyten aus Schafsblut abgetrennt (Zeidler, 1996) bzw. durch Zugabe von CyclosporinA ins Kulturmedium gehemmt
- Raji humane EBV⁺ Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964)
- THV1 aus dem Blut eines gesunden CMV-seropositiven Spenders hergestellte lymphoblastoide Zelllinie (LCL), generiert durch Infektion von pp65-tragenden Virusüberständen der TR⁻2/293-Zelllinie, freundlicherweise von Andreas Moosmann zur Verfügung gestellt
- TR⁻2/293 293HEK-Verpackungszelllinien mit stabil transfiziertem maxi-EBV-Plasmid p2114, produziert nach Induktion und Transfektion eines TR⁺ Genvektors rekombinantes EBV (Delecluse, 1999), freundlicherweise von Henri-Jacques Delecluse zur Verfügung gestellt
- Wi38 humane Fibroblasten-Zelllinie, bezogen bei ATCC - American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA

2.1.2 *E. coli*-K12-Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
BJ5183	F ⁻ , <i>endA</i> , <i>sbcB</i> ⁻ , <i>recBC</i> ⁻ , <i>galK</i> , <i>mef</i> , <i>strR</i> , <i>thi</i> ⁻ 1, <i>bioT</i> , <i>hsdR</i> (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺), λ ⁻ (Hanahan, 1983)
DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr</i> ⁻ <i>hsdRMS</i> ⁻ <i>mcrBC</i>), F80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX</i> 74, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>araD</i> 139, Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ ⁻ , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> (GibcoBRL)
DH10B <i>Amp</i> ^r / <i>Tet</i> ^r (amber)	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr</i> ⁻ <i>hsdRMS</i> ⁻ <i>mcrBC</i>), F80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX</i> 74, <i>recA</i> 1::p3229[<i>Amp</i> ^r (amber), <i>Tet</i> ^r (amber), <i>Kan</i> ^r], <i>endA</i> 1, <i>araD</i> 139, Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ ⁻ , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>
DH5α	F ⁻ , <i>lacI</i> ⁻ , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17, Δ(<i>lacZYA</i> ⁻ <i>argF</i>), U169, F80 <i>lacZ</i> ΔM15, <i>supE</i> 44, <i>thi</i> ⁻ 1, <i>gyrA</i> 96, <i>relA</i> 1 (Hanahan, 1985)
MC1061/P3	<i>araD</i> 139, Δ(<i>araABC</i> ⁻ <i>leu</i>)7679, <i>galU</i> , <i>galK</i> , Δ <i>lacX</i> 74, <i>hsdR</i> 2 (<i>r</i> _k ⁻ , <i>m</i> _k ⁺), <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^r), <i>thi</i> ⁻ 1, <i>mcrB</i> {P3: <i>Amp</i> ^r (amber), <i>Tet</i> ^r (amber), <i>Km</i> ^r }

2.2 Plasmide

Einige der folgenden Plasmide waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Plasmide wurden von mir unter Verwendung üblicher Klonierungstechniken (Sambrook, 1989) hergestellt. Die folgende Auflistung gibt alle verwendeten Plasmide als Auszug aus der Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe Wolfgang Hammerschmidt (Abteilung Genvektoren, gsf, München) wieder.

2.2.1 Expressionsplasmide und Genvektoren

Alle Plasmide, die für Transfektionen verwendet wurden, wurden mittels EndoFree PlasmidPrep aufgereinigt.

Plasmid Beschreibung

p0509 Expressionsplasmid für BZLF1 (Hammerschmidt, 1988a)

- p0588 Klonierungsvektor, enthält *oriP*, *oriLyt*, TR und *Hyg*
- p0925 pUC19 mit 12,7kb EBV-Sequenz (#163.473 - #172.281, #1 - #3.960) der B95-8-DNA
- p1913 pCDM8-basierter Klonierungsvektor, CMV:TNF-2 Rezeptor, Expressionsplasmid für TNF-2 Rezeptor
- p1925 Expressionsplasmid für eGFP, eGFP-C1 ohne MCS
- p1933 auf p0588-basiertes Expressionsplasmid für eGFP (aus pEGFP-C1 von Clontech), beinhaltet *oriP*, *oriLyt*, TR und *Hyg*
- p2068 Vorkonstrukt für lineare Integration mit homologen Bereichen um TR, vermittelt Kanamycin-Resistenz
- p2385 Expressionsplasmid für gp350/220 (CMV-Promotor) in pcDNA3.1(+) mit Kozak-Sequenz
- p2419 Vorkonstrukt für *chromosomal building* mit homologen Bereichen um EBNA2
- p2496 Vorkonstrukt für *chromosomal building* mit homologen Bereichen um LMP1
- p2650 Expressionsplasmid für *recA* (Gruffat, 2002, Muyrers, 2000)
- p2670 Expressionsplasmid für BALF4 (gp125/110)
- p2821 Vorkonstrukt für lineare Integration mit homologen Bereichen um EBNA3-A bis -C und BZLF1, vermittelt Zeozin-Resistenz
- p2868* Expressionsplasmid für hCD40L
- p2888 Klonierungsvektor mit *oriLyt*, *DS right* des M-ABA-Stammes
- p2922* Expressionsplasmid für hCD40L, enthält *supF*
- p2923* Expressionsplasmid für hCD40L, enthält *supF* und *oriLyt* (M-ABA)
- p2924* therapeutischer Genvektor, Expressionsplasmid für hCD40L, enthält *supF*, *oriLyt* (M-ABA) und TR

- p2928* Klonierungsvektor mit *oriLyt*, *DS right* des M-ABA-Stammes, LF3-Gen durch *Xba*-Linker inaktiviert
- p3056 Expressionsplasmid für modifiziertes mRFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors
- p3100* Expressionsplasmid für mRFP, enthält *supF*, *oriLyt* (M-ABA) und TR
- p3229 basiert auf pST76-kan (Posfai, 1997), trägt die Gene für *Amp^r* (amber) und *Tet^r* (amber) aus P3 flankiert von der *recA*-Sequenz, Integrationsplasmid für DH10B*Amp^r/Tet^r* (amber)
- p3295 Genom von DH10B*Amp^r/Tet^r* (amber)
- p3303* Expressionsplasmid für mRFP, enthält *Amp*, *oriP*, *oriLyt* und TR von B95-8
- p3304* Expressionsplasmid für hCD40L, enthält *Amp*, *oriP*, *oriLyt* und TR von B95-8
- p3326* Expressionsplasmid für eGFP, enthält *supF*, *oriLyt* (M-ABA) und TR
- p3460 Expressionsplasmid für eGFP, enthält *supF*, *oriP*, *oriLyt* und TR von B95-8
- pKY102 Klonierungsplasmid, enthält *recA* (Ihara, 1985)
- pRK5 Expressionsplasmid mit CMV-Promotor, basiert auf dem pUC19-Plasmid wurde das myc-Epitop (MASMEQKLISEEDLGIP) an eine multiple Klonierungsstelle angefügt (Schall, 1990)
- pSG5 eukaryontisches Expressionsplasmid mit SV40-Promotor (Stratagene, La Jolla, USA)
- pSG-pp65 basiert auf pSG und beinhaltet das immundominante T-Zellantigen des humanen Cytomegaloviruses (CMV)
- pST76-K Klonierungsvektor für p3295, Temperatur-sensitives (30°C) *shuttle*-Plasmid mit dem Kanamycin-Resistenzgen (Posfai, 1997)

2.2.2 *maxi-EBV-Plasmide*

Plasmid Beschreibung

- p2089 Wildtyp-maxi-EBV: B95-8-DNA auf der Basis eines bakteriellen F-Plasmid (pMBO131), kodiert zusätzlich für die Markergene Hygromycin und eGFP; Helfergenom in der Zelllinie 293-2089 (Delecluse, 1998)
- p2114 Helfergenom der Verpackungszelllinie TR`2/293, maxi-EBV auf der Basis eines bakteriellen F-Faktor-Plasmids, kodiert zusätzlich für die Markergene Hygromycin und eGFP und trägt eine Deletion im Bereich der Verpackungssignale
- p2491 p2089 mit Deletion in EBNA2
- p2510 p2491 mit Deletion in LMP1
- p2827 p2510 mit Deletion in BZLF1 und EBNA3-A, -B und -C
- p2831* p2827 mit Deletion in TR; Helfergenom der Verpackungszelllinie 293-VII+

2.3 Oligodesoxynukleotide

Die Synthesen der verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion, München in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Amplifikation von *Amp^r* (amber):

amberamp5': TTACCAATGCTTAATCAGTGA

amberamp3': ATGAGTATTCAACATTTCCGT

Amplifikation von hCD40L:

hCD40L+: GCCACCATGATCGAAACATACAACCAAA

hCD40L-: TCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAG

Amplifikation von *supF*:

P+ *supF*(AseI): GGGATTAATCTGGCAAGTGTAGCGGTCAC

P- *supF*(ClaI): GGGATCGATCAATAATCAATGTCTGGGCG

Amplifikation von *Tef* (amber):

ambertet5': GTGAAACCCAACATACCCCTG
ambertet3': TCAGCGATCGGCTCGTTGCC

Nachweis von BLLF1 (gp350/220):

5'BLLF1chimer (CI): (GATATC)TTATACATAGGTCTCGGCGTCATC
3'BLLF1chimer (CII): (GATAT)CACGCCCCCCCCAAAATGCAACGTCTG

Nachweis von BZLF1:

P+ BZLF1 (KI): CATTTTCTGGAAGCCACCCG
P- BZLF1 (KII): TGAAGATGATGGACCCAAACTCG

Nachweis von BZLF2 (gp42):

BZLF2-C2 (AI): (CAATT)GCTATTTGATCTTTGA
BZLF2-N1 (AII): TGGTTTCATTTAAGCAGGTG

Nachweis von EBNA1:

P+ EBNA1 (LI): CCAGTAGTCAGTCATCATCATCCG
P- EBNA1 (LII): TGGAAACCAGGGAGGCAAATC

Nachweis von EBNA2:

P+ EBNA2 (GI): TGCTATGCGAATGCTTTGGATG
P- EBNA2 (GII): TTGAGTCTTAGAGGGTTGCGGG

Nachweis von EBNA3-A:

P+ EBNA3A (HI): CCCATCACACAACAACAAGGTAAG
P- EBNA3A (HII): AAGTCTATCCCATACGCACGACC

Nachweis von EBNA3-B:

P+ EBNA3B (II): GAGGAGGAAGACAAGAGTGGAATG
P- EBNA3B (III): TTTCGTTGGGTCATCTGGAGTC

Nachweis von EBNA3-C (unter Verwendung von 3% DMSO):

P+ EBNA3C (JI): CGGGCTGTCAAGGTGAGTATG
P- EBNA3C (JII): ATGAAACGCACGAAATCTAAAAG

Nachweis von LMP1:

LMP F3-N-term. (DI): AGTAAGCACCCGAAGATGAAC

LMP-B2-ges. (DII): CCGCAAATCCCCCG

Nachweis von TR (unter Verwendung von 6% DMSO):

TO/F: CGCCGTTGGAGGGTAGAATG

TO/B: TGTCAGCAGTTTCCTTTGTGC

2.4 Enzyme, Proteine und Antikörper

Artikel	Bezugsquelle
[α - ³² P]-dCTP (3.000Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg
APC-gekoppelter Isotyp	BD Biosciences, Heidelberg
APC-gekoppelter α -CD154-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
APC-gekoppelter α -CD54-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
APC-gekoppelter α -CD86-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
APC-Kügelchen (<i>beads</i>), Volumenstandard	BD Biosciences, Heidelberg
Cy3- α -Maus (Ziege/IgG)	Dianova, Hamburg
CyC-gekoppelter Isotyp	BD Biosciences, Heidelberg
CyC-gekoppelter α -CD19-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
CyC-gekoppelter α -CD3-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
CyC-gekoppelter α -CD80-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
DNA modifizierende Enzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA modifizierende Enzyme	New England Biolabs, Frankfurt
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
FITC-gekoppelter Isotyp	BD Biosciences, Heidelberg

FITC-gekoppelter α -CD154-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
FITC-gekoppelter α -CD19-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
FITC-gekoppelter α -CD21-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
IL-4	PAN Biotech, Aidenbach
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie, München
PE-gekoppelter Isotyp	BD Biosciences, Heidelberg
PE-gekoppelter α -CD154-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
PE-gekoppelter α -CD19-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
PE-gekoppelter α -CD5-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie, München
VCA (gp125/110)	Chemicon, Hampshire, UK
<i>Xba</i> -Linker	New England Biolabs, Frankfurt

2.5 Chemikalien, Standards und Kits

Artikel	Bezugsquelle
12-O-Tetradecanocyl-Phorbol-13-Azetat, TPA	ICN, Eschwege
4',6-Diamidino-2-phenylindol, DAPI	Sigma-Aldrich Chemie, München
Aceton reinst	Merck, Darmstadt
Agarose	ICN, Eschwege
Ampicillin, <i>Amp</i>	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Borsäure, H_3BO_3	Merck, Darmstadt

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, München
Calciumchlorid, CaCl_2	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid, CsCl	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol, <i>Cm</i>	Sigma-Aldrich Chemie, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
CyclosporinA	Novartis, Nürnberg
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, München
di-Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
EndoFree PlasmidPrep	Qiagen, Hilden
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol reinst	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1%	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Merck, Darmstadt
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Größenstandards für Agarosegele	New England Biolabs, Frankfurt
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
HexaLabel DNA Labeling Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
HygromycinB (<i>Hyg</i>)	PAA, Cölbe

IFN- γ ELISA Kit	Mabtech AB, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kälberthymus-DNA	Sigma-Aldrich Chemie, München
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kanamycin, <i>Kan</i>	Merck, Darmstadt
K-MES	Sigma-Aldrich Chemie, München
Magnesiumchlorid, MgCl_2	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat, MgSO_4	Merck, Darmstadt
Manganchlorid, MnCl_2	Merck, Darmstadt
Maxi-Präparationskit für Plasmidaufbereitung (Jetstar)	Genomed, Löhne
Natriumbutyrat, Butyrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat, SDS	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, NaOH	Merck, Darmstadt
Nitrophenylphosphat-Substratlösung, Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Bio-Rad Laboratories, München
Paraformaldehyd, PFA	Serva, Heidelberg
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe

Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid, RbCl	Merck, Darmstadt
Salzsäure, HCl	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Tetracyclin, <i>Tet</i>	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Tween20, Monolaurat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.6 Zellkulturmedien

2.6.1 Medien für prokaryontische Zellen

LB-Agarplatten

1 l	LB-Medium
15 g	Bacto-Agar

LB-Medium

1 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
0,5 %	NaCl

SOB-Medium

2 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄

SOC-Medium

2 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
0,2 %	Glucose

2.6.2 Medien für eukaryontische Zellen

Artikel	Bezugsquelle
fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Iscove's Medium	Biochrom, Berlin
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Schafsblut	Oxoid, Wesel
Zellkulturmedium RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Stammlösungen und Puffer

Die für die Arbeit mit Bakterien und Nukleinsäuren bestimmten Lösungen und Medien wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert (Sambrook, 1989). Für Medien wurde entionisiertes Wasser verwendet, während alle anderen Lösungen mit Wasser aus einer Millipore-Reinigungsanlage angesetzt wurden. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Aufbewahrung der Lösungen bei RT.

4% PFA

40mg/ml in der Hälfte des Endvolumens H₂O bei 100°C unterm Abzug rühren (nicht kochen), mit 2xPBS auf 80% des Endvolumens auffüllen, pH7,3 einstellen, mit 2xPBS auf Endvolumen auffüllen, ÜN bei 4°C inkubieren, portionsweise lagerbar bei -20°C

Agarose-Auftragspuffer (10x)

1 mg/ml Bromphenolblau

1 mg/ml Xylencyanol

50 % (v/v) Glycerin

Aufbewahrung bei -20°C

Ampicillin (*Amp*)-Stammlösung

100 mg/ml in H₂O, sterilfiltrieren (Aufbewahrung bei -20°C)

Chloramphenicol (*Cm*)-Stammlösung

34 mg/ml in Ethanol, sterilfiltrieren (Aufbewahrung bei -20°C)

CsCl-Lösung 1,55g/ml**Hybridisierungspuffer nach Church, pH7,2**

400 mM Na₂HPO₄

100 mM NaH₂PO₄

7 % SDS

1 mM EDTA

Kanamycin (*Kan*)-Stammlösung

30mg/ml in H₂O, sterilfiltrieren (Aufbewahrung bei -20°C)

PBS (10x), pH7,0

8 % NaCl

0,2 % KCl

1,4 % Na₂HPO₄

0,2 % KH₂PO₄

PBST (0,1%)

0,1 % (v/v) Tween20 in 1xPBS

Phenol (mit Wasser gesättigt)

Kristallines Phenol $\geq 99\%$ (unter Schutzgas destilliert) wird bei 65°C im Wasserbad geschmolzen, mit 1/2Volumen Wasser gemischt (Aufbewahrung bei 4°C lichtgeschützt)

Phenol/Chloroform

Mit Wasser gesättigtes Phenol wird im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol gemischt (Aufbewahrung bei 4°C)

SSC (20x)

3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat

TAE-Laufpuffer

1 mM	EDTA
20 mM	Essigsäure
40 mM	Tris

TBE-Laufpuffer

2 mM	EDTA
89 mM	Tris
89 mM	H_3BO_3

TE-Puffer

1 mM	EDTA
10 mM	Tris/HCl pH8,0

Tetracyclin (Tet)-Stammlösung

12,5 mg/ml in Ethanol, sterilfiltrieren (Aufbewahrung bei -20°C)

TFB-Puffer

10 mM	K-Mes pH6,2
50 mM	CaCl_2
45 mM	MnCl_2
100 mM	RbCl

2.8 Sonstiges Material

Artikel	Bezugsquelle
8-Loch-Objekträger	Medco, München
96-Kammerplatte maxisorp	Nunc, Wiesbaden
DNA-Adsorptionssäulen Nucleobond AX500	Macherey-Nagel, Düren
Drigalski-Spatel	A. Hartenstein, Würzburg
Einmalkanüle 2,1x38mm	Bovi-Vet, Kruuse, Marslev, Dänemark
Einmalküvetten 10x10x48mm	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalküvetten für BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen steril, unterschiedliche Größen	B. Braun, Melsungen
Elektroporationsküvetten (1mm Plattenabstand)	Peqlab, Erlangen
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon-Röhrchen 15ml, 50ml	BD Biosciences, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtereinheit 0,8µm	Schleicher & Schuell, Dassel
G50-Sepharose-Säulen	Amersham Biosciences, Freiburg
Hellendahl-Färbekammer	A. Hartenstein, Würzburg
Hybridisierungsflasche	A. Hartenstein, Würzburg
Impfösen	Nunc, Wiesbaden
Kammerplatten mit 6, 48, 96 Kammern	Nunc, Wiesbaden

Kryoeinfrierbox	Nunc, Wiesbaden
Kryoröhrchen Cryotube	Nunc, Wiesbaden
Labortücher	Kimberly-Clark, Worldwide
Lipofectamin-Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Metafectene Zelltransfektionsreagenz	Biontexp, München
Mikroliterpipetten	Gilson, Middleton, USA
Neubauer-Zählkammer	A. Hartenstein, Würzburg
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark, Worldwide
Nylonmembran HybondN+	Amersham Biosciences, Freiburg
Pasteur-Pipetten	A. Hartenstein, Würzburg
Plastikpetrischalen	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße verschiedener Größe	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme XAR5	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Röntgenkassette	A. Hartenstein, Würzburg
Skalpell	A. Hartenstein, Würzburg
Sterilfiltersystem rapid 500 (0,2µm)	TPP, Schweiz
SuperFrost-Objektträger, silanisiert	Menzel-Gläser, Braunschweig
Ultrazentrifugen-Röhrchen, #91-90198	G. Kisker, Steinfurt
Whatman-Papier 3mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen, unterschiedliche Größen	Nunc, Wiesbaden
Zellsieb, 100µm	BD Biosciences, Heidelberg

2.9 Geräte und Software

Artikel	Bezugsquelle
Analysenwaage	Scaltec, Göttingen
Avanti J25 Zentrifuge	Beckmann, Heidelberg
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
CELL Quest	BD Biosciences, Heidelberg
CO ₂ -Inkubator Unitherm 170	Uni Equip, Martinsried
DNA-Sequenzierungen	Sequiserve, Vaterstetten
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Eisfach	Siemens, München
Eismaschine	Scotsman, Mailand, I
Elektronikrührer Monotherm	VarioMag, Daytona Beach, USA
Elektrophorese-Kammern	Peqlab, Erlangen
Elektroporationsgerät GenePulser	Bio-Rad Laboratories, München
ELISA-Analysegerät	Tecan, Grödig, A
EndNote 8.0	ISI Researchsoft, Carlsbad, USA
Feinwaage 440-47	Kern, Balingen
FreeHand MX	Macromedia, München
Gammazell40 (¹³⁷ Cs)	AECL, Missisauga, Canada
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach/Riss
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus, Hanau
Glaspipetten 5ml, 10ml, 25ml	Brand, Wertheim

inverses Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 10	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
Kühlschrank	Siemens, München
Kühlschrank economic	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
L7-55 Ultrazentrifuge	Beckmann, Heidelberg
Laborzentrifuge 2K15	Sigma-Aldrich Chemie, München
MacVector 7.2.3	Accelrys, Cambridge, UK
Microsoft Excel für Mac	Microsoft, Unterschleißheim
Microsoft Word für Mac	Microsoft, Unterschleißheim
PCR-Gerät	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrast-Mikroskop, Axiovert 25	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
pH-Meter MultiCal R pH526	WTW, Weilheim
Pipetboy	IBS-Integra Biosciences, Fernwald
Pipettenspitzen 10µl, 20µl, 200µl, 1ml	Peske GmbH, Aindling-Arnhofen
Prism 4.0 for Mac	GraphPad Software, San Diego, USA
Reagenzglasmixer Vortex-Mixer 7-2020	neoLab, Heidelberg
Robocycler	Stratagene, La Jolla, USA
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstoff-Tiefkühlagereinrichtung	Messer Group, Sulzbach
Szintillationszähler „TopCount“	Packard Bioscience, Dreieich
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	GFL, Burgwedel

Xread Plus

Tecan, Grödig, A

Zeitmesser

A. Hartenstein, Würzburg

Zentrifuge Varifuge 3.0RS

Heraeus, Hanau

3 METHODEN

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agarplatten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenzen gegen ein oder mehrere Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampicillin mit einer Endkonzentration von 50µg/ml, Chloramphenicol mit einer Endkonzentration von 50µg/ml, Tetracyclin mit einer Endkonzentration von 10µg/ml und/oder Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50µg/ml zugegeben. Zum Anlegen von Stammkulturen wurden bis zur Sättigung gewachsene Flüssigkulturen mit 20% Glycerin versetzt und in einem Cryoröhrchen bei -80°C tiefgefroren.

Es wurde mit dem Laborstamm DH5α des Bakteriums *E. coli* für Plasmide üblicher Größe (bis ca. 15kb), für größere Plasmide alternativ mit dem *E. coli*-Stamm DH10B gearbeitet. Der *recBC⁻* *E. coli*-Stamm BJ5183 fand bei der Neukonstruktion von Plasmiden durch homologe Rekombination Verwendung.

3.1.2 Transformation und Elektroporation von *E. coli*

Plasmide lassen sich auf zwei Arten in *E. coli*-Zellen einschleußen, durch Hitzeschock oder durch Elektroporation. Die Transformation ist milder für die prokaryontische Zelle, die Elektroporation ist effizienter und somit besser für große Plasmide oder zur genetischen Modifikation am Plasmid geeignet. Für beide Methoden werden kompetente Bakterien benötigt.

3.1.2.1 Transformation

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch Inkubation entsprechender Kulturen in TFB-Puffer auf Eis (Hanahan, 1985). 30ml entsprechender Bakterien-Kultur wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 angezogen, abzentrifugiert und in TFB-Puffer auf Eis inkubiert, 10min bei 3.500rpm zentrifugiert und anschließend in 2,4ml TFB-Puffer aufgenommen. Zuletzt wurden die kompetenten Zellen in 200µl-Portionen aliquotiert. Die kompetenten Bakterien können bei -80°C aufbewahrt werden.

Für eine Transformation wurden zu einem bestimmten Aliquot (meist 200µl) der so

behandelten Zellen ca. 50ng eines Ligierungsansatzes bzw. 1ng Plasmid-DNA und 7 μ l DMSO pipettiert und für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz für 2min bei 42°C im Wasserbad erwärmt. Nach sofortiger Zugabe von Glukose-supplementiertem SOC-Medium und einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C wurde die Zellsuspension zentrifugiert, das Pellet in 100 μ l Medium auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.2.2 Elektroporation

EBV-Plasmid-DNA oder lineare DNA-Fragmente zur homologen Rekombination wurden durch Elektroporation (Chuang, 1995, Sheng, 1995) in den *E. coli*-Stamm DH10B eingebracht. Zur Herstellung elektrokompenter DH10B-Bakterien wurden diese bei 37°C in 400ml Flüssigkultur in SOB-Medium aus einer Vorkultur vermehrt und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Diese Bakterienkultur wurde auf Eis gekühlt, die Bakterien 5min bei 6.000rpm abzentrifugiert und mit 400ml kaltem destilliertem Wasser, dann zweimal mit 50ml kaltem 10%-igem Glycerol gewaschen, in 2ml 10%-igem Glycerol resuspendiert, in 100 μ l-Anteile aliquotiert und entweder frisch verwendet oder auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die elektrokompenten Bakterien falls nötig auf Eis aufgetaut, es wurde das Plasmid (500ng-3 μ g DNA) oder Ligationsprodukt zugegeben und in gekühlten Küvetten mit 1mm Spaltbreite unter Benutzung eines Elektroporationsgerätes elektroporiert. Ein Kondensator der eingestellten Kapazität 25 μ F wurde durch Anlegen einer Spannung von 1,8kV aufgeladen und über die Probe, mit einem in Reihe geschalteten Widerstand von 100 Ω , entladen. Eine Entladungszeit von über 2ms bestätigte den genügend hohen Widerstand der Probe. Die Bakterien wurden sofort in 1ml SOC-Medium überführt und nach 1h phänotypischer Expression bei 37°C auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.2 Zellkultur und Arbeiten mit Viren

3.2.1 Grundtechniken der Zellkultur

3.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C unter 5% Kohlendioxid und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Zellpelletierungen und Waschschr

wurden immer, wenn nicht anders vermerkt, durch Zentrifugation für 10min bei 1.200rpm und 20°C in einer Heraeus-Varifuge 3.0 RS durchgeführt. Medien und Zusätze wurden von Biochrom oder Invitrogen bezogen. Alle verwendeten Medien wurden mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) und Antibiotika (100µg/ml Streptomycin und 100U/ml Penicillin) supplementiert. Glutamin war als N-Acetylalanylglutamin bereits im Medium enthalten.

Standardmedium für Suspensionszellen wie Raji und LCLs war supplementiertes RPMI 1640. Alle 3-4 Tage wurde sie 1:4 - 1:10 verdünnt. Auch die Fibroblastenzelllinien CD40L-Feeder wurden in RPMI 1640-Kulturmedium (supplementiert) vermehrt und alle 3-4 Tage 1:10 verdünnt. Zum Ablösen und Verdünnen dieser adhären Zellen wurden sie nach Entfernen des Kulturmediums mit Trypsin benetzt. Nach ca. 3-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abgespült und ein Teil in frisches Vollmedium überführt. Vor einer Kokultur mit primären B-Lymphozyten wurden die Fibroblasten für 90min mit einer 50Gy-Strahlung behandelt, um deren Proliferation zu stoppen.

Optimale Zellkulturbedingungen für primäre B-Lymphozyten und B-CLL-Zellen wurden durch Kultivierung mit Iscove's-Medium (supplementiert) geschaffen. Um rekombinante Viren in eben diesem Medium gewinnen zu können, wurden alle 293HEK-Zelllinien in supplementiertem (10% FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) Iscove gehalten. 293HEK-Zelllinien mussten alle 3-4 Tage ca. 1:10 verdünnt werden. Bei den maxi-EBV-tragenden 293HEK-Zelllinien wie 293-2089 oder TR²/293 enthielt das Medium zusätzlich 100µg/ml des Antibiotikums Hygromycin zur Aufrechterhaltung des episomalen maxi-EBV-Plasmids.

3.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension mit einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung (in 1xPBS) gemischt.

Der Farbstoff dringt nur in tote Zellen ein, weshalb sich im Mikroskop anhand der Blaufärbung tote von vitalen, ungefärbten Zellen unterscheiden lassen. Die Zählkammer hat ein Zählgitter aus 4 großen Quadraten mit je einer Seitenlänge von 1mm unterteilt in 16 Kleinquadrate. Mit der Tiefe von 0,1mm ergibt sich ein Volumen von $0,1\text{mm}^3$ (=0,1µl) für ein Großquadrat. Die Zahl der in einem Großquadrat gezählten Zellen muss daher mit 10.000 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, daraus ergibt sich die

Zellzahl pro ml.

3.2.1.3 Lagerung von Zellen über längere Zeiträume

In Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) können Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden etwa 10^7 Zellen abzentrifugiert und in 1ml des entsprechenden Mediums, das 10% FCS und 10% DMSO enthielt, resuspendiert und in ein 2ml-Cryotube pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in einer Isopropanol-isolierten Einfrierbox langsam über Nacht auf -80°C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur Dauerlagerung in der Gasphase über flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Die Zellen wurden in ein Falcon-Röhrchen, das 50ml vorgewärmtes Medium (mit 10% FCS) enthielt, überführt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen im Brutschrank kultiviert.

3.2.1.4 Isolation von humanen primären Lymphozyten aus Vollblut oder Gewebe

B-CLL-Zellen für Infektionsexperimente wurde aus Vollblut eines Patienten gewonnen, welches freundlicherweise von der Leukämie-Station des Universitätsklinikums Großhadern bereitgestellt wurde. Primäre B-Lymphozyten für Infektions- oder Transformationsversuche wurden aus Vollblut isoliert oder aus Gewebe wie Adenoid oder Tonsille nach Routineentnahmen. Auch sogenannte *buffy coats* dienen als Quelle für primäre Lymphozyten. Dabei handelt es sich um durch Zentrifugation aufkonzentrierte Blutproben, in denen das Plasma und der überwiegende Teil der Erythrozyten entfernt worden ist.

Aus den Adenoiden sowie den Tonsillen wurde zunächst durch mechanisches Zerkleinern und Filtrieren durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von $100\mu\text{m}$ eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Zellen mehrmals mit 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden in 60ml 1xPBS resuspendiert. T-Lymphozyten wurden durch Zugabe von 0,5-1ml Schafsblut für 15min bei RT rosettiert und anschließend in einem Ficollgradienten durch Zentrifugation abgetrennt.

Die Proben wurden jeweils 1:1 mit 1xPBS vermischt und mit einer Ficoll-Trennlösung (Ficoll-Dichte 1,077) unterschichtet. Zur Aufreinigung im 30%-igen Ficoll-Gradienten

wurden die Proben bei 1.850rpm (740xg) 30min bei 4°C durch ein Ficoll-Kissen zentrifugiert und langsam abgebremst. Kurz über dem Erythrozytenpellet am Boden befindet sich nun eine dünne Schicht von Leukozyten. In der Schicht über der Interphase befindet sich verdünntes Plasma. Die Interphase zwischen schwerer und leichter Flüssigkeitsphase, die neben Monozyten fast ausschließlich B-Lymphozyten enthält, wurde abgenommen und Ficollreste sowie restliche Thrombozyten durch dreimaliges fraktioniertes Waschen der Zellen mit 1xPBS entfernt. Anschließend wurden die primären B-Zellen in Kulturmedium (supplementiert) suspendiert und meist direkt verwendet. Die Zellen können auch über Nacht bei 37°C im Inkubator aufbewahrt und am nächsten Tag für Experimente eingesetzt werden.

3.2.2 Transfektion und Virusaufarbeitung

3.2.2.1 Stabile Transfektion von Zellen und Selektion stabiler Zellklone mit Hygromycin

Für die Etablierung EBV⁺ stabiler Zelllinien wurden 293HEK-Zellen in einer Kammer einer 6-Kammerplatten bis zu einer 70%-igen Konfluenz kultiviert und dann mit 0,5µg DNA des entsprechenden maxi-EBV-Plamids transfiziert. Die Transfektion mit Lipofectamin in serumfreiem Medium (OptiMEM) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (6µl Lipofectamin pro 1µg transfizierter DNA, 200µl/45min/32°C).

Alternativ dazu wurde auch ein modifiziertes Protokoll für die Transfektion mit Metafectene verwendet (5µl Metafectene pro 1µg transfizierter DNA in Zellkulturmedium, 200µl/15-20min/RT). Nach 1-3 Tagen wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 14cm) überführt und Hygromycin (100µg/ml Endkonzentration) dem Kulturmedium hinzugegeben. In den ersten Tagen nach Transfektion wurde das Kulturmedium täglich vorsichtig gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen. Drei bis vier Wochen später wurden auswachsende Zellklone, die sich im Fluoreszenzmikroskop als positiv für die eGFP-Expression erwiesen, mittels Trypsin-Spülung vorsichtig geerntet und einzeln expandiert.

3.2.2.2 Transiente Transfektion und Generierung infektiöser Viruspartikeln

Die Zelllinien 293-2089, TR²/293 und 293-VII⁺ bzw. auch deren Derivate wurde durch Induktion des lytischen Zyklus zur Virusproduktion angeregt. Mit Hilfe von einer

Verpackungszelllinie wie TR²/293 (Delecluse, 1999) konnten EBV-basierte, TR⁺ Genvektoren in rekombinante infektiöse Viruspartikel verpackt werden. In allen Fällen wurden jeweils ca. 4×10^5 Zellen pro Kammer einer 6-Kammerplatte zur Transfektion in 2ml serumhaltigem Standardmedium ohne jegliche Antibiotika ausplattiert.

Etwa 12-24h nach dem Aussäen wurden sie mit Expressionsplasmiden für BZLF1 (p0509; 0,25µg/Kammer) und BALF4 (p2670; 0,25µg/Kammer) nach Angaben der Hersteller der Transfektionsreagenzien transient transfiziert. Die Transfektion mit Lipofectamin fand in serumfreiem Medium (OptiMEM) statt, die mit Metafectene in Antibiotika-freiem Zellkulturmedium. Verpackungszellen wurden zusätzlich mit 0,5µg/Kammer eines TR⁺ Genvektors kotransfiziert. Ein Mediumwechsel (5ml) am nächsten Tag entfernte überschüssige Transfektionsreagenz und erhöhte den Titer. Nach weiteren 3 Tagen Kultivierung bei 37°C wurden die produzierten Viren im Medienüberstand geerntet und nach zwei Zentrifugationsschritten (1.200rpm/10min, 5.000rpm/20min) vorsichtig ohne Druck filtriert, um Zelltrümmer abzutrennen (Porengröße 0,8µm). Virusüberstände können über mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.2.2.3 Konzentration von Virusüberständen

Bei Experimenten, in denen eine höhere Konzentration an Viruspartikel benötigt wurde, als mit den gereinigten Überständen erreicht werden konnte, wurden die infektiösen Partikel in den Überständen aufkonzentriert. Dies geschah durch eine 3-stündige Ultrazentrifugation bei 20.000xg (12.500rpm) und 10°C in einem SW28-Ausschwingrotor. Die Viruspellets wurden in einem kleineren Volumen (zwischen 1/10 und 1/30) serumhaltigem Standardmedium aufgenommen und über Nacht bei 4°C zur vollständigen Resuspendierung inkubiert. Nach erneuter Filtration wurden die konzentrierten Überstände für Infektionsversuche eingesetzt.

3.2.3 Infektion mit Virusüberständen und Infektionsinhibierung

3.2.3.1 Infektion von Zellen für Immunfluoreszenz-Analyse oder Durchflusszytometrie (FACS)

Die Quantifizierung des Titers verschiedener Virusüberstände erfolgte mit Hilfe der eGFP-Expression infizierter Raji-Zellen. Durch Infektion weiterer Zellarten ließen sich Aussagen über die Qualität der rekombinanten Viren treffen und Rückschlüsse auf

Gentransfer ziehen.

Pro Kammer wurden 1×10^5 der zu infizierenden Zelllinien in 1ml Virusüberstand (nicht konzentriert oder konzentriert) bei 37°C in 48-Kammerplatten inkubiert. Zwei Tage nach der Infektion kann durch Zugabe von TPA (20ng/ml Endkonzentration) und Butyrat (3mM Endkonzentration) ins Kulturmedium die eGFP-Genexpression verstärkt werden. Am dritten Tag wurden die Zellen in 1xPBS gewaschen und mittels Mikroskopie oder Durchflusszytometrie untersucht.

Zum Nachweis der eGFP-Expression wurden die Zellen *in situ* mit Licht der Wellenlänge 450-490nm bestrahlt und mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskopes mikroskopiert und die Anzahl eGFP⁺ Raji-Zellen bestimmt. Durch Vergleich mit der Gesamtzahl an Raji-Zellen, die durch Mikroskopie ermittelt wurde, ließ sich der Virustiter berechnen.

3.2.3.2 Infektion von primären B-Zellen mit maxi-EBVs zur Bestimmung der Immortalisierungseffizienz

EBV⁻ primäre humane B-Lymphozyten aus Adenoiden, Tonsillen oder Blut wurden mit dem virushaltigen Zellüberstand gemischt und mit einer Konzentration von 1×10^5 B-Zellen in 100 μl RPMI 1640 mit 10% FCS pro Kammer auf eine Schicht von letal bestrahlten (75Gy) humanen Wi38-Fibroblastenzellen (1×10^4 Zellen/Kammer) in 96-Kammerplatten ausplattiert. Die Kokultur mit Fibroblastenzellen verbessert die Überlebensfähigkeit der primären B-Zellen für mehrere Tage. Einen Tag nach Viruszugabe wurden 100 μl Medium durch die gleiche Menge frischen Mediums mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CyclosporinA zur T-Zell-Inhibition ersetzt. Einmal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach 6-8 Wochen konnte der prozentuale Anteil der Kulturgefäße mit proliferierenden B-Lymphozyten bestimmt werden.

Für die Bestimmung der Transformationseffizienz verschiedener maxi-EBV-Mutanten wurden nur Verdünnungsstufen in die Kalkulation einbezogen, die die statistischen Voraussetzungen eines Einzelereignisses erfüllten (Frisan, 2001).

3.2.4 Zellanalysen

3.2.4.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Expression lytisch induzierbarer EBV-Proteine sowie die transiente Expression von Proteinen nach Transfektion wurde durch Immunfärbungen nachgewiesen. Induzierte maxi-EBV-tragende 293HEK-Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen, auf einem 8-Loch-Objektträger getrocknet und für 20min in Aceton fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern 30min bei 37°C in einer feuchten Kammer (erhöhte Luftfeuchte durch Wasser auf dem Boden eines geschlossenen Gefäßes) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen des Objektträgers mit 1xPBS in einer Hellendahl-Färbekammer wurden die Zellen mit einem zweiten, Cy3-konjugierten Sekundärantikörper für weitere 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen und in einer 10%-igen 1xPBS/Glycerin-Lösung eingebettet. Zur Analyse wurden die gefärbten Zellen mit Licht der Wellenlänge 546nm bestrahlt und mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 10) mikroskopiert.

3.2.4.2 Durchflusszytometrie

Nach Färbung von Zellen mit Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kann man im Durchflusszytometer auf der Basis einzelner Zellen bestimmen, wieviele Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau auf der Oberfläche erreicht wird. Exprimieren die Zellen Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. eGFP, ist keine zusätzliche Färbung mit einem Antikörper nötig im Gegensatz zur Detektion einer Antigenexpression auf der Zelloberfläche. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit nicht infektiösem Kulturüberstand inkubiert wurden oder die mit Isotyp-Kontrolle gefärbt wurden.

Dazu wurden 1×10^5 - 1×10^6 der zu analysierenden Zellen in kaltem 1xPBS mit 5% FCS gewaschen. Anschließend folgte falls notwendig eine Inkubation der Zellen zusammen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (monoklonal) 20min auf Eis. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit dem humanen Isotyp-IgG1 Antikörper (monoklonal) detektiert. Nach zweimaligem Waschen in 1xPBS mit 5% FCS wurde die Oberflächenexpression in einem Durchflusszytometer (FACSCalibur) gemessen. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl an eGFP⁺ Raji-Zellen wurde eine definierte Menge an APC-Kügelchen (*beads*) als Volumenstandard zugegeben. In dem

Gerät wird jede Zelle von einem Laserstrahl getroffen und kann anhand der spezifischen Streuung und Fluoreszenz einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden. Anhand der Messdaten konnte der Titer berechnet werden.

3.2.4.3 Nachweis der IFN- γ -Produktion nach spezifischer Stimulierung der T-Zellen mittels ELISA

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung von IFN- γ -Konzentrationen in Zellkulturüberständen ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. PBMCs oder T-Zellen wurden ca. in dem Verhältnis 5:2 mit Stimulatorzellen, etwa infizierten B-CLL-Zellen oder mit Exosomen inkubierte LCLs, 12-36h bei 37°C und 5% CO₂ koinkubiert. Die Überstände wurden auf eine 96-Kammerplatte gegeben, die zuvor mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes IFN- γ über Nacht bei 4°C beschichtet, gewaschen (0,05% Tween20 in 1xPBS) und mit Standardmedium für eine Stunde blockiert worden war. Zusammen mit einer Standardverdünnungsreihe von humanem IFN- γ als Konzentrationsstandard (im Kit enthalten) wurde die Platte zwei Stunden bei RT stehen gelassen. Nach drei weiteren Waschgängen wurde ein biotinylierter monoklonaler Antikörper gegen ein zweites Epitop des humanen IFN- γ zugegeben und eine Stunde inkubiert. Nach weiterem Waschen folgte die Zugabe von alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin. Nach einer Stunde wurde ungebundenes Enzym gewaschen und Nitrophenylphosphat-Substratlösung (Alkaline Phosphatase Substrate Kit von Bio-Rad) zugegeben. Sobald sich eine deutliche gelbe Farbe entwickelt hatte, wurde die Absorption bei 405nm im ELISA-Lesegerät in zeitlichen Abständen mehrmals gemessen.

3.2.4.4 Konfokale Lasermikroskopie

Zur Charakterisierung der Exosomen nach Inkubation mit Raji-Zellen wurde eine Konfokale Lasermikroskopie durchgeführt. Pro Messung wurden etwa 5×10^4 Zellen benötigt.

Nach Inkubation mit Exosomen-haltigen Überständen wurden die Zellen in 1xPBS gewaschen. Durch Resuspension der Zellen in 1ml raumtemperiertem 4% PFA wurden die Zellen 10min bei RT fixiert, anschließend abzentrifugiert, auf einen SuperFrost-Objektträger aufgetropft und im Dunkeln bei RT getrocknet. Mit Hilfe der 2-minütigen

DAPI-Färbung wurde der Zellkern angefärbt. Nach dem Waschen mit 1xPBS wurde die Probe durch ein Deckgläschen in Einbettlösung luftblasenfrei abgeschlossen, mit Nagellack versiegelt und im Konfokalen Lasermikroskop analysiert.

3.3 DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nucleinsäuren benutzt wurden, wie z. B. Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden mittels Klenow-Polymerase, Ligierung freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse, Affinitätsmatrices oder durch Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten etc. erfolgte in Anlehnung an die Standardprotokolle (Sambrook, 1989).

3.3.1 Präparative Plasmidreinigung

3.3.1.1 Aufreinigung von Plasmiden ohne Endotoxine

Die Plasmidpräparation, bei der störende prokaryontische Endotoxine entfernt werden, erfolgte mit EndoFree PlasmidPrep nach dem Protokoll des Herstellers. Die Bakterienlyse und DNA-Präparation erfolgte in modifizierter Form nach der Methode der alkalischen Lyse.

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

Die präparative Plasmidaufarbeitung erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel und Genomed) oder durch konventionelle CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Die Menge und Reinheit der erhaltenen DNA war nach den Adsorptionssäulen geringer als nach CsCl-Gradient, aber für eine Transfektion der DNA in HEK293-Zellen ausreichend.

Für präparative Plasmidaufarbeitungen wurden jeweils 400ml einer stationär gewachsenen Bakterienkultur verwendet. Die Bakterienlyse und DNA-Präparation erfolgte in modifizierter Form nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim, 1979, Sambrook, 1989). Die gewonnene DNA wurde in insgesamt 100ml TE aufgenommen.

Zur CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wurden 110g CsCl hinzugegeben und aufgelöst. Diese Mischung wurde auf 4 Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall, 35ml), in

denen je 800µl Ethidiumbromid vorgelegt wurde, verteilt. Die UZ-Röhrchen wurden mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte für 72h bei 35.000rpm und 20°C in einer L7-55-Ultrazentrifuge. Nach dieser Zeit wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (365nm) sichtbar gemacht und die jeweils unteren Banden, die der *supercoiled*-Plasmid-DNA entsprechen, mit einer Einmalkanüle (2,1x38mm, BOVI•VET) abgezogen. Aus der Plasmid-DNA-Mischung wurde das restliche Ethidiumbromid durch Zugabe von CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Nach erfolgter DNA-Präzipitation mit Isopropanol wurde die EBV-Plasmid-DNA in TE aufgenommen.

3.3.2 Homologe Rekombination in *E. coli* zur Konstruktion von maxi-EBV-Mutanten

Zur homologen Rekombination mit einem maxi-EBV-Plasmid wurden lineare DNA-Fragmente durch Elektroporation in den *recA*⁺, *recBC*⁻ *E. coli*-Stamm BJ5183 (Janz, 2000) transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm trug das Rezipienten-maxi-EBV-Plasmid p2089 oder ein Derivat (p2491, p2510, p2827) davon. Nach Transformation des linearen DNA-Fragments von p2419, p2496, p2821 bzw. p2068 wurden die Bakterien eine Stunde zur phänotypischen Expression bei 37°C inkubiert. Diese wurden auf Chloramphenicol-Resistenz, vermittelt durch maxi-EBV, und Zeozin oder Kanamycin als weiteren Selektionsmarker durch das rekombinierte Fragment selektioniert.

Bei allen beschriebenen EBV-Mutanten wurde die Plasmid-DNA, die aus positiven BJ5183-Klonen gewonnen wurde, mittels eines CsCl-Gradienten aufgereinigt. Danach wurden die mutierten maxi-EBVs durch Elektroporation in DH10B Bakterien überführt und diese zur weiteren Produktion kultiviert.

3.3.3 Isolierung genomischer DNA aus primären B-Zellen

Zur Analyse des EBV-Statuses in primären B-Zellen verschiedener Spender wurde die genomische DNA aus den gereinigten Zellen isoliert.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Pfu-DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Promega bezogen, *Taq*-DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen und die PCR-Analysen jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Temperaturprofil der PCR richtete sich nach den Schmelztemperaturen der Oligodesoxynukleotide und der Länge des zu

amplifizierenden DNA-Fragmentes. Für die Extension wurden 90s pro 1.000 zu amplifizierenden Basen angenommen. In der Regel wurden 35 Zyklen durchlaufen. Die Oligonukleotide wurden von Metabion bezogen. Die Abfolge lautete: 1min/95°C, 45s/50-60°C, 1-2,5min/72°C.

3.3.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden je nach Größe in Agarosegelen geeigneter Konzentration aufgetrennt. Die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente ist dabei dem Logarithmus ihrer Größe umgekehrt proportional. Die Agarosekonzentration eines Gels betrug zwischen 0,7% und 4%. Als Laufpuffer diente 1xTBE oder 1xTAE. Die anzulegende Spannung berechnete sich aus dem Abstand der beiden Elektroden und betrug etwa 3V/cm. Zur Sichtbarmachung der Nukleinsäuren wurde das Gel nach dem Lauf für ca. 15min in einer Ethidiumbromidlösung (40ng/ml) gebadet und unter UV-Licht betrachtet.

3.3.6 Southern-Blot-Hybridisierung

10µg zellulärer DNA wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in einem Agarosegel (0,8%, 1xTAE) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde nach der Gelelektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid (40ng/ml in 1xTAE-Puffer) sichtbar gemacht. Zur Vorbereitung des Transfers der DNA auf eine Nylonmembran wurde das Agarosegel 15min auf einem Schüttler in 0,25M HCl geschwenkt, um Strangbrüche in den DNA-Fragmenten zu induzieren. Anschließend wurde die DNA in 1,5M NaCl/1,5N NaOH für 30min denaturiert, um eine Bindung der DNA-Einzelstränge an die verwendete Trägermembran zu ermöglichen, und durch kapillaren Transfer auf eine Nylonmembran (HybondN+) übertragen. Für den Transfer wurde das Gel auf eine Frischhaltefolie gelegt, die Membran luftblasenfrei aufgelegt und darüber einige Lagen Whatman-Papier und Zellstoff, sowie ein Gewicht geschichtet. Nach 45min wurde der Transfer beendet (Southern, 1975).

Die Membran wurde 30min in 2xSSC gewaschen und anschließend für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe verwendet. Die Prähybridisierung erfolgte in einer Glasröhre in 10ml Hybridisierungspuffer nach Church für 1h bei 65°C (Church, 1984). Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert, die radioaktiv markierte Probe (4×10^7 dpm/ml) zugegeben und die Hybridisierung an homologe DNA-Bereiche über Nacht bei 65°C durchgeführt.

Die hybridisierten Nylonfilter wurden bei 65°C zunächst für 10min in 2xSSC; 0,1% SDS und im Anschluß daran 2x20min in 0,1xSSC; 0,1% SDS gewaschen. Die Filter wurden in Frischhaltefolie gepackt und unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -80°C auf einen Röntgenfilm autoradiographiert. Die Dauer der Exposition zwischen 1min und mehreren Stunden richtete sich nach der Intensität der radioaktiven Strahlung.

3.3.7 Plasmid-Rückgewinnung

Zur Bestätigung der genetischen Zusammensetzung des Helfergenoms wurde das zirkuläre maxi-EBV-Plasmid aus 293HEK-(Verpackungs-)Zellen nach einem Protokoll von Griffin (Griffin, 1981) isoliert. Die isolierte DNA wurde anschließend durch Elektroporation in den *E. coli* Stamm DH10B überführt (siehe Kapitel 3.1.2.2).

Von den zu analysierenden Zellen wurden ca. 1×10^7 abzentrifugiert, mit 1xPBS gewaschen und in 2,1ml TE aufgenommen und durch Zugabe von 1% SDS lysiert. Nach Zugabe von 50µl Proteinase K (10mg/ml, 50µg/ml Endkonzentration) wurden die lysierten Zellen 2-3h bei 50°C bzw. über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die zelluläre DNA nach einem modifizierten Protokoll von Bernhard Hirt extrahiert (Hirt, 1967). Nach Zusetzen von 1ml 5M NaCl (0,3M Endkonzentration) wurde die Suspension kräftig geschüttelt und für 30min bei 15.300rpm in einer Sigma-Zentrifuge mit einem HS4-Ausschwingrotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit zweifachem Volumen Ethanol präzipitiert, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen TE (ca. 500µl) über Nacht resuspendiert.

Nach Extraktion wurde die Plasmid-DNA in den *E. coli*-Stamm DH10B durch Elektroporation transformiert und auf Agarplatten mit Kanamycin selektioniert. Die DNA einiger der ausgewachsenen Klone wurden aufgereinigt und die rückgewonnene Plasmid-DNA durch Restriktionshydrolyse mittels *Bam*HI und *Bg*II, Gel-Elektrophorese und PCR auf Richtigkeit getestet.

3.3.8 Konstruktion der Genvektoren

Die Konstruktion der neuen Genvektoren erfolgte mit einfacher Klonierung. Alle Klonierungsschritte wurden in den Bakterienstämmen DH5α oder DH10B durchgeführt. Alle Plasmide, die als Selektionsmarker *supF* enthalten, wurden in dem Bakterienstamm MC1061/P3 bzw. DH10B *Amp^r/Tet^r*(amber) propagiert.

3.3.8.1 Genvektor p2924

Das Gen des humanen CD40 Liganden, hCD40L, wurde mittels PCR von einer cDNA humaner peripherer mononukleärer Zellen, welche freundlicherweise von Herrn Mailhammer zur Verfügung gestellt wurde, amplifiziert und zwischen CMV-Promotor und Polyadenylierungsstelle nach Linearisierung des pRK5-Plasmids mit *EcoRI* und *HindIII* (Klenow) eingefügt. Das hCD40L-Expressionsplasmid heißt p2868. Zur Klonierung des Genvektors p2924 wurde mittels *XmnI* die Expressionskassette von hCD40L unter der Kontrolle des CMV-Promotors gewonnen.

Auch p2888, welches den *oriLyt* des M-ABA-Stammes trägt (Bornkamm, 1980, Freese, 1983), musste vorab modifiziert werden. Durch Einfügen des *Xba*-Linkers an der zuvor durch *XcmI* und Mung Bean-Nuklease-Behandlung geöffneten Schnittstelle wurde das in unmittelbarer Nähe zum *oriLyt* liegende LF3-Gen unterbrochen und somit inaktiviert. Es entstand das Plasmid p2928. Durch Restriktionsverdau mit *StuI* und *MscI* erhält man *oriLyt* von M-ABA in linearisierter Form.

Das eigentliche Basisplasmid p1913 des Konstruktes p2924 enthält als Selektionsmarker *supF*. Aus p1913 wurde TNF-2R mitsamt Promotor und Polyadenylierungssequenz mittels *MluI* und *BamHI* entfernt, die überstehenden Enden durch das Klenow-Enzym aufgefüllt und durch die linearisierte Expressionskassette von hCD40L über glatte Enden ersetzt (p2922). *NheI*-Verdau und Klenow-Behandlung linearisierten p2922 für die Ligierung mit dem *oriLyt*-Fragment, es entstand p2923. Zuletzt wurde dem Plasmid p0588 mittels *EcoRI* und *PagI* die TR entnommen und die überhängenden Enden des Fragmentes durch Klenow-Behandlung aufgefüllt. Dieses TR-Fragment wurde nach Öffnen von p2923 durch *Psp1406I* und Klenow eingesetzt.

3.3.8.2 Genvektoren p3100 und p3326

Auf der Basis von p2924 wurde für p3100 und p3326 die hCD40L-Kassette entfernt und durch mRFP bzw. eGFP ersetzt. Das Plasmid p3056 diente als Quelle für das mRFP-Gen, welches mittels *BamHI* und *EcoRI* (Klenow) entnommen und in das nach Schneiden mit *Clal* und *HindIII* (Klenow) linearisierte p2924 ligiert wurde. Für eGFP wurde p2924 mit *Scal* und *NdeI* geschnitten und mit dem Fragment aus p1925 nach *NdeI*- und *SspI*-Verdau verbunden.

3.3.8.3 Genvektoren p3303 und p3304

Diese beiden Genvektoren stellen die Pendanten zu p1933 dar. Als Basisplasmid diente p0588, welches mittels *Hind*III und Klenow linearisiert wurde. Für p3303 wurde die mRFP-Kassette aus p3100 und für p3304 die hCD40L-Kassette aus p2923 jeweils durch Schneiden mit *Mun*I und *Avr*II (Klenow) entnommen.

3.3.8.4 Genvektor p3460

Im Falle des Genvektors p3460 wurde *supF* mittels PCR aus p2924 amplifiziert und aufgereinigt. Dieses Fragment wurde an den durch die Primer eingefügten Schnittstellen für *Ase*I und *Cla*I verdaut und als *sticky ends* mit dem ebenfalls durch *Ase*I und *Cla*I linearisierten p1933 ligiert.

4 ERGEBNISSE

Viren haben sich im Laufe der Evolution zur eigenen Reproduktion hervorragend an unterschiedlichste Bedingungen angepasst. Ihre Fähigkeit, humane Zellen als Wirt effizient zu infizieren, wird nun für virusbasierte Therapieansätze genutzt. Geeignete Viren sind neben effizienter Infektion auch in der Lage, therapeutisch relevante DNA-Abschnitte in die Wirtszelle einzuschleusen. Ein enges Wirtsspektrum ist bei den meisten Anwendungen vorteilhaft, um eine zielgerichtete Infektion und damit den Transfer therapeutischer DNA allein auf den zu behandelnden Zelltyp zu beschränken. Das zu den Herpesviren gehörende EBV erfüllt diese Eigenschaften, es infiziert sowohl ruhende als auch proliferierende B-Zellen und persistiert latent als Episom, so dass eine stabile Weitergabe an Tochterzellen ohne riskante Integration in das Zellgenom erfolgt.

Aufgabe dieser Arbeit war es, ein auf EBV basiertes Verpackungssystem zu entwickeln, welches speziell für eine klinische Anwendung auf alle Sicherheitsrisiken getestet und optimiert wird. Dazu galt es ein optimiertes Helfergenom zu klonieren, in dem potenzielle virale Onkogene deletiert oder inaktiviert werden. Nach Transfektion von 293HEK-Zellen mit diesem modifizierten maxi-EBV wurde eine neue Verpackungszelllinie etabliert. Der erste Teil der Ergebnisse beschreibt die Generierung dieser optimierten Verpackungszelllinie. Im zweiten Teil folgen Ergebnisse über die Entwicklung geeigneter Genvektoren und deren Verpackung durch die optimierte Verpackungszelllinie. Die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji dient als Standard-Infektionsmodell, von B-CLL-Patienten gewonnene B-Lymphozyten dienen als Anwendungsbeispiel für die Praxis.

4.1 Generierung der optimierten Verpackungszelllinie

293-VII+

Ein wichtiger Schritt in Richtung viraler Gentherapie mittels EBV war die Voraussetzung, das große herpesvirale Genom genetisch manipulieren zu können. Mit der Klonierung des gesamten Genoms von B95-8 auf ein Plasmid mit prokaryontischem F-Faktor wurde die Replikation in *E. coli* möglich. Neben dem Replikationsfaktor befand sich zur Selektion in prokaryontischen Zellen das Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase auf dem Plasmid. Eine Selektion in eukaryontischen Zellen wird vermittelt durch die Hygromycin-Phosphotransferase. Das Gen des verstärkt grün

fluoreszierenden Proteins eGFP, ebenfalls unter einem eukaryontischen Promotor, erleichtert die Identifikation von transfizierten bzw. infizierten Zellen (Delecluse, 1998). Die Abb. 2 in Kapitel 1.2.3 zeigt eine Karte dieses maxi-EBV-Genoms p2089.

Durch stabile Transfektion von 293HEK-Zellen mit p2089 wurde eine Zelllinie etabliert, die nach Induktion des lytischen Zyklus EBV-Partikel produziert. Diese Viren weisen Wildtyp-Eigenschaften auf, sie infizieren und transformieren effizient primäre humane B-Lymphozyten (Delecluse, 1998). Mittels homologer Rekombination in *E. coli* können in p2089 genetische Modifikationen eingeführt werden. In einem ersten Schritt wurden die *cis*-agierenden viralen Verpackungssignale aus dem Genom deletiert (Delecluse, 1999). Mit diesem modifizierten maxi-EBV-Genom p2114 wurden wiederum 293HEK-Zellen transfiziert und die erste Generation einer stabilen Verpackungszelllinie selektioniert. Nach transienter Transfektion mit einem TR⁺ Genvektor und Aktivierung des lytischen Zyklus werden rekombinante Viren hergestellt (Delecluse, 1999).

Diese erste Generation der EBV-basierten Verpackungszelllinie trägt bis auf die Verpackungssignale alle viralen Gene eines Wildtyp-Virus. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass während der Replikation von Herpesviren Rekombinationsereignisse stattfinden, wie sie auch bei Versuchen mit der TR⁻ Verpackungszelllinie beobachtet wurden (Delecluse, 1999, Pfüller, 1996, Wilkinson, 2004). Somit besteht die Gefahr, dass nach Rekombination zwischen Helfergenom und Genvektor verpackbares Helfervirus mit Wildtyp-Eigenschaften entsteht. Im Hinblick auf eine sichere Anwendung in der Gentherapie sollte deshalb eine optimierte Verpackungszelllinie konstruiert werden, bei der die Entstehung transformierender Viren ausgeschlossen ist.

4.1.1 Klonierung des maxi-EBV-Helfergenoms p2831

Einige EBV-Gene werden in latent infizierten B-Zellen und EBV-assoziierten Erkrankungen exprimiert. Die nukleären Antigene EBNA2 und EBNA3A und -C, sowie das latente Membranprotein LMP1 initiieren die Transformation humaner B-Zellen *in vitro* (Cohen, 1989a, Hammerschmidt, 1989, Kaye, 1993, Kempkes, 1995c, Kieff, 2001, Tomkinson, 1993). Die Expression von LMP1 ist vom Transkriptionsfaktor EBNA2 abhängig. Beide sind für die Aufrechterhaltung des immortalisierten Zustands essenziell (Kempkes, 1995c, Kilger, 1998). Da diese viralen Gene potenzielle Onkogene darstellen und für die Virussyntese entbehrlich sind, wurden sie vom neuen Helfergenom deletiert bzw. genetisch inaktiviert.

Ein weiteres Risiko für eine therapeutische Anwendung stellt der Induktor des lytischen Zyklus von EBV, BZLF1, dar, welcher für die produktive Infektion essenziell ist (Feederle, 2000). Durch Deletion von BZLF1 lässt sich also die spontane lytische Replikation dieses Helfervirus in der Zielzelle verhindern. Wie schon bei der Verpackungszelllinie der ersten Generation wurden auch bei der optimierten Zelllinie wieder die TR deletiert.

Die genetischen Modifikationen wurden ausgehend von dem maxi-EBV-Plasmid p2089 schrittweise durch lineare Integration oder *chromosomal building* (Neuhierl, 2005, O'Connor, 1989) in *E. coli* eingeführt. Beide Methoden werden zusammengefasst zur Methode der homologen Rekombination und erlauben über homologe Anlagerung den strangweisen Austausch der dazwischenliegenden Gensequenz in sehr großen Plasmiden.

4.1.1.1 Homologe Rekombination der maxi-EBV-Plasmide in *E. coli*

Durch homologe Sequenzen soll in *E. coli* ein Rekombinationsereignis hervorgerufen werden. Dazu wird in einen chemokompetenten maxi-EBV-tragenden *E. coli*-Stamm ein lineares DNA-Fragment transformiert. Damit dieses lineare DNA-Fragment nicht durch endogene Exonukleasen degradiert wird, erfolgt die homologe Rekombination in dem *E. coli*-Bakterienstamm BJ5183, dessen Exonuklease durch den *recBC⁻* Genotyp funktionslos ist. Die genetische Modifikation durch Austausch der Gensequenzen an der richtigen Stelle wurde durch Selektion auf Antibiotika-Resistenzen, Restriktionslängenanalyse und Southern-Blot-Hybridisierung überprüft. Nach erfolgter Rekombination wurde das Plasmid einer Kolonie aufgereinigt und durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm DH10B übertragen.

4.1.1.2 Genealogie der maxi-EBV-Plasmide

Ausgehend von dem maxi-EBV-Plasmid p2089, welches das Konstrukt aus B95-8-Wildtyp-Genom und prokaryontischem Replikationsfaktor ist (Delecluse, 1998), wurden in vier aufeinander folgenden homologen Rekombinationen folgende genetische Modifikationen vorgenommen (siehe Tab. 2).

Tab. 2 Genealogie der maxi-EBV-Plasmide

maxi-EBV-Plasmid	Genotyp	Phänotyp	Nukleotid-koordinaten der genetischen Modifikation ^α	Vorkonstrukt	Art der genetischen Modifikation
p2089	Wildtyp	<i>Cm^r</i>	#48.042 - #50.281	p2419ΔEBNA2	<i>chromosomal building</i>
p2491	EBNA2 ⁻	<i>Cm^r</i>	#168.686 - #169.397	p2496ΔLMP1	<i>chromosomal building</i>
p2510	EBNA2 ⁻ LMP1 ⁻	<i>Cm^r</i>	#92.958 - #101.399 #102.390 - #103.097	p2821 ΔEBNA3A-C, ΔBZLF1	lineare Integration
p2827	EBNA2 ⁻ LMP1 ⁻ BZLF1 ⁻ EBNA3A-C ⁻	<i>Cm^r</i> , <i>Zeo^r</i>	#169.929 - #172.281/#1	p2068ΔTR	lineare Integration
p2831	EBNA2 ⁻ LMP1 ⁻ BZLF1 ⁻ EBNA3A-C ⁻ TR ⁻	<i>Cm^r</i> , <i>Zeo^r</i> , <i>Kan^r</i>	-	-	

^α bezogen auf das Genom des EBV-Stammes B95-8 (Baer, 1984)

Im ersten Schritt wurde die gesamte kodierende Sequenz von EBNA2 mit Hilfe des Vorkonstrukts p2419 durch *chromosomal building* deletiert (Cohen, 1989b, Hammerschmidt, 1989). LMP1 wurde in dem Plasmid p2491 durch Deletion der Transmembrandomäne inaktiviert, das entstehende artifizielle Fusionsprotein ΔTM-LMP1 ist nicht funktional und besitzt einen dominant negativen Phänotyp für B-Zell-Proliferation (Dirmeier, 2003). Durch *chromosomal building* mit Hilfe des Vorkonstrukts p2496 entstand das EBNA2⁻ und LMP1⁻ Plasmid p2510. Da die kodierenden Sequenzen von EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C und BZLF1 räumlich sehr dicht beieinander liegen, wurden im folgenden Schritt mit einem einzigen Vorkonstrukt p2821 die Gene der EBNA3-A bis -C deletiert und an Stelle des BZLF1-Gens über lineare Integration das Zeozin-Resistenzgen eingefügt. In diesem Plasmid p2827 wurden zuletzt die viralen Verpackungssignale, TR, durch das lineare DNA-Fragment von p2068, welches das Kanamycin-Resistenzgen trägt, ausgetauscht. Der Genotyp des resultierenden maxi-EBV-Plasmids p2831 trägt nun die gewünschten genetischen Modifikationen (siehe Abb. 7, Tab. 2).

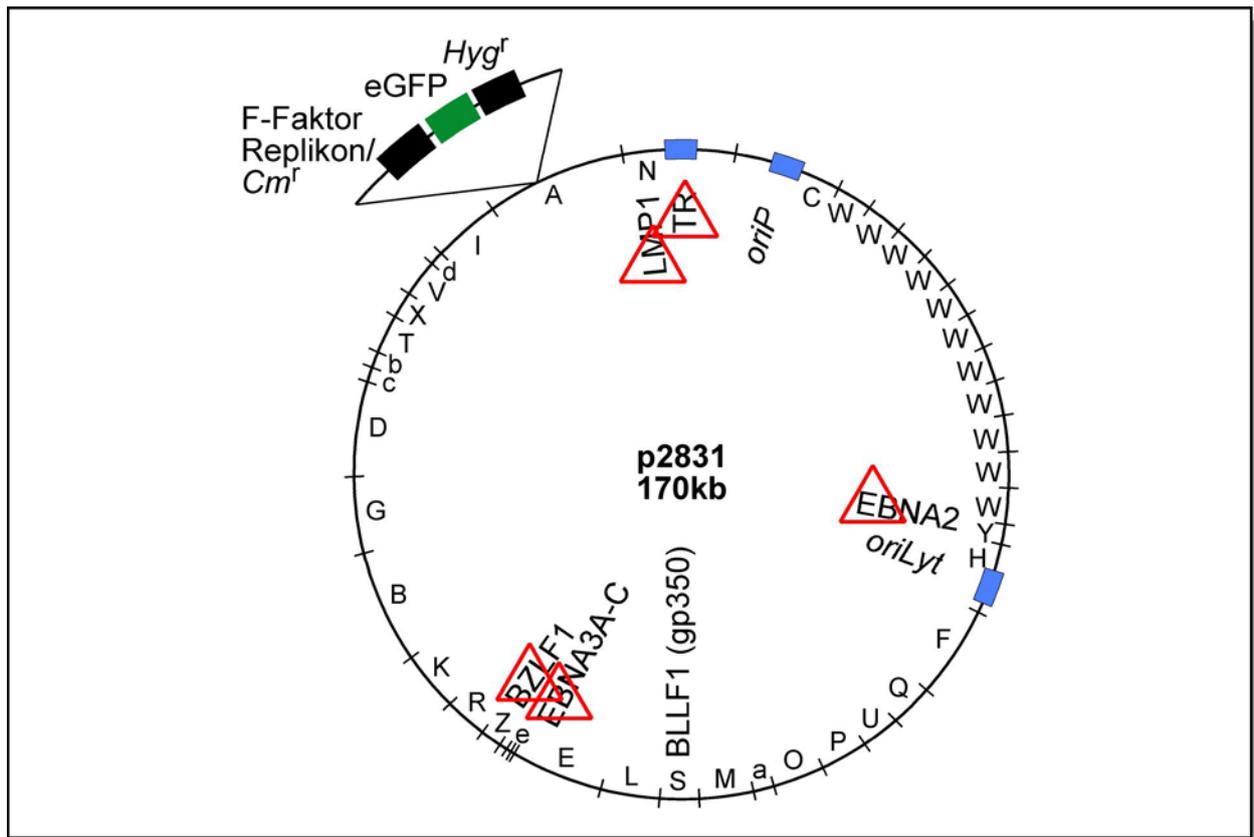


Abb. 7 Karte des maxi-EBV-Plasmids p2831

Rote Dreiecke weisen auf Deletionen der Genabschnitte von LMP1, TR, EBNA2, der EBNA3-A bis -C und BZLF1 hin (vgl. Abb. 2).

4.1.1.3 Bestätigung des maxi-EBV-Helfergenoms

In diesem Kapitel soll exemplarisch die Bestätigung des maxi-EBV-Helfergenoms am letzten Schritt der Deletionsreihe gezeigt werden. Während der letzten Deletion wurden die mit dem EBV-Helfergenom transformierten *recBC⁻ E. coli*-BJ5183-Bakterien bereits auf Chloramphenicol- und Kanamycinresistenz selektioniert. Ausgewachsene Kolonien tragen die Resistenzgene, die durch das maxi-EBV-Plasmid mit F-Faktor-Kassette und den Klonierungsschritt zur Deletion der TR eingeführt worden sind.

Von einigen Klonen wurde die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse gewonnen und mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI auf korrektes Bandenmuster analysiert (siehe Abb. 8). Alle analysierten Klone zeigten die erwarteten Fragmentgrößen. Um zu überprüfen, ob die Klone tatsächlich das linear integrierte Fragment an Stelle der TR tragen, wurde eine Southern-Blot-Hybridisierung von dem Gel durchgeführt, und als radioaktive Sonde das linearisierte Fragment des Vorkonstrukts p2068 verwendet.

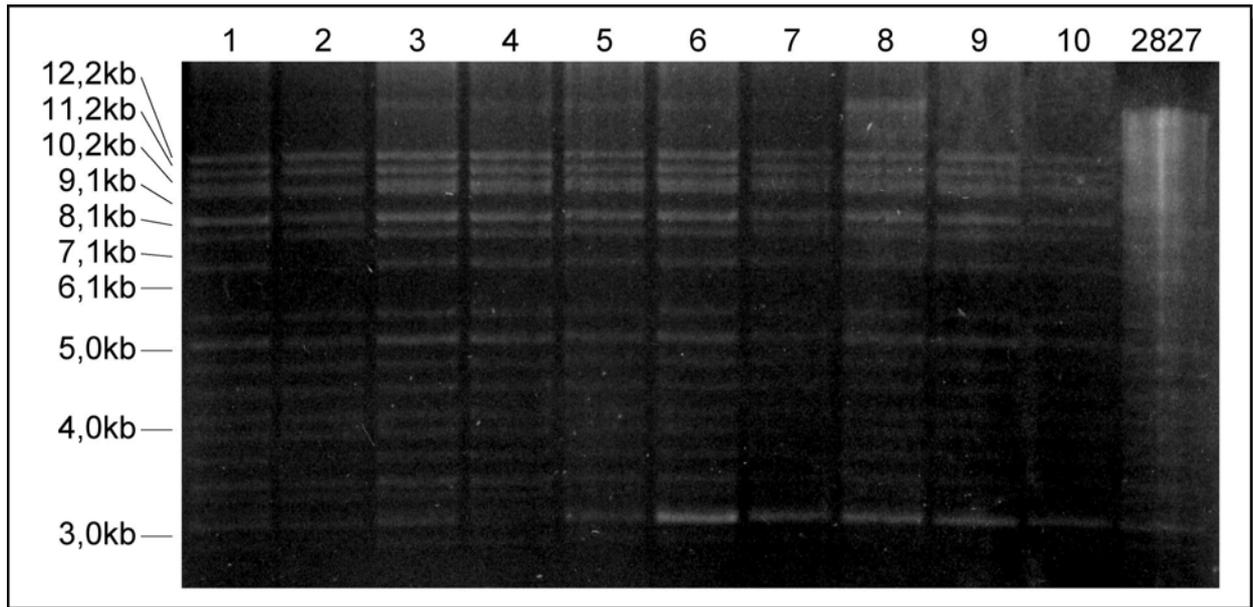


Abb. 8 Bestätigung des Genoms

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Helfergenome p2831 gewonnen aus zehn *E. coli*-Klonen (1-10) des transformierten BJ5183-Stammes sowie als Kontrolle das maxi-EBV-Genom p2827 nach enzymatischem Restriktionsverdau mit *Bam*HI.

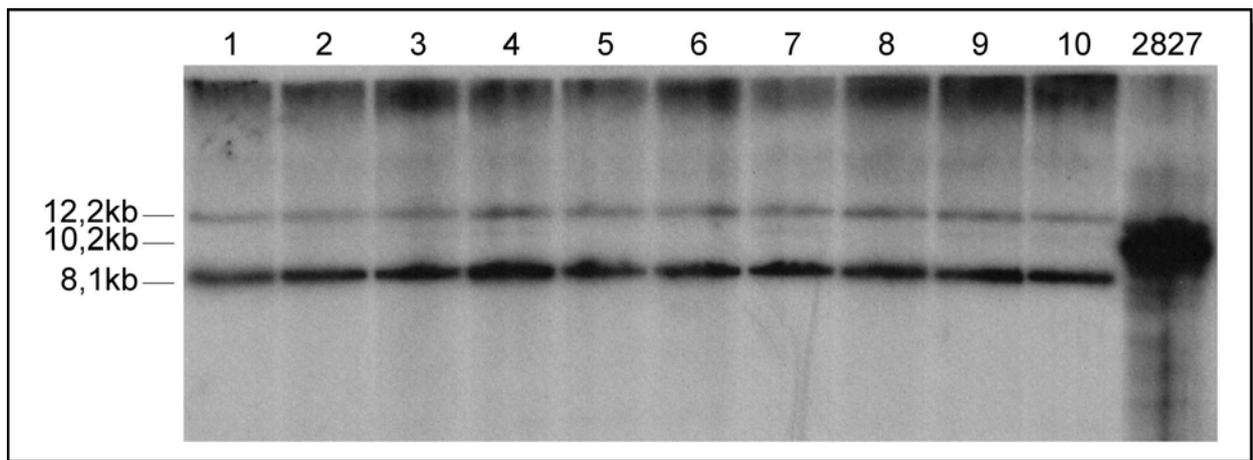


Abb. 9 Nachweis der Integration von p2068

Southern-Blot der Helfergenome p2831 gewonnen aus zehn *E. coli*-Klonen des transformierten BJ5183-Stammes (1-10) sowie als Kontrolle das maxi-EBV-Genom p2827 nach Hybridisierung mit dem Fragment aus p2068.

Abb. 9 zeigt einen Southern-Blot zum Nachweis der TR-Deletion im Helfergenom p2831. Die im Agarosegel (siehe Abb. 8) aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit dem linearen Vorkonstrukt hybridisiert, welches die TR deletierte. Die radioaktiv-markierte Sonde erkennt spezifisch das Fragment mit einer Größe von 8,0kp bei p2831 bzw. von 10,0kb bei p2827. Das maxi-EBV-Plasmid p2827 trägt sechs TR im Gegensatz zu vier TR im B95-8-Prototyp, wodurch das Fragment mit 8,9kb um 1.100bp länger ist. Die schwächere Bande bei 11,9kb stellt vermutlich ein Artefakt mit geringer

Homologie dar, es grenzt in 5'-Richtung an das deletierte Fragment. Eine erfolgreiche Integration von p2068 lässt auf Deletion von TR schließen. Im späteren Verlauf wird die Deletion der TR mittels PCR nachgewiesen.

Von Klon 6 wurde die Plasmid-DNA über maxi-Präparation (JetStar) aufgearbeitet und über Cäsiumchlorid-Dichtegradienten von bakterieller DNA gereinigt. Mit dieser genomischen p2831.6-DNA (*supercoiled*) wurden elektrokompente *E. coli*-DH10B-Bakterien zur weiteren Produktion transformiert. Wiederum wurden zehn analytisch verdaute Klone (siehe Abb. 10) durch Southern-Blot-Hybridisierung auf Vorhandensein des linearen Fragmentes mit Kanamycin-Resistenzgen getestet (siehe Abb. 11).

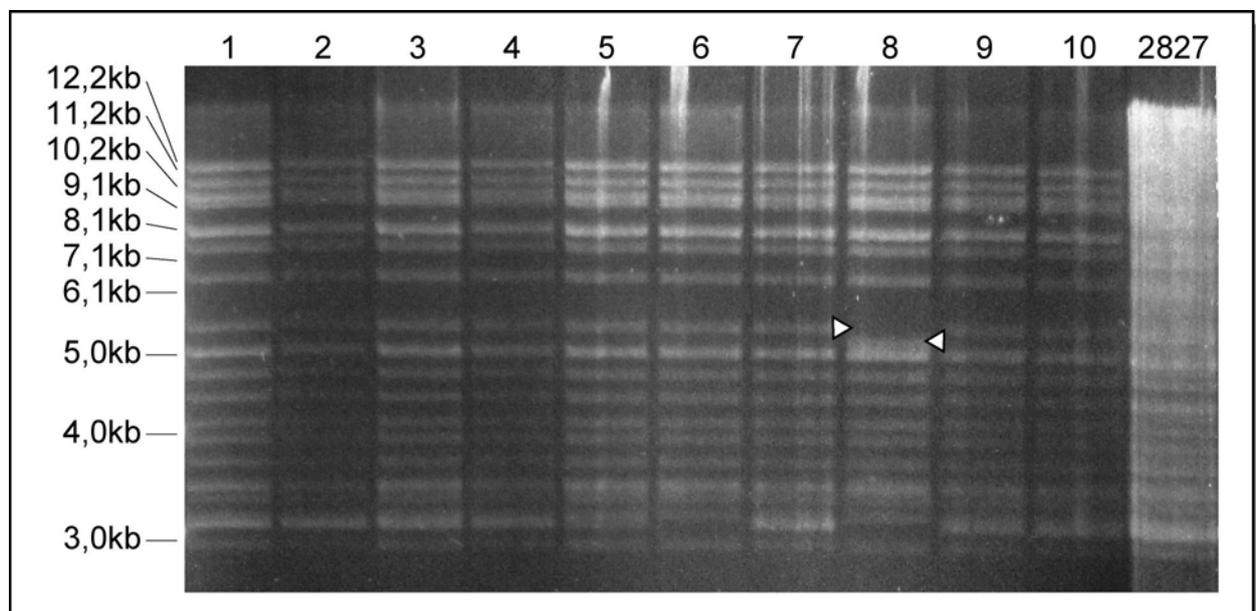


Abb. 10 Bestätigung des Genoms

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Helfergenome p2831 gewonnen aus zehn *E. coli*-Klonen des transformierten DH10B-Stammes (1-10) sowie als Kontrolle das maxi-EBV-Genom p2827 nach enzymatischen Restriktionsverdau mit BamHI. Nur der Genotyp des Klons 8 weicht vom erwarteten Fragmentmuster ab, dargestellt durch die weißen Pfeile.

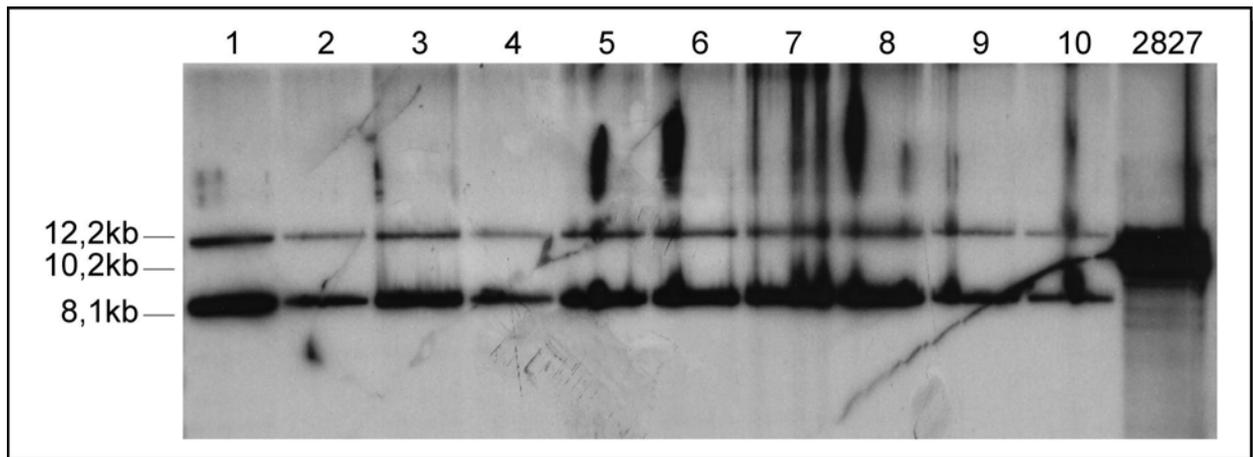


Abb. 11 Nachweis der Integration von p2068

Southern-Blot der Helfergenome p2831 gewonnen aus zehn *E. coli*-Klonen des transformierten DH10B-Stammes (1-10) sowie als Kontrolle das maxi-EBV-Genom p2827 nach Hybridisierung mit dem Fragment aus p2068

Die Klone wurden wiederum durch Southern-Blot-Hybridisierung von dem Restriktionsverdau-Gel auf Fehlen der TR getestet. Das linearisierte Fragment des Vorkonstrukts p2068 wurde erneut als radioaktive Sonde verwendet (siehe Abb. 11).

Von diesen Klonen wurde für alle weiteren Schritte Klon 7 verwendet, da dieser eine besonders ausgeprägte Bande der *Bam*W-Wiederholungen bei 3.072bp zeigte, was erfahrungsgemäß auf effiziente Virusproduktion hindeutet. Die Plasmid-DNA wurde nach Präparation mittels Cäsiumchlorid-Gradient wie im vorherigen Schritt gereinigt. In einem vergleichenden Restriktionsverdau zwischen dem EBV-Wildtyp-Plasmid p2089 und dem EBV-Helferplasmid p2831 mit *Bam*HI bzw. *Bgl*II zeigt das Bandenmuster die erwarteten Unterschiede in den veränderten Bereichen (siehe Abb. 12).

Nachdem das Helfergenom p2831 mittels homologer Rekombination in *E. coli* generiert und der Genotyp durch enzymatischen Restriktionsverdau und Southern Blot-Hybridisierung bestätigt wurde, lag das Helfergenom der neuen Verpackungszelllinie fertig vor.

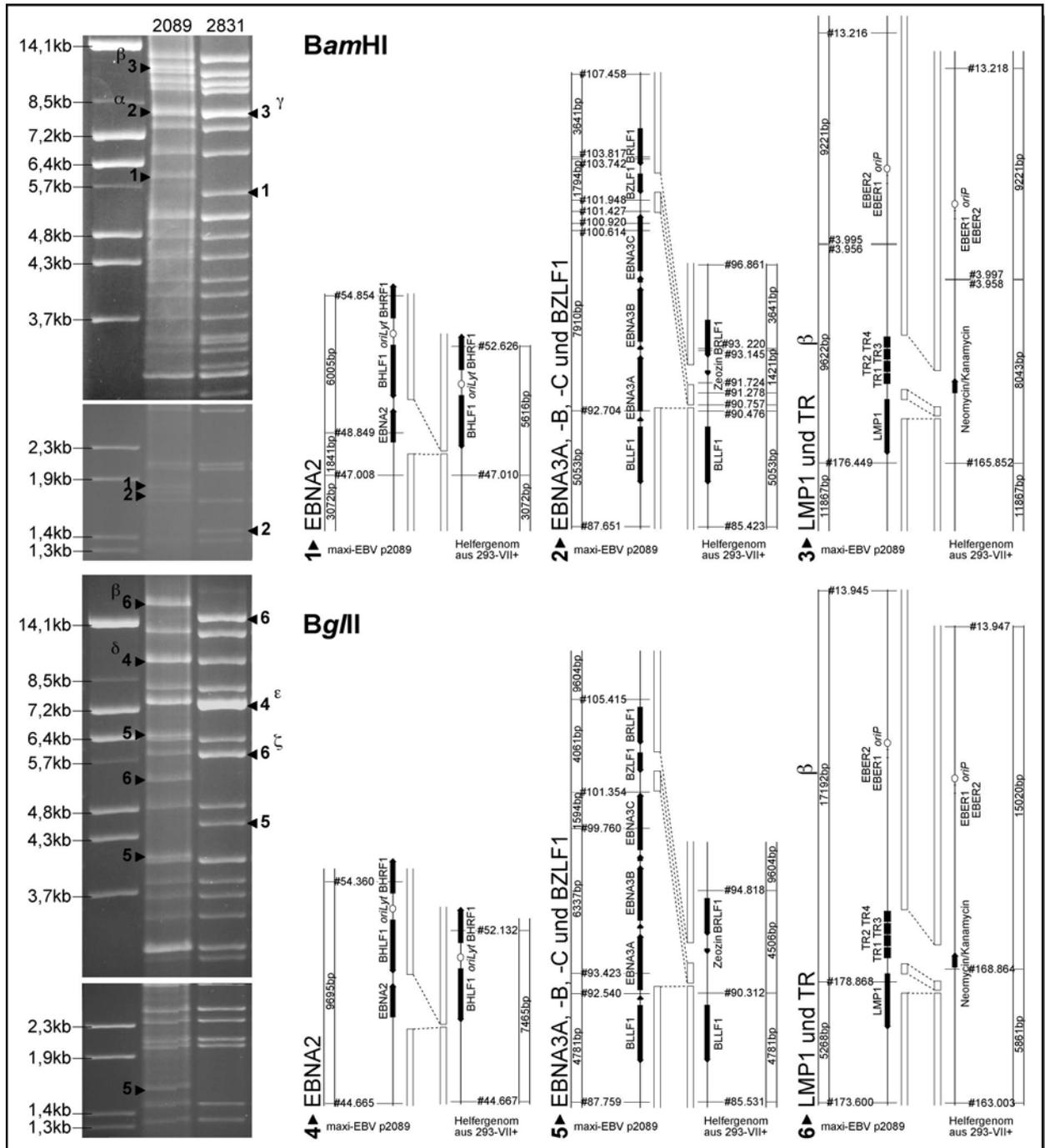


Abb. 12 Vergleichende Restriktionslängenanalyse von p2089 (2089) und dem Helfergenom p2831 (2831) nach *Bam*HI- und *Bgl*II-Verdau

Die Auftrennung erfolgte in einem analytischen Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Alle Abweichungen sind als Dreiecke im Gel eingezeichnet, die Ziffern verweisen auf die Plasmidkarte, die den Unterschied im Genotyp der Plasmide aufzeigt. Homologien sind als Balken mittig zwischen den Sequenzen eingezeichnet. Nukleotidkoordinaten beziehen sich auf das Genom von B95-8 (Baer, 1984).

α : zwei Fragmente (7.910bp und 8.020bp); β : p2089 trägt sechs TR im Gegensatz zu vier TR im B95-8-Prototyp, wodurch das Fragment um 1.100bp länger ist; γ : zwei Fragmente (8.043bp und 8.020bp); δ : zwei Fragmente (9.695bp und 9.604bp); ϵ : vier Fragmente (7.481bp in p2831, 7.457bp, 7.455bp und 7.452bp); ζ : zwei Fragmente (5.861bp in p2831 und 5.822bp)

4.1.2 Etablierung einer stabilen optimierten Verpackungszelllinie

Wie bereits erfolgreich mit der Verpackungszelllinie der ersten Generation gezeigt (Delecluse, 1999), wurde auch die gereinigte maxi-EBV-DNA p2831 stabil in 293HEK-Zellen transfiziert. Abb. 13A zeigt schematisch die Etablierung einer Verpackungszelllinie.

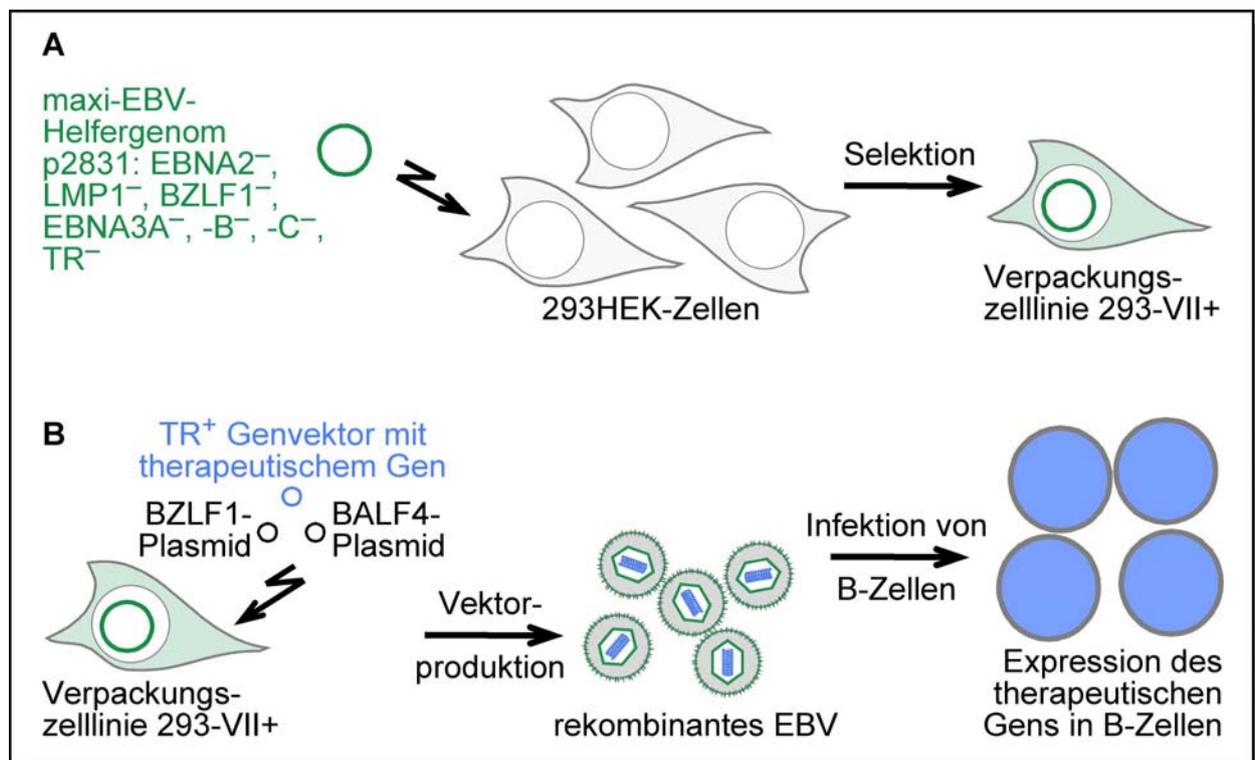


Abb. 13 Schematische Darstellung des EBV-Verpackungssystems

A Transfektion von 293HEK-Zellen mit rekombinantem maxi-EBV-Helfergenom und Selektion einer stabilen Verpackungszelllinie durch verschiedene Parameter wie Hygromycin und eGFP-Expression, sowie effizienter Verpackung

B Kotransfektion der Helferzelllinie mit TR⁺ Genvektor, sowie den BZLF1- und BALF4-exprimierenden Plasmiden zur Virusproduktion und anschließender Expression des therapeutischen Gens in B-Zellen nach Infektion mit rekombinantem EBV

Um die optimierte Verpackungszelllinie zu etablieren, wurden alle ausgewachsenen 293HEK-Klone stufenweise auf verschiedene Anforderungen getestet (siehe 0). Nach mehreren Wochen Selektion in Gegenwart von Hygromycin (100µg/ml Endkonzentration) exprimierten 175 von über 350 ausgewachsenen Klonen aus mehreren Transfektionsreihen das Markerprotein eGFP, was auf das Vorhandensein der F-Faktor-Kassette des Helfergenoms schließen läßt. Diese eGFP⁺ Einzelklone wurden expandiert und auf effiziente Virusproduktion getestet wie schematisch in Abb. 13B dargestellt.

Tab. 3 Stufenweise Etablierung einer optimierten Verpackungszelllinie aus allen ausgewachsenen 293HEK-Klonen

Anforderung	Technik	n (Klone)
Hygromycin-Resistenz	Positivselektion mit Hygromycin	350
Expression von eGFP	Fluoreszenzmikroskopie auf eGFP	175
erfolgreiche Induktion	Immunfluoreszenz-Färbung auf gp350/220	115
effiziente Virenverpackung	visuelles Auszählen am Fluoreszenzmikroskop, Titerbestimmung nach Raji-Infektion	7
Steigerung der Verpackungseffizienz	FACS-Sortierung auf die 10% 293HEK-Zellen einer Klonpopulation mit intensivster eGFP-Expression	3
korrektes Genom	Plasmid-Rückgewinnung und Restriktionsverdau, PCR zum Nachweis der genetischen Modifikationen	1

Die Eigenschaft der eGFP-Expression bedingt durch das Helfergenom in den 293HEK-Klonen wurde regelmäßig am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Mischklone wurden aussortiert. Weitere Etablierungstests überprüften die Fähigkeit zur erfolgreichen Induktion des lytischen Zyklus sowie die zur effizienten Verpackung. Dazu wurden alle 175 Klone jeweils transient kotransfiziert mit einem TR⁺ Genvektor, der für ein fluoreszierendes Protein (dsRed oder eGFP) kodiert.

Das Helfergenom persistiert ebenso wie Wildtyp-EBV in der Wirtszelle latent und extrachromosomal. Dieser Zustand entspricht dem einer latenten Infektion. Für die Produktion von Viruspartikeln muss der lytische Zyklus von EBV induziert werden. Dieser Übergang vom latenten zum lytischen Zyklus wird durch den Transaktivator BZLF1 eingeleitet (Hammerschmidt, 1988a). Eine Steigerung der Menge an produzierten infektiösen Partikeln kann durch Kotransfektion mit einem Plasmid hervorgerufen werden, welches für das virale Glykoprotein BALF4 kodiert (Dirmeier, 2003, Neuhierl, 2002). Die erfolgreiche Induktion des lytischen Zyklus kann z. B. anhand der Expression des viralen Glykoproteins gp350/220 nachgewiesen werden, das wenige Tage nach Kotransfektion der Verpackungszellen mit BZLF1- und BALF4-kodierenden Plasmiden sowie einem TR⁺ Genvektor exprimiert wird. Standardmäßig wird dieser Nachweis am dritten Tag nach Transfektion durch Färbung der Verpackungszellen mit einem Antikörper gegen gp350/220 durchgeführt.

Ein Maß für effiziente Verpackung und somit Produktion infektiöser Partikel ist die Infektion von Raji-Zellen und Messung der eGFP- oder dsRed-exprimierenden Zellen. Dazu werden Raji-Zellen mit Kulturüberstand der induzierten Verpackungszellen

infiziert. Jeweils 1×10^5 Raji-Zellen wurden mit 1ml Überstand 3 Tage lang inkubiert. Eine Auswertung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie.

Durch visuelles Auszählen am Fluoreszenzmikroskop von dsRed- oder eGFP-exprimierenden Raji-Zellen konnte eine schnelle Aussage über den Virustiter getroffen werden. Abb. 14 zeigt exemplarisch eine Immunfluoreszenzfärbung auf gp350/220 nach Transfektion des 293HEK-Klones, der letztendlich als optimierte Verpackungszelllinie verwendet wurde.

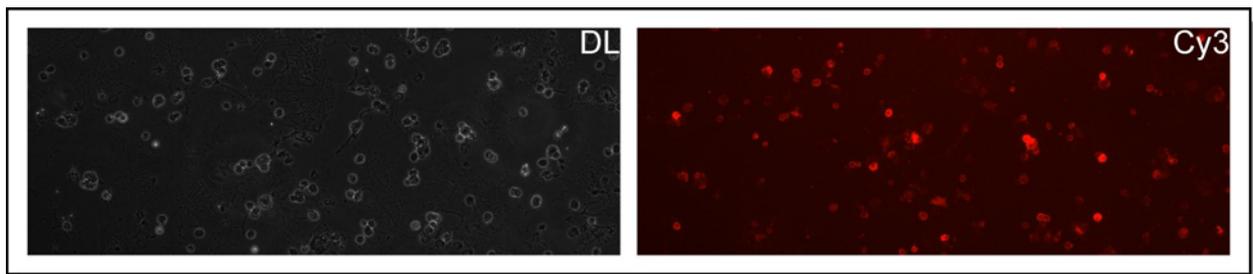


Abb. 14 Immunfluoreszenz-Färbung auf das virale Glykoprotein gp350/220

Zellen der optimierten Verpackungszelllinie wurden mit einem TR⁺ Genvektor sowie den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4 transfiziert. Drei Tage nach Behandlung wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert und die erfolgreiche Induktion durch Färbung auf das Glykoprotein gp350/220, welches in der späten Phase des lytischen Zyklus exprimiert wird, nachgewiesen. An den monoklonalen Antikörper gegen gp350/220 bindet ein Cy3-gekoppelter Sekundär-Antikörper, der in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Gezeigt sind die Zellen mikroskopisch im Phasenkontrast-Durchlicht (DL) und im UV-Licht mit Rotfilter (Cy3).

Die genauere Quantifizierung der Fluoreszenz, die nach Übertragung der Partikel in den Zielzellen exprimiert wird, wurde 3 Tage nach Infektion mit rekombinanten Viren mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Bei dieser Titerberechnung entspricht eine fluoreszierende Raji-Zelle einem infektiösen Partikel. Durchschnittlich konnte ein Wert von 1×10^4 infektiöse Partikel/ml erreicht werden. Abb. 15 zeigt exemplarisch die FACS-Analysen von eGFP⁺ Raji-Zellen nach Infektion mit rekombinanten Viren einiger 293HEK-Klone im Vergleich.

Um den Zellklon mit den besten Verpackungseigenschaften zu finden und um Schwankungen auszugleichen, wurden alle Klone mindestens dreimal getestet und untereinander sowie mit der bereits etablierten Verpackungszelllinie TR²/293 verglichen. Einige Klone, wie auch die spätere optimierte Verpackungszelllinie, zeigten zu Beginn der Vergleichsreihe sehr gute Verpackungseffizienzen, die sich im späteren Verlauf nicht auf gleichem Niveau reproduzieren ließen. Daher wurde jeweils eine zweite Charge aufgetaut und mit den frischen Zellen weitergearbeitet, gekennzeichnet

mit /C2.

Der Zellklon 4.1.AC/C2, der im folgenden 293-VII genannt wird, zeigte dabei ähnlich gute Verpackungseffizienzen wie die Verpackungszelllinie TR2/293 (siehe Abb. 15). Dieser Zellklon wurde für weitere Analysen und Experimente ausgewählt.

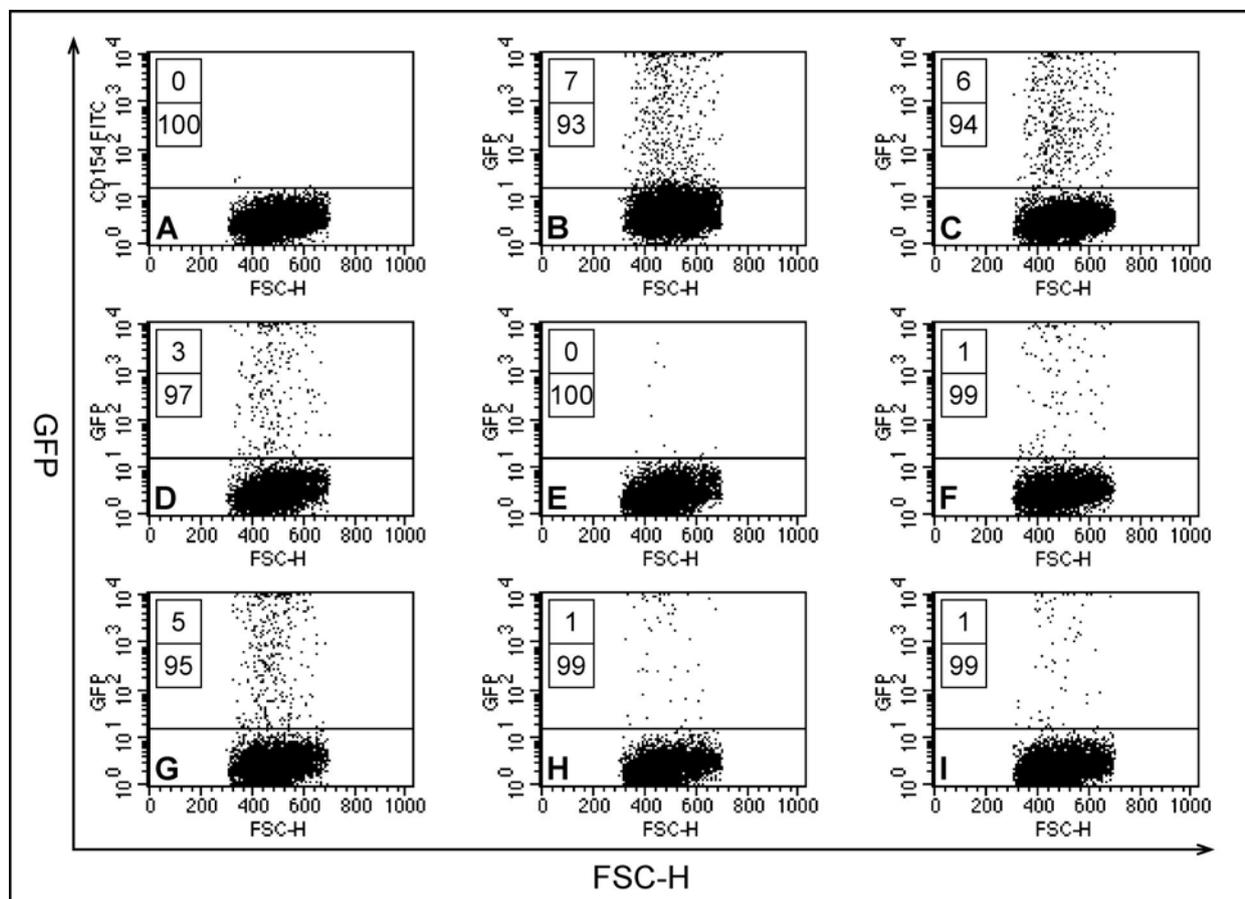


Abb. 15 Vergleichende Durchflusszytometrie auf eGFP⁺ Raji-Zellen nach Infektion mit rekombinanten Viren einiger 293HEK-Klone

Die Klone der 293HEK-Verpackungszellen wurden transfiziert mit dem eGFP-kodierenden Genvektor p1933 sowie den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4. Nach 3 Tagen Inkubation wurden Raji-Zellen mit den in den Überständen angereicherten rekombinanten Viren infiziert. Eine Detektion eGFP⁺ Zellen erfolgte 3 Tage später mittels Durchflusszytometrie. Die Raji-Zellen wurden mit Überständen aus folgenden Verpackungszellen infiziert: A TR2/293 nicht transfiziert (Negativkontrolle), B TR2/293, C 4.1.AC (293-VII+), D 4.1.AT, E 5.3.AD, F 5.3.AK, G 5.3.AO, H 5.3.AR, I 5.3.AV

4.1.3 Optimierung der Verpackungseffizienz der Verpackungszelllinie

In vielen Versuchen hatte sich gezeigt, dass 293HEK-Klone mit der höchsten eGFP-Expression durch das Helfergenom meist auch besonders effizient verpackten. Dies kann z. B. durch eine höhere Kopienzahl des Helfergenoms in der Verpackungszelle hervorgerufen sein.

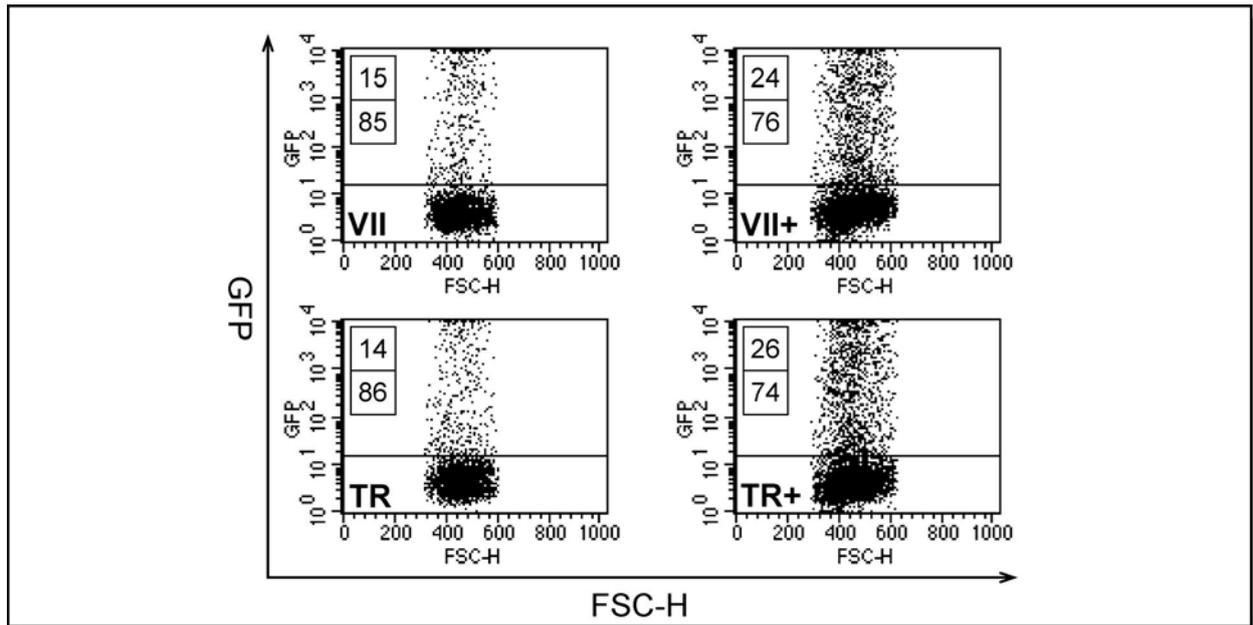


Abb. 16 Vergleichende Durchflusszytometrie auf optimierte Verpackungseffizienz nach FACS-Sortierung

Die Verpackungszelllinien 293-VII (VII) und TR²/293 (TR) sowohl vor FACS-Sortierung als auch nach Sortierung (+) wurden transfiziert mit dem eGFP-kodierenden Genvektor p1933 sowie den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4. Nach 3 Tagen Inkubation wurden Raji-Zellen mit den in den Überständen angereicherten rekombinanten Viren infiziert. Eine Detektion eGFP⁺ Zellen erfolgte 3 Tage später mittels Durchflusszytometrie.

Virusüberstände, die in intensiv eGFP⁺ sortierten Zellen hergestellt wurden (+) zeigen eine etwa doppelt so hohe Infektionsrate wie Überstände aus den ursprünglichen Verpackungszelllinien vor Sortierung.

Mit Hilfe von FACS-Sortierung wurden sowohl von TR²/293 als auch von 293-VII sowie von zwei weiteren 293HEK-Klonen jeweils die 10% der Zellpopulationen mit stärkster eGFP-Intensität bzw. mit schwächster Intensität getrennt, gesammelt und expandiert. Diese Populationen wurden wiederum im Vergleich zur nicht-sortierten Verpackungszelllinie in mehreren Testrunden wie oben beschrieben auf Verpackungseffizienz untersucht. Die mittels Durchflusszytometrie ermittelten Virustiter unterlagen Schwankungen, es zeigte sich jedoch eine Korrelation zwischen eGFP und Verpackung (siehe Abb. 16). Für alle weiteren Versuche wurde diese angereicherte Verpackungszelllinie 293-VII+ verwendet.

4.1.4 Verifizierung des maxi-EBV-Genoms der Verpackungszelllinie 293-VII+

Das zirkuläre Helfergenom der Verpackungszelllinie 293-VII+ wurde mit Hilfe der Plasmid-Rückgewinnungstechnik aus den eukaryontischen Zellen isoliert und durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm DH10B eingeführt. Somit konnte ein analytischer Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Bg*II zur Verifizierung des rekombinanten EBV-Helfergenoms durchgeführt werden. Als Kontrolle wurde das Plasmid p2089 verwendet wie in Kapitel 4.1.1.3 bereits beschrieben.

Alle genetischen Modifikationen entsprachen dem ursprünglich in 293HEK-Zellen eingeführten maxi-EBV-Plasmid p2831 (Daten nicht gezeigt). Die erwarteten Bandenunterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid p2089 konnten im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel bestätigt werden.

In einem ergänzenden Ansatz wurden die genetischen Modifikationen des rückgewonnenen maxi-EBV-Plasmids p2831 aus der Verpackungszelllinie 293-VII+ durch Amplifikation ausgewählter Bereiche mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verifiziert. Ausgangs-DNA war für alle Bereiche das Wildtyp-Plasmid p2089, das Helfergenom der Verpackungszelllinie TR`2/293 und das rückgewonnene Helfergenom p2831 aus 293-VII+ Zellen. Als Kontrolle diente jeweils steriles bidestilliertes Wasser. Die PCR-Primerpaare wurden so ausgewählt, dass Unterschiede im Bereich der genetischen Modifikationen bzw. Übereinstimmungen in homologen Bereichen deutlich wurden. Die Primerpaare der Positivkontrollen wurden im BLLF1-Gen, welches für gp350/220 kodiert, in EBNA1, sowie im gp42-kodierenden BZLF2-Gen platziert. Wie in Abb. 17 gezeigt, konnte die genetische Zusammensetzung der unterschiedlichen maxi-EBV-Plasmide in allen PCR-Reaktionen bestätigt werden.

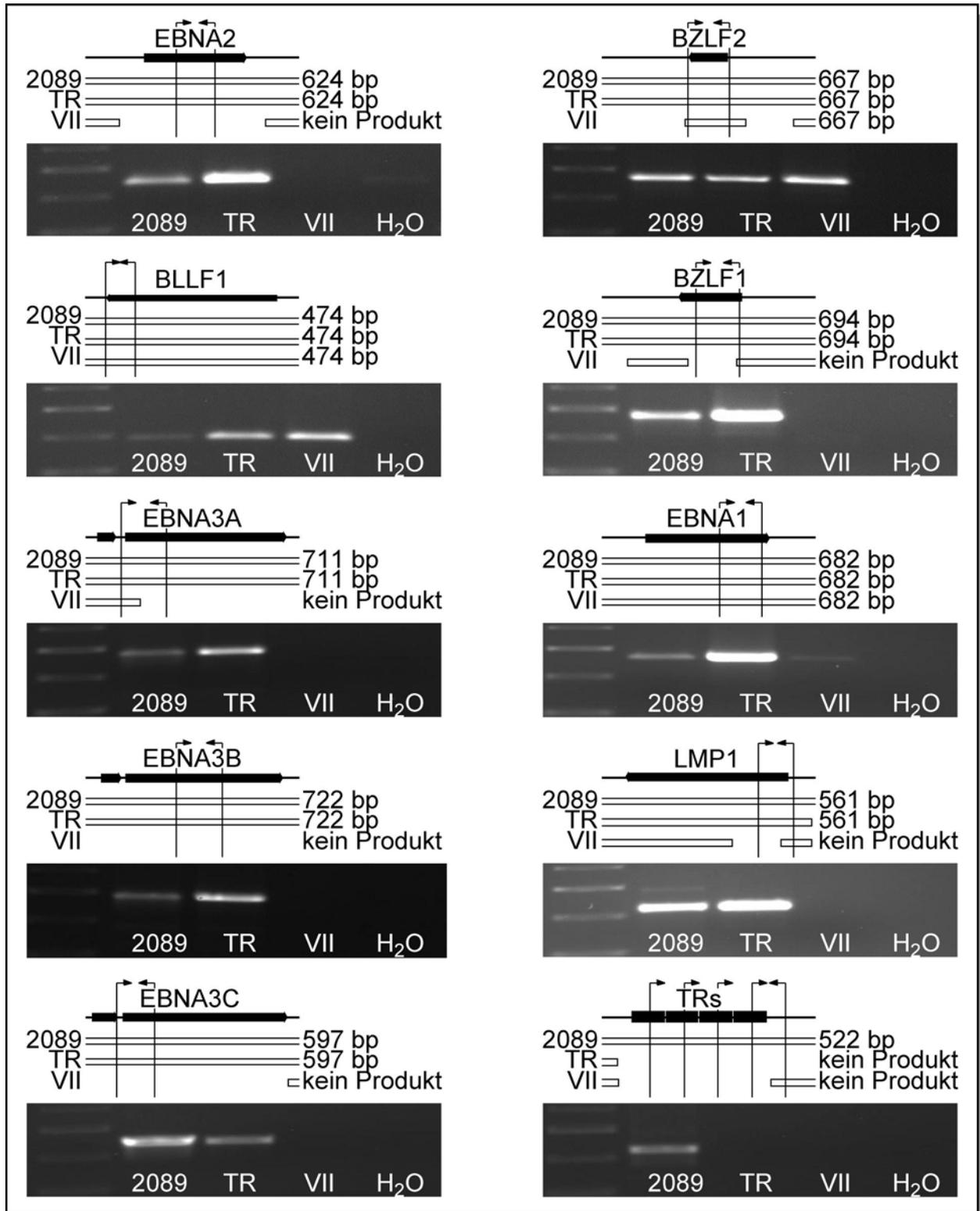


Abb. 17 Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der PCR-Amplifikate zum Vergleich ausgewählter Bereiche in den maxi-EBV-Plasmiden

Von den Zelllinien 293-2089 (2089), TR⁻2/293 (TR) und 293-VII⁺ (VII) wurde die Plasmid-DNA rückgewonnen und als Template für PCR-Amplifikationen verwendet. Die gewählten Primerpaare binden in den genetischen Modifikationen des Helfergenoms aus 293-VII⁺. PCR-Produkte in den Bereichen von BLLF1 (gp350/220), EBNA1 und BZLF2 (gp42) dienen als Positivkontrolle.

4.1.5 Infektion von primären B-Zellen mit rekombinanten EBV-Partikeln zur Bestimmung der Transformationseffizienz

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass homologe Rekombination zwischen Helfergenom und Genvektor während der herpesviralen Replikation möglich ist (Pfüller, 1996, Wilkinson, 2004). Die Gefahr der ungewollten Freisetzung von Viren, die durch Rekombinationsereignisse Wildtyp-Eigenschaften wiedererlangt haben, besteht auch bei EBV-basierten Vektorsystemen. Diese Tatsache wurde bereits in der Verpackungszelllinie TR⁻2/293 beobachtet (Delecluse, 1999). Neuere Ergebnisse zeigen, dass diese Verpackungszelllinie nach Induktion des lytischen Zykluses viele leere Viruspartikel ohne virale DNA und sehr selten (0,001% der infizierten Zellen) defekte infektiöse Viren produziert, die das lytisch replizierte, TR⁻ EBV-Genom enthalten (Feederle, 2005). Eventuell verursacht lytische Replikation neben der eigentlichen Konkatemer-Formation einzelne Kopien des linearen viralen Genoms, welche direkt in virale Kapside ohne vorherige Trennung der Konkatemere inkorporiert werden könnten. Aufgrund homologer Rekombination könnten somit Stücke von Konkatemeren, die mehr als ein einzelnes Genom tragen, in eine virale Einheit mit intaktem EBV-Genom zurückverwandelt worden sein. Ein einziges Rekombinationsereignis, bei dem die TR in das Helfergenom wieder eingebaut werden, kann Revertanten hervorrufen. Virionen können propagiert werden und B-Zell-Transformation kann die Folge sein.

Obwohl Rekombinationsereignisse nicht vollständig ausgeschlossen werden können, ist der Rückerwerb von immortalisierenden Wildtyp-Eigenschaften in der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII⁺ nach aktuellem Wissensstand unmöglich. Dem Helfergenom fehlen alle latenten Gene, die erwiesenermaßen für Transformationsvorgänge essenziell sind (Kieff, 2001). Um eine quantitative Aussage über das Maß der Rekombination mit Wiedererlangung von Wildtyp-Eigenschaften treffen zu können, wurden Transformationsexperimente mit primären humanen B-Zellen durchgeführt. Dazu wurden rekombinante Viren mit unterschiedlichen Genvektoren in beiden Verpackungszelllinien hergestellt und primäre B-Zellen damit infiziert. Da die Wahrscheinlichkeit der ungewollten homologen Rekombination von dem Grad und der Länge der Sequenzhomologie zwischen den DNA-Molekülen abhängt, wurden für die Verpackung zwei Plasmide mit gleicher TR-Sequenz in einem unterschiedlichen Kontext verwendet und verglichen. Das Plasmid p0925 trägt um die TR flankierende Bereiche von insgesamt 10,5kb Länge. Das Genvektor-Plasmid p1933 dagegen besitzt

um die TR angrenzende Bereiche von nur 1,3kb Länge mit authentischer EBV-Sequenz.

Beide Plasmide wurden verwendet, um in den Verpackungszelllinien TR²/293 und 293-VII⁺ rekombinante Viruspartikel herzustellen und primäre B-Zellen damit zu infizieren. Pro Virusüberstand wurden alle Kammern einer 96-Kammerplatte gefüllt, in jeder Kammer lagen gleiche Mengen an B-Lymphozyten vor. Als Positivkontrolle wurden Virusüberstände mit Wildtyp-EBV-Partikeln aus 293-2089 Zellen verwendet. Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass humane embryonale Fibroblasten (Wi38) das Auswachsen der proliferierenden B-Zellklone verbessern (Sugden, 1977). Vermutlich tragen lösliche Faktoren, die noch einige Zeit nach letaler γ -Bestrahlung von den Fibroblasten produziert werden, dazu bei. In jeder Kammer der 96-Kammerplatte wurde die gleiche Menge adhärent wachsender Wi38 vorgelegt. Nach etwa 7 Wochen wurde die Anzahl der Wachstums-transformierten B-Zellklone (LCLs) aus den infizierten B-Zellen visuell durch Auszählen bestimmt, die Ergebnisse sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4 Freisetzung von Helfervirus mit Wildtyp-Eigenschaften aus den Verpackungszelllinien TR²/293 und 293-VII⁺

Helferzelllinie	Virusüberstände		Anzahl der LCLs ^γ
	transfiziertes Plasmid ^α	Titer/ml ^β	
	-	n. d.	0
TR ² /293	p1933	1x10 ⁶	1
	p0925	n. d.	5
293-VII ⁺	-	n. d.	0
	p1933	3x10 ⁵	0
	p0925	n. d.	0
293-2089	-	1x10 ³	37

^α kotransfiziert mit p0509 und p2670

^β eGFP⁺ Raji-Zellen pro 1ml Virusüberstand mittels Durchflusszytometrie bestimmt

^γ Anzahl der Kammern pro 96-Kammerplatte mit eGFP⁺, proliferierenden B-Zellen (LCLs)

Während in der Verpackungszelllinie TR²/293 offensichtlich Rekombinationsereignisse eintraten, die zur Wiederherstellung von Wildtyp-Eigenschaften führten, konnten bei Verwendung von Virusüberständen, die in 293-VII⁺ Zellen hergestellt wurden, keine proliferierenden B-Zellen beobachtet werden. Die höhere Transformationseffizienz mit

p0925-Überständen aus TR²/293 lässt Rückschlüsse auf vermehrte Rekombinationsereignisse zu. Die Ergebnisse dieser Transformationsexperimente bestätigten, dass aufgrund der Deletion der an einer Transformation beteiligten EBV-Gene, die in der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII+ hergestellten EBV-Partikel selbst nach Rekombination keine LCLs mehr generieren können.

4.2 Transduktion

Nach Generierung und Etablierung der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII+ soll im zweiten Ergebnisteil auf die Transduktion genetischen Materials eingegangen werden. Dazu wurden geeignete Genvektoren entwickelt, die Transfektion der Verpackungszelllinie verbessert und die transduzierenden Eigenschaften der rekombinanten Viren durch Infektionsversuche getestet.

4.2.1 Verpackung von EBV-basierten Genvektoren durch 293-VII+

Bislang wurden für große DNA-Viren Verpackungszellen verwendet, die mit Wildtyp-Virus oder entsprechenden Virusmutanten infiziert sind. Das größte Problem dabei war die Freisetzung von Helfervirus. Mit der Zelllinie TR²/293 wurde erstmals ein Verpackungssystem beschrieben, welches die Herstellung von rekombinantem EBV ohne Verunreinigung durch Helfervirus erlaubt (Delecluse, 1999). Durch die fehlenden TR im Helfergenom wird die Generierung von Helfervirus verhindert, alle anderen benötigten Faktoren für die Verpackung des TR⁺ Genvektors aber *in trans* zur Verfügung gestellt. Die ungewollte Rekombination zwischen Helfergenom und Genvektor, die im Fall von TR²/293 zu infektiösen Viren mit Wildtyp-Genom führt, kann bei 293-VII+ zwar nicht verhindert werden, aber alle immortalisierenden Gene, die zur Proliferation von infizierten B-Zellen notwendig sind, wurden deletiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten, EBV-basierten viralen Vektoren werden in Verpackungszellen aus bis zu 18kb großen Plasmiden zu infektiösen Partikeln hergestellt. Durch mini-EBV-Vektoren hergestellte mini-EBV-Virionen können ebenfalls in der Gentherapie eingesetzt werden. Diese Vektoren sind etwa 80kb groß und beinhalten unter anderem EBNA1, *oriP*, *oriLyt* und TR. Sie können für die Expression beliebiger Fremdgene in virusfreien, immortalisierten B-Zellen verwendet werden (Banerjee, 1995, Hammerschmidt, 1989, Moosmann, 2002, Wang, 1995). B-Zelllinien, die spezifische Tumorantigene exprimieren, können als Antigen-präsentierende Zellen in der adoptiven Immuntherapie von Tumorerkrankungen

eingesetzt werden.

Darüber hinaus werden in meiner Arbeitsgruppe etwa 20kb kleine mikro-EBV-Vektoren getestet. Diese mikro-EBV-Vektoren wurden entwickelt, um B-Zellen zu transduzieren. Diese Vektoren bestehen aus den beiden Replikationsursprüngen *oriLyt* und *oriP*, sowie den Verpackungssignalen und dem EBNA1-Gen zum Erhalt des episomalen Plasmids in der Wirtszelle. Um die B-Zellen endogen zum Wachstum stimulieren zu können, tragen sie zusätzlich einen konstitutiven Aktivator von CD40 oder ein konstitutives Analogon von CD40. Neuere Plasmiden kodieren neben CD40L auch für das Fusionskonstrukt CD40L:CD40 und LMP1:CD40.

Im Folgenden wurde getestet, mit welcher Effizienz unterschiedliche B-Zelltypen, darunter auch B-CLL-Zellen, unter Verwendung der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII+ infiziert werden können. Dies geschah mittels Genvektoren von bis zu 18kb Größe. Zunächst wurde das Transfektionsprotokoll optimiert, um mit 293-VII+ maximale Transfektionseffizienz und Virusproduktion zu erreichen.

4.2.1.1 Transfektion und Virusproduktion

Im Gegensatz zu den meisten Herpesviren kann EBV *in vitro* einen latenten und einen lytischen Zyklus durchlaufen. Diese Besonderheit erlaubt die Konstruktion einer stabilen Verpackungszelllinie, in der das latente maxi-EBV-Genom stabil extrachromosomal vorliegt und der lytische Zyklus induziert werden kann.

Die beiden in meinen Versuchen eingesetzten Verpackungszelllinien produzieren spontan keine Viren oder Virus-ähnliche Partikel. Zur Herstellung infektiöser EBV-Partikel muss vielmehr ein verpackbarer Genvektor bei gleichzeitiger Induktion des lytischen Zyklus in die Verpackungszelllinie eingebracht werden. Durch Überexpression des Transaktivators BZLF1 wird der Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus von EBV eingeleitet (Countryman, 1985, Hammerschmidt, 1988a). Dabei bindet BZLF1 an den lytischen Replikationsursprung sowohl des maxi-EBV-Genoms als auch des Genvektors und verschiedener lytischer Promotoren. Als Folge kommt es zur DNA-Amplifikation des Genvektors in zirkulierender Weise (*rolling circle*). Während des lytischen Zyklus werden weitere Gene für Strukturproteine wie z. B. Glykoproteine und Kapsidproteine auf dem TR⁻ maxi-EBV-Genom exprimiert. Aus diesen Bausteinen setzen sich einzelne Kapside und Virus-ähnliche Partikel zusammen. Es entstehen rekombinante EBV-Partikel, die frei von Wildtyp- oder Helfervirus-DNA sind.

Die Kotransfektion mit einem Expressionsplasmid für BALF4 (gp125/110) steigert die Infektiösität der Viren (Dirmeier, 2003, Neuhierl, 2002). Das Genprodukt BALF4 wird nicht, wie für andere Glykoproteine von EBV typisch, in die Virushülle eingebaut, sondern liegt hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran vor (Gong, 1990). Es wurde gezeigt, dass das Glykoprotein gp125/110 für die Replikation des Virus und den Zusammenbau der Virusstruktur essenziell ist. Durch Infektion geeigneter Zellen kann im Anschluß die Infektiösität der erhaltenen und aufkonzentrierten Virus- bzw. Genvektorüberstände analysiert werden.

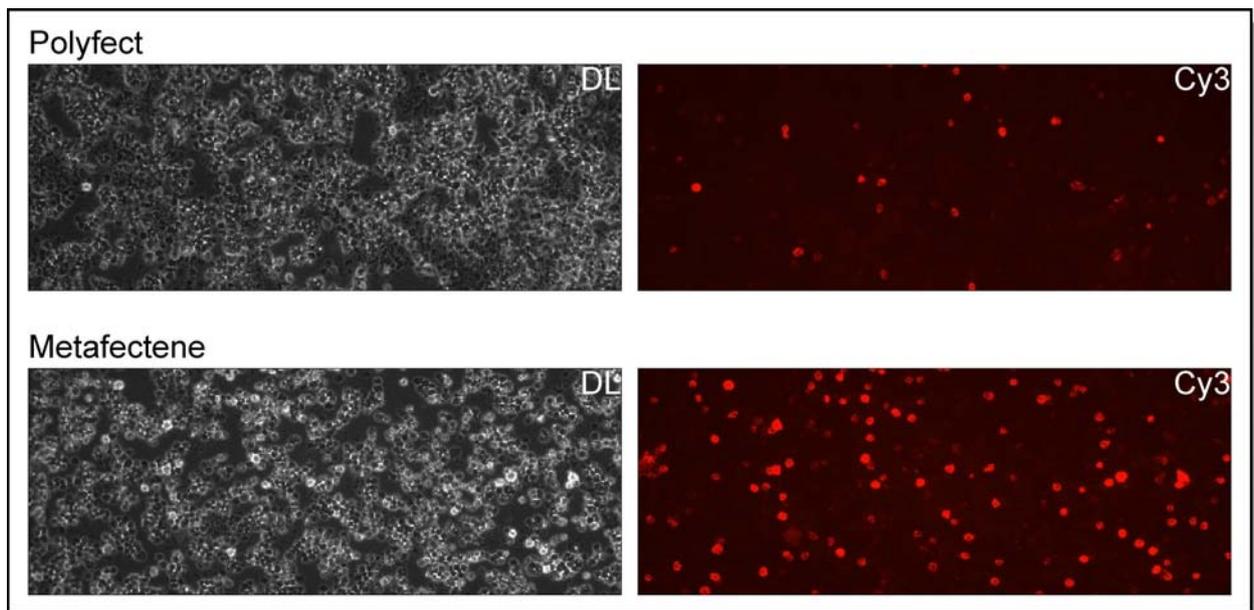


Abb. 18 Vergleichende Immunfluoreszenzfärbung zwischen den Transfektionsreagenzien Polyfect und Metafectene

TR2/293-Verpackungszellen wurden mit p1933 sowie den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4 transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen aufgearbeitet, auf einem Objektträger fixiert und die erfolgreiche Induktion des lytischen Zyklus durch Färbung gegen das Glykoprotein gp350/220 nachgewiesen. An den monoklonalen Antikörper gegen gp350/220 bindet ein Cy3-gekoppelter Sekundär-Antikörper, der in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Die Transfektion der Verpackungszelllinien erfolgte mit kommerziellen Transfektionsreagenzien, von denen mehrere getestet wurden. Zu Beginn der durchgeführten Versuche war Lipofectamin zusammen mit dem serumfreien Medium OptiMEM das Mittel der Wahl. Aus Kostengründen wurden Alternativen wie Polyfect und Metafectene getestet, Metafectene überzeugte schließlich durch besonders effiziente Transfektion (vgl. Abb. 18). Ein optimiertes Transfektionsprotokoll mit Metafectene ist in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5 Optimiertes Transfektionsprotokoll mit Metafectene für 293HEK-Zellen in einer 6-Kammern-Platte

Verlauf	Protokoll
Tag 1	<p>Verpackungszelllinie aussäen: 2-6 x 10⁵ pro Kammer einer 6-Kammern-Platte in 2ml ISCOVE/10%FCS</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ während Transfektion sämtliche Antibiotika vermeiden ○ Zellzahl mit Neubauer-Zählkammer und Trypanblau bestimmen ○ Zellen möglichst gleichmäßig auf dem Boden einer Kammer verteilen
Tag 2	<p>Transfektion: Medium abziehen und erneut 2ml ISCOVE/10%FCS zugeben</p> <p>Transfektionsansatz pro Kammer einer 6-Kammern-Platte:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 100µl ISCOVE + 0,25µg p0509 (BZLF1) + 0,25µg p2670 (BALF4) (+ 0,5µg TR⁺ Genvektor bei Verwendung einer Verpackungszelllinie) 2) 100µl ISCOVE + 5µl Metafectene pro µg DNA 1 und 2 mischen, maximal 20min bei RT inkubieren <ul style="list-style-type: none"> ○ Mediumwechsel erhöht Titer ○ Medium für Transfektionsansatz ohne FCS ○ Plasmide über Qiagen EndoFree Plasmidprep gewinnen ○ Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA mit Eppendorf Photometer
Tag 3	<p>Mediumwechsel: Medium abziehen und 5ml ISCOVE/10%FCS zugeben</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ durch Mediumwechsel wird überschüssiges Transfektionsreagenz entfernt und der Titer erhöht ○ frisches Medium kann auch <i>Pen/Strep</i> enthalten
Tag 6	<p>Virusernte: Überstand sammeln</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Zellen bei 1.200rpm/10min/RT abzentrifugieren und verwerfen oder mittels Immunfluoreszenzfärbung analysieren 2) Überstand bei 5.000rpm/20min/RT reinigen 3) Überstand durch 0,8µm Sterilfilter tropfen lassen 4) bei Bedarf im SW28-Rotor bei 12.500rpm/3h/10°C aufkonzentrieren 5) Konzentrat nach 24h erneut durch 0,8µm filtrieren <ul style="list-style-type: none"> ○ Virusüberstand kann im Kühlschrank mehrere Wochen aufbewahrt werden

Wie den meisten Reagenzien liegt Metafectene das Prinzip der liposomalen Transfektion zugrunde. Dabei bilden die negativ geladene Plasmid-DNA und das

polykationische, lipophile Transfektionsreagenz einen Komplex. In diesem kompakten Zustand ist die DNA vor Degradation durch Nukleasen geschützt und kann in die Zelle eingeschleust werden. Die Plasmid-DNA sollte höchste Reinheit aufweisen, eine Steigerung der Transfektionseffizienz kann durch Entfernen von prokaryontischen Endotoxinen während der Plasmidaufreinigung erreicht werden. Unter anderem beeinflussen das Verhältnis von Transfektionsreagenz und DNA sowie pH und Temperatur des Mediums die Komplexbildung und dessen Funktionalität. Metafectene kann in Medium mit Serumzusatz verwendet werden, was für empfindliche Zellen sehr vorteilhaft ist.

Die 293-VII+ Verpackungszellen lassen sich effizienter transfizieren, wenn sie unter optimalen Bedingungen gehalten und regelmäßig vereinzelt werden. In mehreren Testreihen zeigte sich, dass sich optimale Titer erreichen lassen, wenn die Verpackungszellen 12h vor der Transfektion mit einer Dichte von $2-6 \times 10^5$ Zellen pro Kammer einer 6-Kammern-Platte ausgesät wurden. Das Medium wurde 24h nach Transfektion gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht, um eventuelle Reste an Transfektionsreagenz im Überstand zu entfernen und den Titer zu steigern. Die virushaltigen Überstände wurden gesammelt und durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Dadurch konnten mit TR-2/293 und 293-VII+ Zellen Virustiter von etwa 10^5 bis 10^6 infektiöse Partikel/ml erzielt werden. Im Fall von 293-2089 (Wildtyp-EBV) erreichte der Virustiter Werte von etwa 10^6 bis 10^7 infektiöse Partikel/ml.

Als Negativkontrollen wurden die Zellen mit Überständen von Verpackungszellen inkubiert, in denen zwar der lytische Zyklus induziert, aber kein verpackbarer Genvektor kotransfiziert wurde. Eine weitere Kontrolle, die den eventuell möglichen passiven Transfer von DNA oder Protein erfassen sollte, erfolgte mit Plasmiden, deren Aufbau dem der Genvektoren gleicht, die aber keine Verpackungssignale tragen. Bei mehreren Raji-Infektionen hatte sich gezeigt, dass selbst bei Negativkontrollen eine leicht erhöhte eGFP-Expression zu erkennen war. Rekombinationen zwischen Helfergenom und Genvektor können zwar nicht ausgeschlossen werden, sind aber zu selten, um dieses Phänomen zu erklären.

Zur Überprüfung der Rekombinationsereignisse wurde unter anderem der Genvektor p0588 verwendet, welcher im Gegensatz zu vielen anderen Genvektoren keine eGFP-kodierende Expressionskassette trägt. Aufgrund homologer Sequenzen würde die Wahrscheinlichkeit der Rekombination steigen, wenn sowohl das Helfergenom als auch

der Genvektor eGFP tragen. Die Regeneration von Helfervirus kann als eGFP-Expression in transduzierten Zellen sichtbar werden. Man geht bei verpackbaren Plasmiden (p1933, p0588) von einer Rekombinationshäufigkeit von 0,03% bei TR²/293 bzw. 0,01% bei 293-VII⁺ aus, auch bei bloßer Induktion findet man 0,002% eGFP⁺ Zellen (Feederle, 2005, Hettich, 2006). Vermutlich liegt die über den eGFP-Marker phänotypisch detektierte Häufigkeit der Regeneration von Helfervirus mit 293-VII⁺ von etwa 0,02% weit unter der tatsächlichen Häufigkeit (Hettich, 2006). Daraus lässt sich schließen, dass die Transduktion genetischen Materials spezifisch von EBV-basierten Vektoren vermittelt wird, da transgene Expression bei Verwendung der als Negativkontrollen generierten Überstände sehr niedrig ist. Dennoch scheint ein geringer Übertrag stattzufinden. Vermutlich wird das fluoreszierende eGFP-Protein der Verpackungszelllinie selbst transportiert. Auf dieses Phänomen wird im Kapitel 4.2.3 noch näher eingegangen. Ein Vergleich für die optimierte Verpackungszelllinie 293-VII⁺ ist die bereits etablierte TR²/293, sowie Virusüberstände von induzierten 293-2089-Zellen, die das Wildtyp-maxi-EBV tragen.

4.2.1.2 Genvektoren

Die verwendeten EBV-basierten Genvektoren tragen als minimale Ausstattung die terminalen repetitiven Verpackungssignale, den lytischen Replikationsursprung von EBV sowie ein Markergen. Das Markergen kann für ein fluoreszierendes Protein kodieren oder für eine therapeutische Anwendung von Bedeutung sein. Im Hinblick auf eine sichere Anwendung in der Gentherapie wurden geeignete Genvektoren konstruiert und getestet.

4.2.1.2.1 *Klonierung des therapeutischen Genvektors mit hCD40L*

Das Markergen des therapeutischen Genvektors p2924 ist der humane CD40-Ligand unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Als Promotor-Elemente werden häufig virale Promotoren von SV40 (Simian Virus) oder CMV (Cytomegalovirus) verwendet, da diese in den meisten humanen Zellen eine verglichen mit zellulären Promotoren eine hohe Transkriptionsinitiation aufweisen (Cheng, 1993, Espel, 1990, Ghazal, 1990, Harms, 1999).

Die Expression des hCD40L soll in B-CLL-Zellen eine erhöhte Präsentation von Antigen durch gesteigerte Expression der kostimulatorischen Moleküle, Adhäsionsmoleküle, sowie MHC-Moleküle induzieren und dadurch eine Immunantwort auslösen (Kato, 1998,

Wierda, 2000). Dieser Ligand ist ein Typ-II-Membranprotein aus drei Untereinheiten und existiert sowohl membrangebunden als auch löslich (Hollenbaugh, 1992). Der Rezeptor CD40 ist unter anderem auf B-Zellen exprimiert und an deren Aktivierung bei der Immunantwort beteiligt (Laman, 1996). Durch Bindung des CD40L an CD40 (oder durch Antikörper vermittelte Oligomerisierung der Rezeptormoleküle) kommt es zur Aktivierung. Dies führt zur Proliferation ruhender, humaner B-Zellen *in vitro* (Banchereau, 1991a, Banchereau, 1991b, Noelle, 1992). Das hCD40L-Gen wurde mittels PCR von cDNA aus humanen peripheren mononukleären Zellen amplifiziert (vgl. Abb. 19).

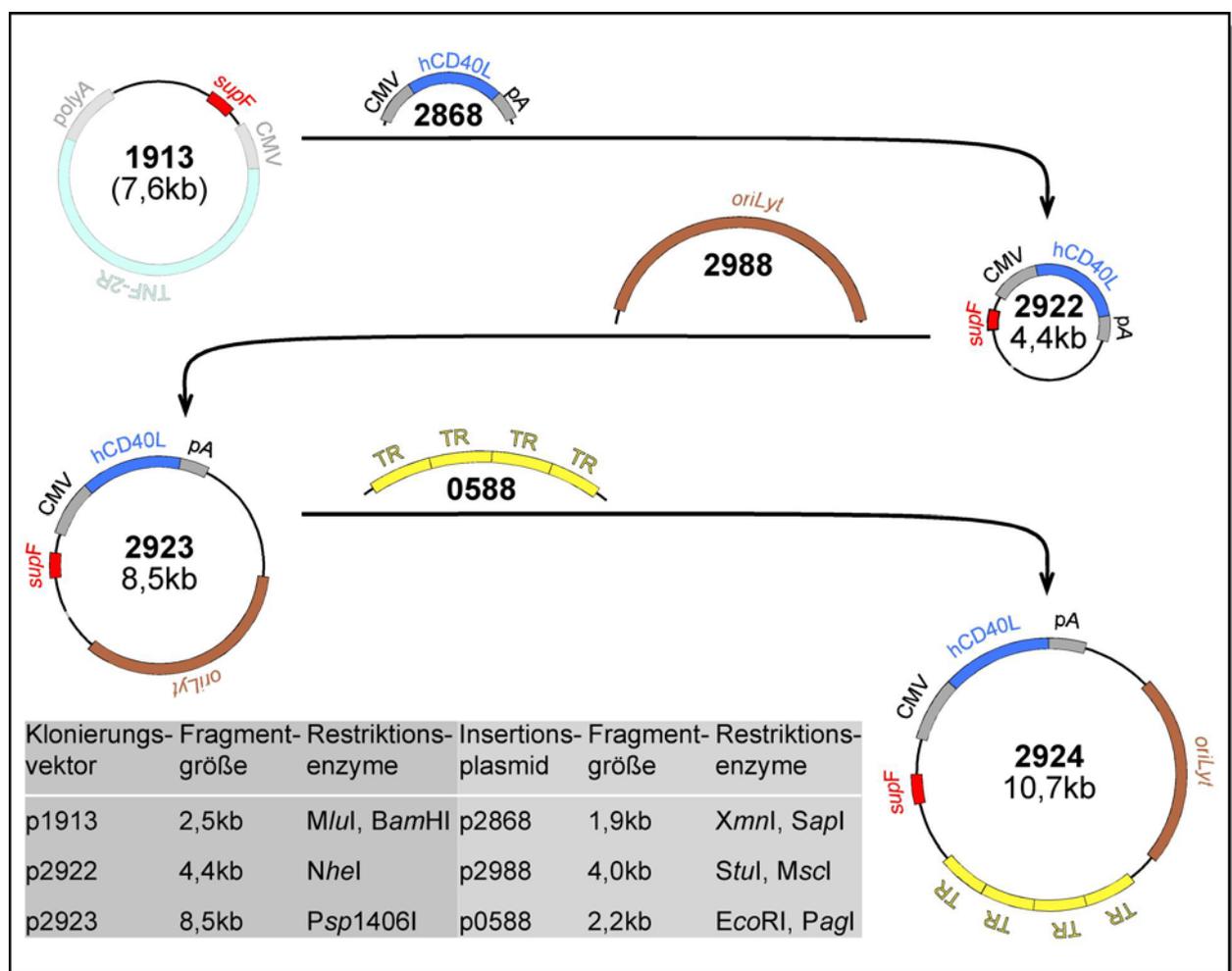


Abb. 19 Genealogie des therapeutischen Genvektors p2924

Erklärungen siehe im Text

Zur Klonierung des therapeutischen Plasmids diente p1913 als Ausgangs-DNA. Das Plasmid basiert auf pCDM8 von Invitrogen, trägt das *supF*-Gen und exprimiert das TNF-2R-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Aus p1913 wurde TNF-2R entfernt und durch hCD40L ersetzt. Das entstandene p2922 wurde geöffnet und um das

Fragment aus *oriLyt* des M-ABA-Stammes ergänzt. Im letzten Schritt wurde das Plasmid p2923 linearisiert und die TR-Sequenz aus p0588 eingefügt.

Sequenzhomologien zwischen Helfergenom und Genvektor wurden weitestgehend vermieden, um die Wahrscheinlichkeit der Rekombination möglichst gering zu halten. Deshalb sind die einzigen EBV-Sequenzen des Genvektors auf die essentiellen Elemente TR und *oriLyt* beschränkt. Der verwendete lytische Replikationsursprung des EBV-Stammes M-ABA unterscheidet sich geringfügig von B95-8 (Bornkamm, 1980, Freese, 1983). Eine für die Konstruktion des Genvektors in *E. coli* nötige Antibiotikaresistenz ist auf dem Ausgangsplasmid durch das Gen *supF* ersetzt worden. Dieses Gen kodiert für eine Tyrosin-amber-Suppressor-tRNA, die Mutationen im amber-Codon überlesen kann. Das Plasmid kann in *E. coli*-Stämmen, die Resistenzgene mit amber-Mutationen tragen, eingesetzt werden, da die *supF*-tRNA die Expression der Resistenzgene ermöglicht und so den *E. coli*-Zellen die jeweiligen Antibiotikaresistenz vermittelt. Das Ziel dieses Vorgehens war es, erstmals Genvektoren, die für den therapeutischen Ansatz bestimmt sind, ohne Antibiotikaresistenzgene zu konstruieren, um eine mögliche akzidentielle Übertragung solcher Gene im Patienten zu vermeiden. In Kapitel 4.2.1.2.2 wird auf diese Bakterienstämme näher eingegangen.

Der resultierende Genvektor p2924 trägt nun *supF*, hCD40L unter Kontrolle des CMV-Promotors aus pRK5, den lytischen Replikationsursprung von M-ABA und die terminalen repetitiven Verpackungssignale auf nur 11kb Genomgröße. Tab. 6 fasst die Klonierungsschritte zusammen.

Tab. 6 Genealogie des therapeutischen Genvektors p2924

Plasmid	Genotyp	Phänotyp	Nukleotidkoordinate der genetischen Modifikation	Einfügeplasmid
p1913	-	<i>supF</i>	#1.536 - #6.667	p2868
p2922	hCD40L	<i>supF</i>	#587	p2928 rc
p2923	hCD40L <i>oriLyt</i> (M-ABA)	<i>supF</i>	#4.651	p0588 rc
p2924	hCD40L <i>oriLyt</i> (M-ABA) TR	<i>supF</i>	-	-

rc: Insertionsfragment in umgekehrter Orientierung (*reverse/complement*)

Die Expression des hCD40L-Gens wurde in jeder Phase der Klonierung in 293HEK-

Zellen bestätigt. Die Färbung erfolgte mit gekoppelten Antikörpern in der Durchflusszytometrie. Wie erwartet wurde das Glykoprotein in der Zelle prozessiert und in der Plasmamembran der 293HEK-Zellen verankert. Abschließend wurde das gesamte Plasmid p2924 auf korrektes Genom sequenziert.

4.2.1.2.2 Kontroll-Genvektoren

Der therapeutische Genvektor p2924 wurde zu Beginn funktionell verglichen mit dem in unserem Labor etablierten Genvektor p1933, der neben TR, *oriP*, *oriLyt* und *Hyg* auch eGFP trägt. Ohne Ausnahme zeigten die mit p1933 generierten Virusüberstände nach Raji-Infektion etwa zehnfach höhere Titer. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dieser Vorteil an der Zusammensetzung des Plasmids liegt, wurden mehrere Kontroll-Genvektoren kloniert. Dazu wurden Plasmide konstruiert, welche auf p1913 basieren, aber statt hCD40L für ein fluoreszierendes Protein kodieren. Ebenso sollte das eGFP-Plasmid p1933 ein hCD40L-kodierendes Plasmid als Pendant bekommen. 0 zeigt einen Überblick über die generierten Genvektoren.

Tab. 7 Übersicht über die verwendeten TR⁺ Genvektoren

Plasmid	Markergen	Ursprung oriLyt	Resistenz	Größe (ca.)	sonstiges	basiert auf
p2924	hCD40L	M-ABA	<i>supF</i>	11kb	-	p1913
p3100	mRFP	M-ABA	<i>supF</i>	11kb	-	p1913
p3326	eGFP	M-ABA	<i>supF</i>	11kb	-	p1913
p3304	hCD40L	B95-8	<i>Amp</i>	17kb	<i>oriP, Hyg</i>	p0588
p3303	mRFP	B95-8	<i>Amp</i>	17kb	<i>oriP, Hyg</i>	p0588
p1933	eGFP	B95-8	<i>Amp</i>	17kb	<i>oriP, Hyg</i>	p0588
p3460	eGFP	B95-8	<i>supF</i>	17kb	<i>oriP, Hyg</i>	p0588

Mit den unterschiedlichen Genvektoren wurden in 293-VII+ Virusüberstände hergestellt und ihre Titer durch Infektion von Raji-Zellen untersucht. Wie erwartet zeigten alle auf p0588-basierten Genvektoren höhere Effizienzen. Abb. 20 zeigt exemplarisch einige FACS-Analysen.

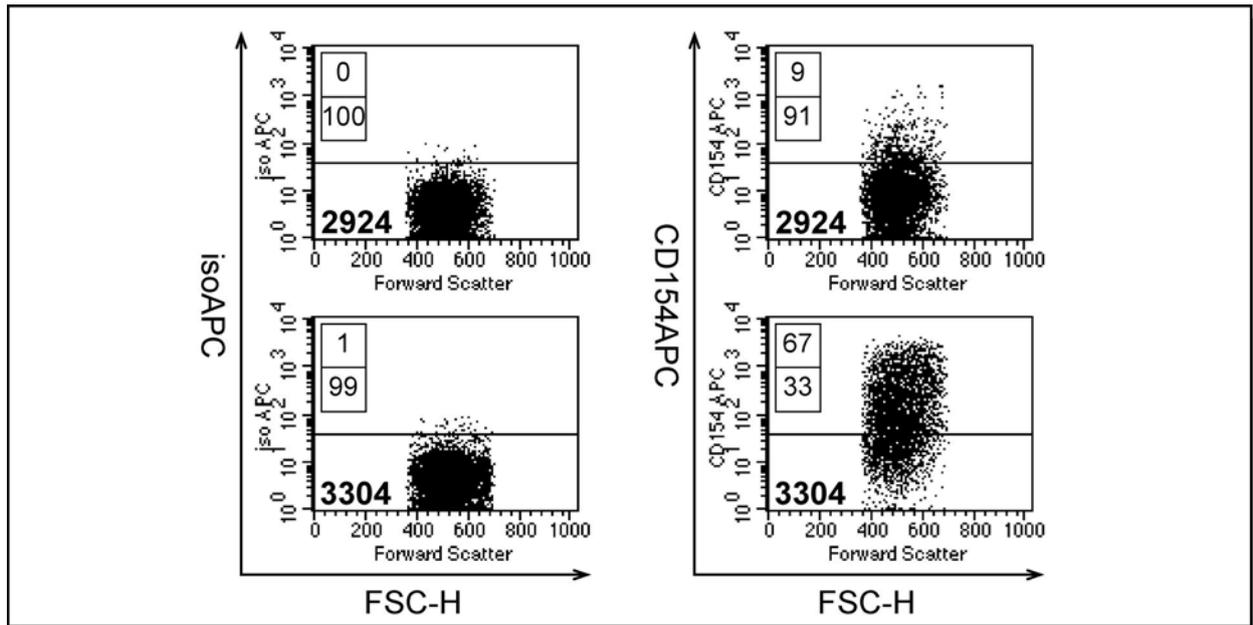


Abb. 20 Durchflusszytometrie von Raji-Zellen nach Infektion mit rekombinantem hCD40L-kodierendem EBV

Die beiden hCD40L-kodierenden Genvektoren p2924 und p3304 wurden hinsichtlich ihrer Infektionseffizienz verglichen. 293-VII⁺-Verpackungszellen wurden mit p2924 und p3304 sowie mit den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4 transfiziert. Mit den generierten Virusüberständen wurden Raji-Zellen infiziert. Als Negativkontrolle dienten infizierte Raji-Zellen nach Färbung mit einem Isotyp-Antikörper. Ansonsten wurde die hCD40L⁺ Population durch Färbung mit CD154 markiert.

Im Hinblick auf eine praktische Anwendung sind höhere Verpackungseffizienzen wichtig, dennoch sollte ein möglicher Übertrag des Ampicillin-Resistenzgens unterbunden werden. Deshalb wurde ein weiteres Plasmid p3460 kloniert, welches auf p0588 basiert, aber statt der Antibiotika-Resistenz das *supF*-System nutzt. Zum Vergleich wurden nun mit den beiden Genvektoren p1933 und p3460 in 293-VII⁺-Virusüberstände generiert und damit Raji-Zellen infiziert. Beide Genvektoren erzeugten vergleichbare Titer, die Klonierung des *supF*-Gens als prokaryontischer Selektionsmarker hatte, wie erwartet, keinen negativen Effekt. Rekombinante EBV-Partikel aus den Genvektoren p1933 bzw. p3460 sind bei der Infektion von humanen B-Zellen mit dem phänotypischen Marker eGFP gleich effizient (vgl. Abb. 21).

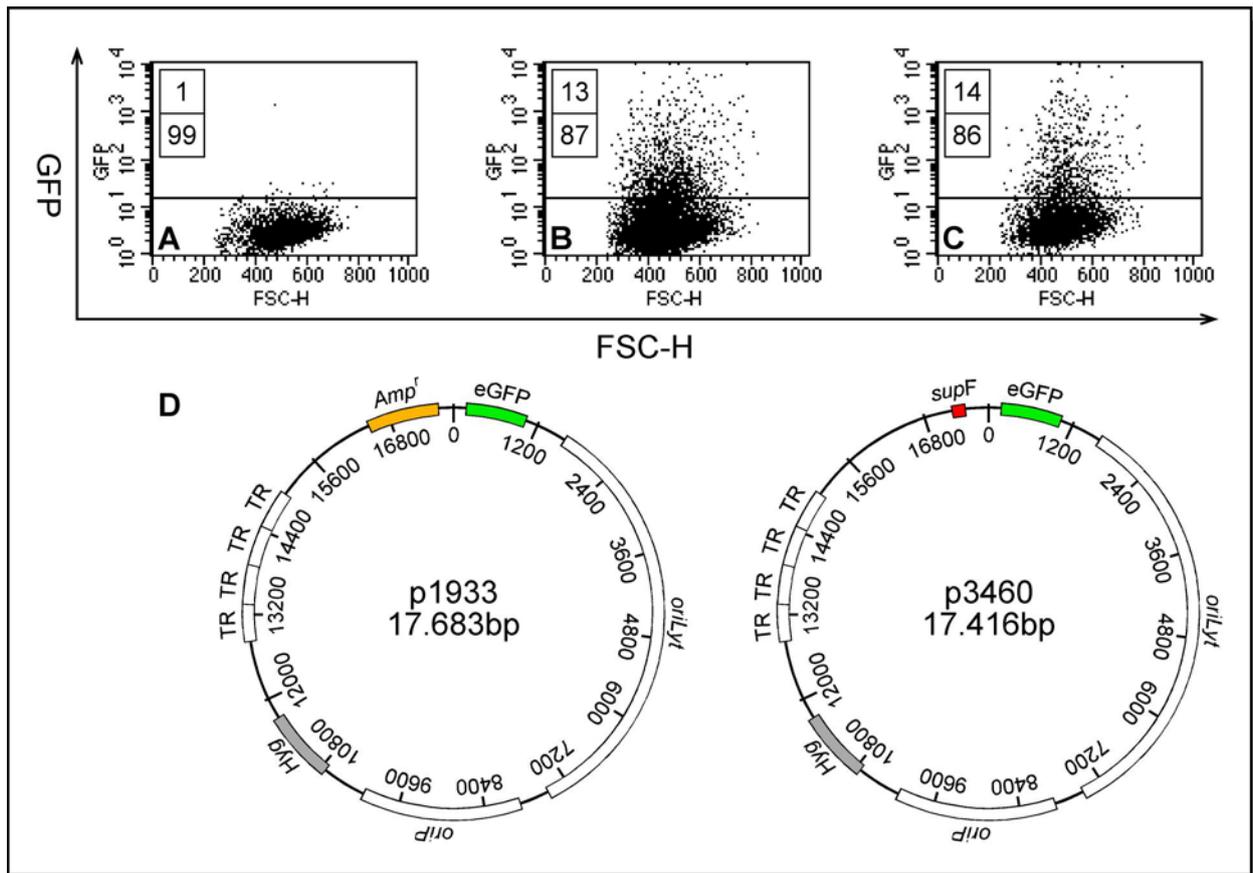


Abb. 21 Durchflusszytometrie von Raji-Zellen, die mit den Virusüberständen aus p1933 bzw. p3460 infiziert wurden

Die eGFP-kodierenden Genvektoren, die unterschiedliche prokaryontische Resistenzgene tragen, wurden hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz verglichen. 293-VII+-Verpackungszellen wurden mit p1933 (B) bzw. p3460 (C) sowie mit den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4 transfiziert. Mit den generierten Virusüberständen wurden Raji-Zellen infiziert. Als Negativkontrolle (A) dienen Raji-Zellen nach Inkubation mit Überständen, die durch Transfektion von 293-VII+ nur mit p0509 und p2670 hergestellt wurden. D zeigt die beiden Plasmidkarten der Genvektoren p1933 und p3460.

4.2.1.3 Klonierung des *E. coli*-Stammes DH10B *Amp^r/Tet^r*(amber)

Alle bisher bekannten *E. coli*-Stämme, die *supF*-Plasmide propagieren, tragen die amber-Mutationen der Resistenzen auf einem zusätzlichen, extrachromosomalen Plasmid. So trägt der Bakterienstamm MC1061/P3 das Plasmid P3, welches auf das Plasmid RP1 (Mindich, 1976, Pansegrau, 1994) zurückgeht. P3 kodiert für die Antibiotikaresistenzen mit jeweiliger amber-Mutation für Ampicillin und Tetracyclin. Um Verunreinigungen bei der Plasmidpräparation durch das mitpräparierte P3 zu unterbinden, wurde ausgehend von DH10B (Invitrogen) ein neuer *E. coli*-Stamm etabliert, der die mutierten Antibiotikaresistenzen auf dem Genom trägt.

Der *E. coli*-Stamm DH10B *Amp^r/Tet^r*(amber) wurde ausgehend von dem Plasmid pST76-kan (Posfai, 1997), welches das Kanamycin-Resistenzgen trägt, kloniert. Beide amber-Mutationen wurden mittels PCR aus dem episomalen P3-Plasmid des *E. coli*-Stammes MC1061/P3 mit den Primern *amberAmp5'* 5'-TTACCAATGCTTAATCAGTGA und *amberAmp3'* 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCGT, sowie den Primern *amberTet5'* 5'-GTGAAACCCAACATACCCCTG und *amberTet3'* 5'-TCAGCGATCGGCTCGTTGCC amplifiziert und in das *recA1*-Gen von pKY102 (Ihara, 1985) eingefügt.

Die gesamte Kasette wurde mit dem an der *PmeI*-Schnittstelle geöffneten pST76-kan ligiert. Das daraus resultierende Plasmid p3229 trägt die Gene für *Amp^r* (amber) und *Tet^r* (amber) von P3 mit flankierenden Bereichen der *recA*-Sequenz und wurde über homologe Rekombination in das *recA1*-Gen von DH10B integriert. Das stabil transformierte *recA*-Expressionsplasmid p2650 (Gruffat, 2002, Muyrers, 2000) vermittelt Ampicillinresistenz und ermöglicht die Rekombination in DH10B. Nach Temperaturerhöhung auf 42°C geht das temperatursensitive p2650 verloren. Bei Selektion auf Kanamycin wachsen nur noch Kolonien, die bereits homolog rekombiniert haben. Die Integration wurde durch PCR-Analyse verifiziert. Der Phenotyp wurde durch Transformation eines *supF*-tragenden Plasmids wie p3460 oder p1913-Derivate und Selektion auf Ampicillin und Tetracyclin bestätigt. Kontrollplasmide ohne *supF* konnten wie erwartet nicht in DH10B *Amp^r/Tet^r*(amber) propagiert werden.

4.2.2 Infektion von B-Zelllinien und humanen B-Zellen mit rekombinanten Viruspartikeln generiert mit 293-VII+

Die in 293-2089 generierten EBV-Partikel zeigen Wildtyp-Eigenschaften, sie infizieren alle humane B-Lymphozyten. Gleiche Eigenschaften konnten bereits für rekombinante, in TR²/293 hergestellte Genvektoren gezeigt werden (Delecluse, 1999, Wendtner, 2003). In diesem Kapitel soll die Transduktionseffizienz von Genvektoren, die mit der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII+ hergestellt worden waren, untersucht und verschiedene B-Zelltypen als Rezipienten verglichen werden.

Dazu wurden zunächst im Labor etablierte B-Zelllinien und später primäre humane B-Zellen transduziert. Die Anzahl eGFP-exprimierender CD19+ B-Zellen, deren erfolgreiche Transduktion und damit des Virustiters wurden mit Durchflusszytometrie ermittelt. Darüber hinaus sollten Aussagen über Expression unterschiedlicher Markergene wie auch des hCD40L in infizierten Zellen getroffen werden. Abschließend

wurde mittels IFN- γ -ELISA die Aktivierung von T-Zellen durch hCD40L-Expression auf B-Zellen untersucht.

4.2.2.1 Infektion unterschiedlicher B-Zelltypen

Zur Analyse der Infektionseffizienz der mit 293-VII+ hergestellten Partikel wurden B-Zellen aus dem Blut von Patienten mit B-CLL, ruhende primäre B-Zellen aus Adenoiden oder aus Blut, aktivierte B-Blasten (Schultze, 1997) und die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji infiziert.

Blutproben aus der Medizinischen Klinik III des Münchener Klinikums Großhadern konnten aufgearbeitet und getestet werden. Diese Proben stammten von Patienten mit B-CLL unterschiedlicher Stadien, vor allem auch von nicht-therapierten Patienten. Insgesamt wurde Material von 52 Patienten untersucht. Um die B-Zellen aus Adenoiden oder Blut zu gewinnen, wurden zunächst mononukleäre Zellen (PBMCs, vor allem Lymphozyten und Monozyten) mittels Dichtezentrifugation über einen Gradienten aus Ficoll von Leukozyten und Erythrozyten abgetrennt. Bei B-CLL-Proben wurde zur Bestimmung des enthaltenen CD19⁺ B-CLL-Anteils die Oberflächenexpression verschiedener Marker, etwa CD19, CD5, CD3, CD21, CD154, CD54, CD80, CD86 in der Durchflußzytometrie mit jeweils spezifischen Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern gemessen. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden die Messungen mit einem Kontrollantikörper (Isotypenkontrolle) verglichen. Die isolierten primären Zellen enthielten einen durchschnittlichen B-CLL-Anteil von ca. 65%.

Wildtyp-EBV kann B-CLL-Zellen infizieren, sie jedoch nicht transformieren (Klein, 1999, Laytragoon-Lewin, 1995, Rickinson, 1982, Wendel-Hansen, 1994). Auch eGFP-kodierende Partikel aus TR2/293 infizieren effizient die CLL-Zelllinie MEC1 (Stacchini, 1999) sowie frisch isolierte CD5/CD19⁺ B-CLL-Zellen (Wendtner, 2003). Dabei spielten weder klinisches Stadium noch Geschlecht oder Alter eine Rolle. Dennoch konnten Schwankungen in der Infektionseffizienz festgestellt werden. B-CLL-Zellen wurden nur mit Überständen von induzierten 293-VII+-Zellen, die als Genvektor p1933 enthielten (p0588-basiert, *Amp* als Selektionsresistenzmarker), sowie mit Überständen aus beiden hCD40L-kodierenden Plasmiden infiziert. Dabei wiesen Infektionen mit dem Genvektor p1933 einen Titer von etwa 4×10^4 (1×10^4 - 1×10^5) Partikel/ml bei nicht konzentrierten bzw. 6×10^6 (2×10^6 - 1×10^7) bei konzentrierten Überständen auf. Aufkonzentrieren der Virusüberstände erreicht also eine Steigerung des Titers um etwa das 100-fache. Bei

Verwendung des p0588-basierten, *Amp*-kodierenden Plasmids p3304 konnte der Titer um das Zehnfache im Vergleich zu p2924 gesteigert werden.

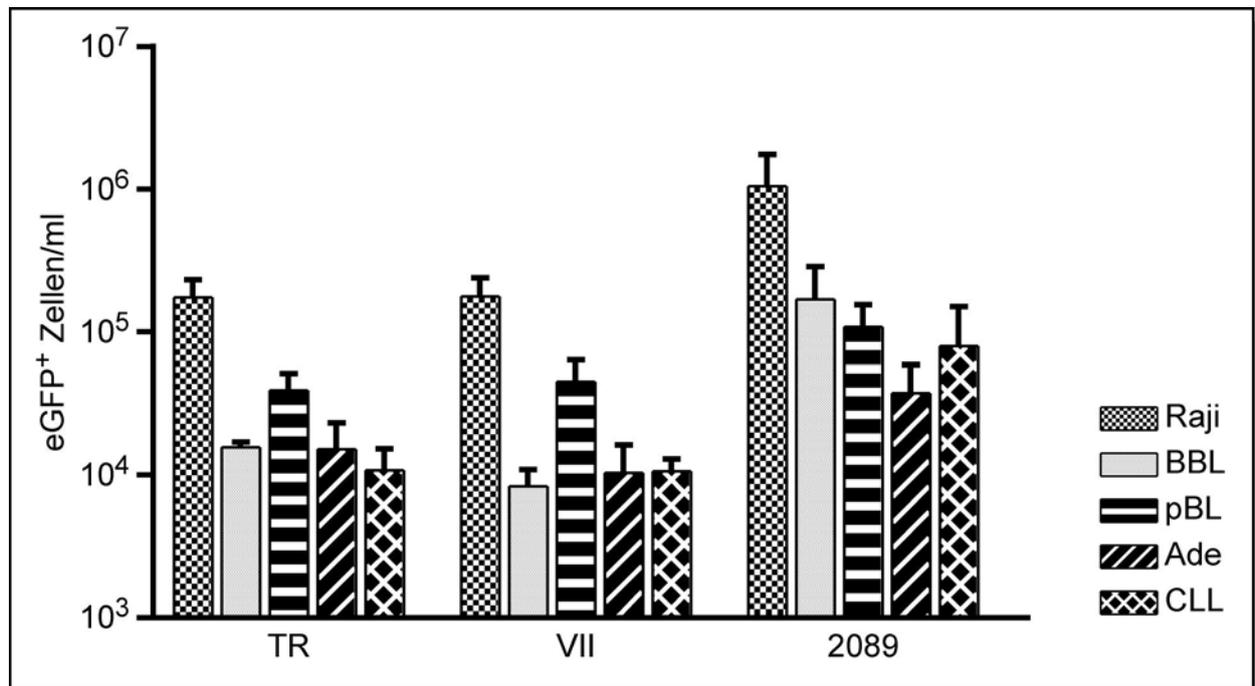


Abb. 22 Diagramm einer FACS-Analyse nach Infektion verschiedener B-Zellen mit Virusüberständen generiert in TR²/293 (TR) und 293-VII⁺ (VII) aus p1933 sowie in 293-2089 (2089)

Mit Ausnahme der primären B-Zellen aus dem Blut (pBL, 10⁶/ml) wurden jeweils 10⁵ B-Zellen aus Adenoid (Ade), aus dem Blut von Patienten mit B-CLL (CLL), aktivierte B-Blasten (BBL) und Raji-Zellen (Raji) infiziert. Die Überstände wurden generiert durch Transfektion von TR²/293 (TR) und 293-VII⁺ (VII) mit p1933 neben den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4 bzw. durch Induktion der Zelllinie 293-2089 (2089). Nur die Virusüberstände aus TR²/293 und 293-VII⁺ wurden zehnfach konzentriert. Durch Kalibrierung mit einem Standardvolumen an Latex-Kügelchen wurden eGFP⁺ Zellen drei Tage nach Infektion mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dargestellt sind die Konzentrationen an eGFP⁺ CD19⁺ B-Zellen pro ml Virusüberstand. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Aktivierte B-Blasten sind EBV⁻ B-Zelllinien, die *in vitro* aus PBMCs (Memory-B-Zellen oder Plasmazellen) von gesunden humanen Spender etabliert wurden (Arpin, 1995). Zur Erhaltung der Proliferation ist die Stimulierung des CD40-Rezeptors durch CD40L und IL-4 notwendig (Banchereau, 1991a), womit eine Aktivierung durch T-Zellen simuliert wird. Ursprünglich dienten diese B-Blasten als antigenpräsentierende Zellen zur Generierung von antigenspezifischen T-Zellen für autologe Immuntherapien (Lapointe, 2003, Schultze, 1997). Die B-Blasten LenL5 wurden freundlicherweise von Andreas Moosmann zur Verfügung gestellt. Die EBV⁺ Raji-Zelllinie lässt sich superinfizieren und diente als Standard-System bei den Infektionsanalysen. Nach

dreitägiger Inkubation mit rekombinanten eGFP-kodierenden Partikeln lässt das Auftreten von eGFP⁺ Raji-Zellen Rückschlüsse auf erfolgreiche Genvektortransduktion zu. Wie in Abb. 22 dargestellt ist, können unterschiedliche B-Zellen mit Virusüberständen aus 293-VII⁺ infiziert werden. Außerdem sind die Effizienzen vergleichbar zu den unter gleichen Bedingungen in TR²/293 generierten Überständen, jedoch schwächer als die mit Wildtyp-EBV.

Die gewonnenen Virusüberstände wurden nur teilweise aufkonzentriert. Im Rahmen dieser Arbeit wiesen Infektionen von Raji-Zellen mit p1933-tragenden rekombinanten EBV-Partikeln einen Titer von etwa 3×10^4 (1×10^4 - 7×10^4) Partikel/ml bei nicht konzentrierten Überständen bzw. 2×10^6 (4×10^5 - 1×10^7) bei konzentrierten Überständen auf. Der Titer von aufkonzentrierten Überständen aus dem Genvektor p3326, welches auf p1913 basiert und *supF* als Selektionsresistenzmarker enthält, war mit 5×10^5 (9×10^4 - 1×10^6) Partikel/ml um etwa ein Viertel geringer.

Dennoch wurde aus diesen Experimenten deutlich, dass die sieben Deletionen im maxi-EBV-Genom der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII⁺ keinen negativen Einfluss auf die Verpackungseffizienz und Transduktionseffizienz im Vergleich zur TR²/293 Verpackungszelllinie haben.

4.2.2.2 Infektion mit CD40L

Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung wurden Infektionsexperimente mit hCD40L durchgeführt. Dazu wurden B-CLL-Zellen mit rekombinanten hCD40L⁺ EBV-Partikeln infiziert, als Kontrolle diente die Infektion von Raji-Zellen. Im Durchflusszytometer wurde die Expression von CD154 analysiert, im Fall der B-CLL-Zellen auch eine mögliche Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf den Tumorzellen.

Mit Hilfe der Verpackungszelllinie 293-VII⁺ wurden die beiden hCD40L-kodierenden Genvektoren (p2924 und p3304) wie beschrieben in rekombinante EBV-Partikel verpackt. Mit den Überständen wurden teils frisch gewonnene, teils kryokonservierte B-CLL-Zellen unterschiedlicher Spender infiziert. Raji-Zellen dienten im Vergleich als Standard.

Virusüberstände, die mit dem p1913-basierten, *supF*-tragenden Plasmids p2924 hergestellt wurden, erreichten einmalig einen Titer von 6×10^4 Partikel/ml bei nicht konzentrierten bzw. 1×10^5 (0 - 2×10^5) bei konzentrierten Überständen nach Infektion

von Raji-Zellen. Die aufkonzentrierten Überstände von induzierten 293-VII⁺-Zellen mit dem Genvektor p3304 zeigten mit 1×10^6 ($9 \times 10^5 - 1 \times 10^6$) Partikel/ml einen zehnfach höheren Titer.

Wie auch bei eGFP-kodierenden Genvektoren beobachtet werden konnte, zeigt das auf p0588-basierte Plasmid p3304 höhere Transduktionsraten. Im Durchflusszytometer war nicht nur die Expression von hCD40L deutlich erhöht, es konnte auch eine stärkere Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 gemessen werden, die für die Induktion einer effizienten T-Zellantwort notwendig sind (siehe Abb. 23).

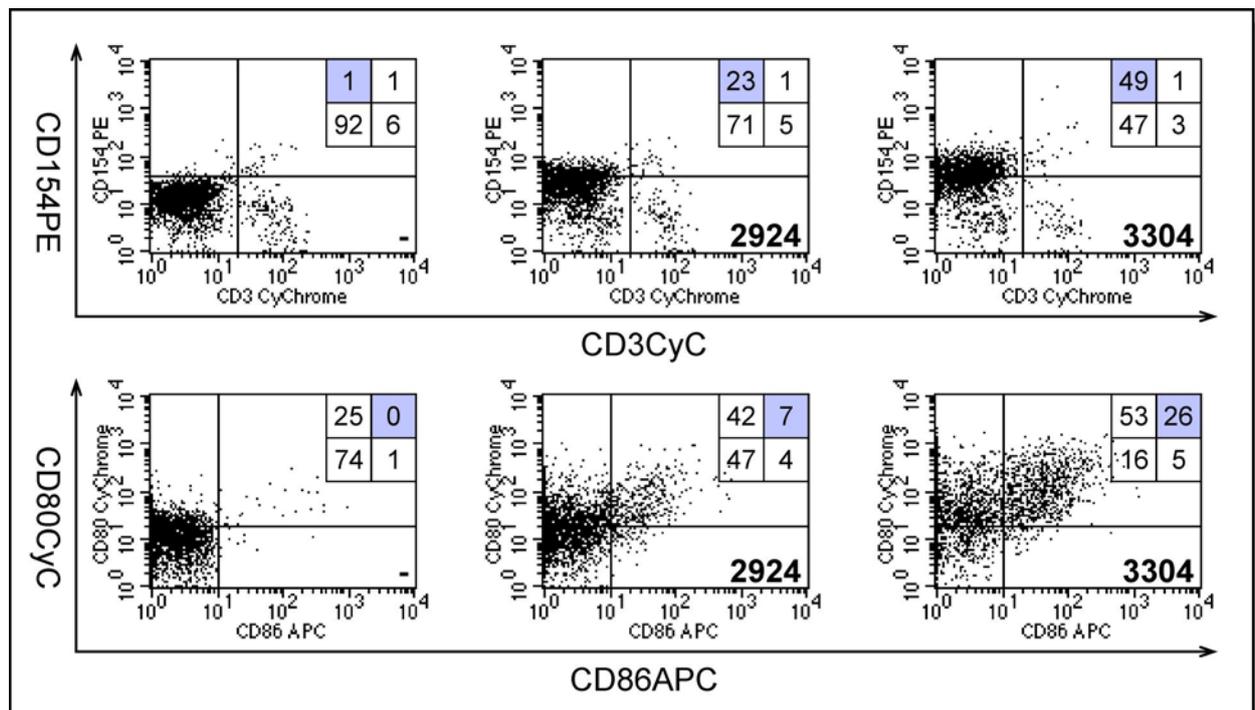


Abb. 23 Durchflusszytometrie von B-CLL-Zellen nach Infektion mit rekombinantem hCD40L-kodierendem EBV

Die beiden hCD40L-kodierenden Genvektoren p2924 und p3304 wurden hinsichtlich ihrer Transduktionseffizienz verglichen. 293-VII⁺-Verpackungszellen wurden mit p2924 und p3304 sowie je mit den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4 transfiziert. Mit den generierten Virusüberständen wurden B-CLL-Zellen infiziert. Als Negativkontrolle (-) dienten B-CLL-Zellen nach Inkubation mit Überständen, die durch Transfektion von 293-VII⁺ nur mit p0509 und p2670 hergestellt wurden. Die obere Reihe zeigt die CD3⁻/CD154⁺ Population und somit den Anteil der positiv infizierten B-Zellen, die untere die Zellpopulation mit erhöhter Expression der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und -2 nach Antikörperfärbung mit CD80 und CD86.

Durch Aufkonzentrieren der Virusüberstände wurde generell eine überproportionale Steigerung des Titers erreicht, besonders aber bei Verwendung von eGFP-tragenden Plasmiden. Eine Schwachstelle bei der Messung mittels Durchflusszytometer ist die Eingrenzung der zu messenden Population, da diese immer arbiträr gesetzt wird.

Vermutlich wurden bei der Messung des Titers unterschiedliche Zell-Populationen ausgewertet, die nicht von einander getrennt werden konnten.

Antikörpertest und -fixierung konnten die schwache Reproduzierbarkeit mit p2924 nicht abschließend klären. Eventuell wurde zur Detektierung zu wenig CD40L exprimiert, wodurch der Nachweis nicht möglich war. Eine andere Erklärung könnte sein, dass der spontan von B-Zellen produzierte lösliche funktionale Rezeptor sCD40 an den membranständigen Liganden CD40L bindet und somit einen Antikörper-Nachweis unmöglich macht (Contin, 2003). Wird nämlich membranständiger CD40-Rezeptor durch CD40L ausgelöst (*triggering*), folgt sofort die Induktion zur Freisetzung großer Mengen an sCD40. Eine Produktion von sCD40 könnte allerdings durch einen synthetischen Metalloproteinase-Inhibitor vollständig blockiert werden (Contin, 2003). Dies würde auch erklären, warum bei den Kontrollen während der Klonierung des Genvektors p2924 die Expression von hCD40L in 293HEK-Zellen bestätigt werden konnte, 293HEK-Zellen produzierten kein sCD40.

Wie in der Literatur beschrieben wurde, kann die Transduktion von primären CLL-Zellen gesteigert werden, wenn die Zellen auf einer Feederzell-Schicht plattiert werden, die CD40L exprimieren (Kato, 1998). Durch Feeder-Stimulation kann der Zellzyklus von malignen B-Zellen verändert werden, so dass die Zahl an Zellen ansteigt, die sich in der proliferativen S-Phase befinden (Buhmann, 1999, Teoh, 2000) (Decker, 2000a, Decker, 2000b). In einer anderen Veröffentlichung jedoch kann die EBV-Transduktionsrate von B-CLL-Zellen und somit die Marker-Expression durch Stimulierung mit CD40L-Feederzellen oder CpG-Oligodeoxynukleotide nicht gesteigert werden (Wendtner, 2003). Die eGFP-Expression war vermutlich durch Abwesenheit von EBNA1 sogar deutlich höher ohne weitere Aktivierung (Kaneda, 2000, Langle-Roualt, 1998, Middleton, 1994, Wendtner, 2003).

4.2.2.3 T-Zell-Assay mittels Interferon- γ -ELISA

Um festzustellen, ob die Expression von hCD40L auf B-CLL-Zellen auch zur Sezernierung von Interferon- γ (IFN- γ) in stimulierten T-Zellen führt, wurde ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt. Dieser abschließende T-Zell-Assay sollte Aussagen über die Aktivierung der Immunerkennung zulassen. Bezogen auf die klinische Anwendung kann dieser Versuch Rückschlüsse auf eine erhoffte Immunantwort der T-Zellen geben,

welche durch Aktivierung mittels CD40L auf den B-CLL-Zellen hervorgerufen wird.

Dazu wurden B-CLL-Zellen eines Spenders mit verschiedenen Virusüberständen inkubiert und drei Tage nach Infektion im Verhältnis 1:5 bis 1:10 zu PBMCs/Monozyten allogener Spender gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden die Überstände dieser Reaktion für die Zytokin-Messung auf IFN- γ untersucht.

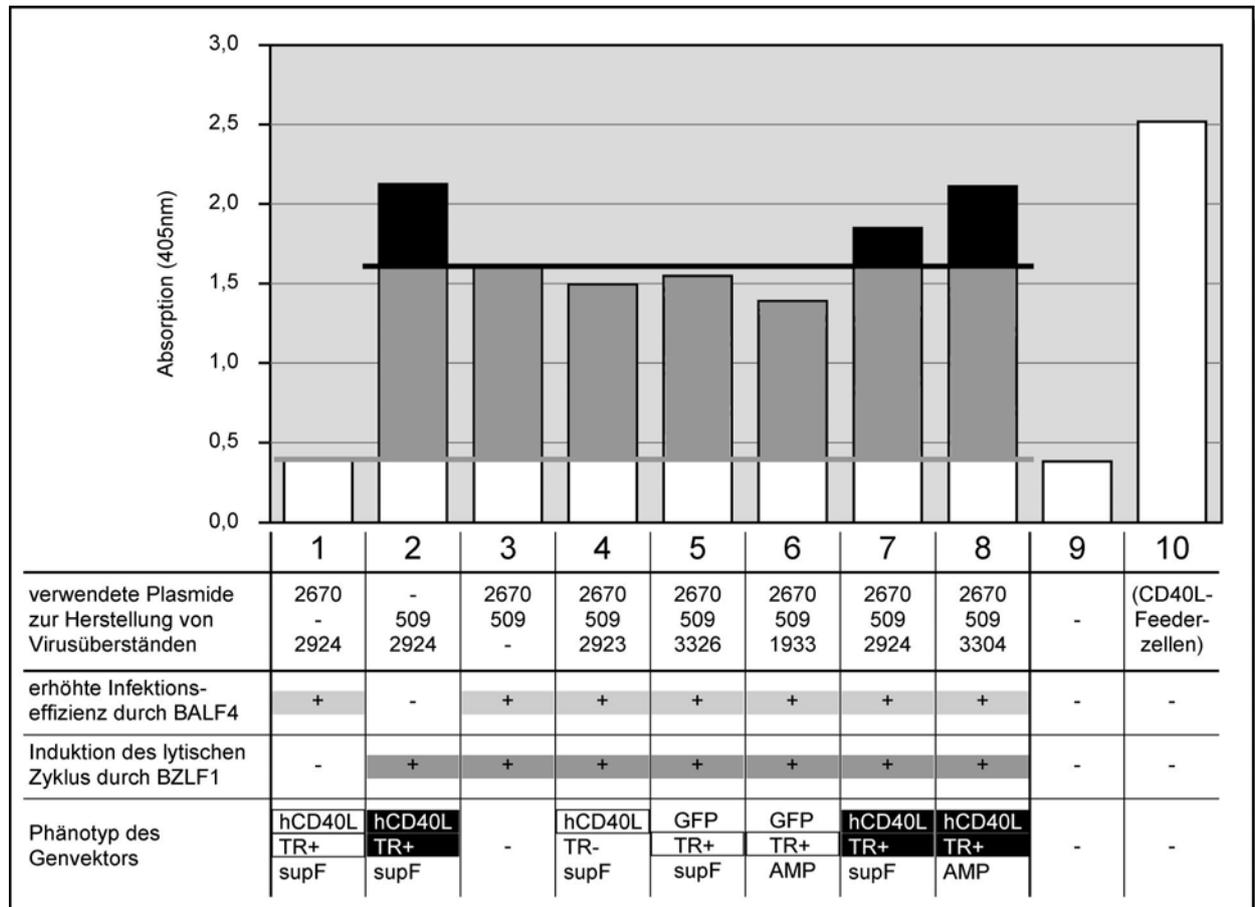


Abb. 24 Diagramm des T-Zell-Assays mittels IFN- γ -ELISA

Die im Diagramm gezeigte Absorption gibt die Mengen an sezerniertem IFN- γ wieder. Die erste Zeile unterhalb des Diagramms beschreibt die verwendeten Plasmide zur Herstellung unterschiedlicher Virusüberstände (vergleiche Erklärung im Text, bezogen auf die Ziffern). Die beiden folgenden Zeilen verdeutlichen die An- und Abwesenheit der Expressionsplasmide p2670 (BALF4) und p0509 (BZLF1). Die unterste Zeile charakterisiert den Phänotyp des jeweils verwendeten Genvektors. Die farbige Unterlegung in den Zeilen und Balken veranschaulicht unterschiedliche IFN- γ -Niveaus. BALF4 scheint keinen Einfluss auf Sezernierung von IFN- γ zu haben, für die erste Stufe (dunkelgrau) ist die Induktion des lytischen Zyklus notwendig. Nur Virusüberstände mit verpackbaren (TR+), hCD40L-kodierenden Genvektoren überwinden ein weiteres IFN- γ -Niveau (schwarz).

Um eine bloße Stimulierung durch EBV-Infektion ausschließen zu können, wurde Kontrollüberstände in 293-VII+-Zellen durch Transfektion von p2924 und p2670, jedoch

ohne Induktion des lytischen Zyklus hergestellt (1, vergleiche Abb. 24). Eine weitere Kontrolle sollte klären, ob das Fehlen von BALF4 während der Virusproduktion im IFN- γ -ELISA negative Auswirkungen haben könnte (2). Darüber hinaus wurden bei der Herstellung von Virusüberständen unterschiedliche Genvektoren verwendet. Im Ansatz (3) fehlt jeglicher verpackbarer Genvektor und in Ansatz (4) wurde das TR⁻, hCD40L-kodierende Vorkonstrukt von p2924 verpackt. Um den erwarteten positiven Effekt der hCD40L-Expression gegen vergleichbare hCD40L⁻ Genvektoren abgrenzen zu können, wurden die eGFP-kodierenden Pendants in (5) und (6) im Vergleich zu den hCD40L-kodierenden in (7) und (8) verwendet. (5) und (7) tragen jeweils *supF* und basieren auf p1913, wohingegen (6) und (8) das Ampicillin-Resistenzgen tragen und auf p0588 basieren. Als Negativkontrolle (9) dienten PBMCs, die nur in Medium inkubiert wurden. Für die Positivkontrolle (10) wurden B-CLL-Zellen auf CD40L-Feederzellen aktiviert. Abb. 24 zeigt das Diagramm des T-Zell-Assays.

Abschließend lässt sich sagen, dass jegliche Infektion von B-CLL-Zellen mit rekombinantem EBV, welches nur nach Induktion des lytischen Zyklus generiert wird, zur Sezernierung von IFN- γ in T-Zellen führt. Da jedoch nur die drei Proben mit verpackbaren, hCD40L-kodierenden Partikeln eine Steigerung, wenn auch nur eine geringe, hervorriefen, muss die Infektion der B-CLL-Zellen mit hCD40L-kodierenden Genvektoren zu erhöhter Sezernierung von IFN- γ in stimulierten T-Zellen führen. Da nicht verpackbare, hCD40L-kodierende Partikel keine IFN- γ -Sezernierung hervorrufen, ist ein möglicher hCD40L-Proteinübertrag als Ursache auszuschließen. Selbst wenn kein CD40L auf den B-CLL-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte, scheint dessen Existenz durch schwache, aber nachweisbare Stimulierung der T-Zellen bewiesen zu sein. Da IFN- γ das Hauptmolekül ist, welches von T-Helferzellen nach zell-vermittelter Zytotoxizitätsaktivierung sezerniert wird, kann von einer Korrelation zwischen der Konzentration von IFN- γ und der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen ausgegangen werden (Biagi, 2003, Morel, 1998, Scheibenbogen, 2000).

4.2.3 Exosomen

In mehreren Arbeiten wurden bereits die Produktion von leeren viralen Partikeln beschrieben (Feederle, 2005, Greenstone, 1998, Mandic, 2004). Diese Partikel wurden als Virus-ähnliche Partikel (*virus-like particles*), Mikrovesikeln oder auch Exosomen bezeichnet. Exosomen sind etwa 30-100nm kleine Membranvesikel mit

endosomatischem Ursprung. Erstmals wurden Exosomen als eine Art Reinigungssystem beschrieben, das von Retikulozyten während der Reifung zu Erythrozyten gebildet wird, um überflüssige Proteine wie den Transferrinrezeptor oder die Acetylcholinesterase zu eliminieren (Johnstone, 1987, Pan, 1983a, Pan, 1983b). Von anderen zellulären Strukturen lassen sich Exosomen im Elektronenmikroskop eindeutig anhand ihrer gleichmäßig runden Form unterscheiden. Sie haben einen Durchmesser von 40-100nm und heben sich dadurch eindeutig von anderen zellulären Strukturen wie etwa apoptotischen Körperchen ab. Unabhängig von der zellulären Quelle sedimentieren Exosomen relativ einheitlich bei $\geq 70.000xg$ und lassen sich so über differenzielle Zentrifugationsschritte leicht aus Zellkulturüberständen isolieren.

In ihrer Proteinzusammensetzung weichen sie ebenfalls von anderen Vesikeln ab. Sie beinhalten 5'Nukleotidase-Aktivität, Transferin-Rezeptoren sowie Marker, mit denen man den Verlauf der Endozytose verfolgen kann. Dennoch ist über die potenzielle biologische Funktion und den Verbleib *in vivo* wenig bekannt. Im Zytoplasma liegen Exosomen in multivesikulären Körperchen (*multivesicular body*, MVB) vor, nachdem sich aus frühen Endosomen internalisierte Membranproteine zusammengefügt haben. Diese internen Vesikel werden nach Fusion des multivesikulären Körperchens mit der Plasmamembran als Exosomen freigesetzt (Février, 2004). Aus Zellkulturüberständen lassen sich Exosomen in differenziellen Zentrifugationsschritten anreichern und nach Präzipitation bei $70.000xg$ isolieren. In der Plasmamembran von Exosomen sind einige Proteine wie Lamp2, CD63 und MHC II, die auch in späten Endosomen gefunden werden, angereichert, während andere proteinäre Bestandteile der zellulären Membran nicht nachgewiesen werden konnten (Hegmans, 2004). Ähnlich wie *lipid rafts* sind Exosomen reich an Cholesterin und Sphingolipiden (Wubbolts, 2003). Exosomen transportieren nur bestimmte Proteine, die hierzu eventuell durch eine besondere Form der Ubiquitinierung markiert werden (Hicke, 2001a, Katzmann, 2001).

In vivo und *in vitro* sezernieren die meisten Zellen Exosomen (Pisitkun, 2004, Thery, 2002b). Sie wurden bei Retikulozyten (Johnstone, 1987), dendritischen Zellen und Makrophagen (Thery, 2002b) ebenso beschrieben wie bei EBV-immortalisierten B-Zellen (Vazirabadi, 2003). Auch in Urin wurden sie gefunden (Pisitkun, 2004). Aus Tumorzellen konnten ebenfalls Exosomen isoliert werden. Sie werden konstitutiv produziert und in den extrazellulären Raum sezerniert (Thery, 2002b). Auf ihrer Membran transportieren diese in Tumorzellen exprimierten Exosomen (TEX) auch

Tumor-spezifische Antigene, welche nach Aufnahme durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen präsentiert werden und so zur Aktivierung von T-Zellen führen (Segura, 2005, Thery, 2002b, Wolfers, 2001). Da TEX einen inhibitorischen Effekt auf Immunzellen ausüben, Signaltransduktionswege unterhalb der ζ -Kette des T-Zellrezeptors blockieren sowie die Proliferation und Zytotoxizität von T-Zellen unterdrücken oder diese nach Präsentation aktivieren, könnten sie zur Immunevasion beitragen (Kim, 2004, Taylor, 2005, Taylor, 2003, Thery, 2002a, Wolfers, 2001).

Auf ganz ähnliche Art und Weise funktioniert das Ausschleusen durch *budding* bei einigen behüllten Viren. So wird etwa durch eine hohe lokale Konzentration an viralen Syntheseprodukten in der Zellmembran ein Zusammenfassen dieser Produkte in Vesikeln initiiert. In manchen Fällen scheint das unabhängige Entstehen von Exosomen das Knospen infektiöser Viruspartikel aktiv zu unterstützen (Gould, 2003). Von HIV ist darüber hinaus beschrieben, dass es aus Monozyten mit Hilfe von Exosomen austritt (Nguyen, 2003). In Exosomen konnte auch das Hüllprotein E2 des humanen Hepatitis C Virus nachgewiesen werden (Masciopinto, 2004), sowie LMP1 des EBV (Flanagan, 2003, Vazirabadi, 2003). Diese leeren viralen Partikel des EBV-basierten Systems könnten ähnlich wie Hepatitis B und Papillomavirus als potentiell Vakzin verwendet werden (Feederle, 2005, Greenstone, 1998, Mandic, 2004). Dazu muss allerdings noch weiter an der Sicherheit und der Immunogenität dieser leeren Partikel gearbeitet werden.

In diesem Kapitel werden initiale Versuche beschrieben, mit denen die Existenz von Exosomen auch im System der Verpackungszelllinie nachgewiesen werden kann. Weitere Experimente sollten zeigen, ob die Fähigkeit der Exosomen, B-Zellen zu transduzieren, durch die Interaktion von gp350/220 mit CD21 vermittelt wird. Zuletzt soll anhand einer Reaktivierung von spezifischen T-Zellen gezeigt werden, dass der Übertrag eines Fremd-Gens durch Exosomen auf B-Zellen möglich ist und dieses dort immunogen ist. Durch Verpackung verschiedener viraler Proteine könnten Exosomen als sicherer, DNA-freier Impfstoff zur Induktion spezifischer Immunantworten etwa gegen EBV und CMV Verwendung finden.

4.2.3.1 Vergleich der Infektionseigenschaften von rekombinantem EBV und Exosomen

Bereits bei den Infektionsexperimenten der vorherigen Kapitel überraschten die vermeintlichen Negativkontrollen mit einer leicht erhöhten eGFP-Fluoreszenz-Intensität, welche durch Übertrag des eGFP aus der Verpackungszelle stammen musste. Für therapeutische Anwendungen muss jegliches Risiko eines „stillen“ Übertrags charakterisiert sein, jedoch könnten mittels „stillen“ Übertrags neue Einsatzgebiete entdeckt werden.

Grün-fluoreszierende Raji-Zellen waren stets dann zu beobachten, wenn sie mit Überständen der Verpackungszelllinien behandelt wurden, in denen der lytische Zyklus von EBV durch Transfektion von p0509 induziert worden war. Sowohl im Fluoreszenz-Mikroskop als auch bei Messungen am Durchflusszytometer war eGFP nachweisbar, auch wenn kein verpackbares Plasmid kotransfiziert worden war, die Bildung von intakten Viruspartikeln *per definitionem* also gar nicht möglich war. Insbesondere bei FACS-Messungen konnte die Aussage getroffen werden, dass die eGFP-Intensität der Zellen nach Inkubation mit Virusüberständen, die aus den Vektoren p1933, p3326 oder p3460 hergestellt wurden, stets um etwa den Faktor 10 stärker war, als die der Negativkontrollen. Die Intensität dieser beobachteten eGFP-Fluoreszenz würde eher einen Transfer des fluoreszierenden Proteins als einen Transfer des genetischen Materials davon vermuten lassen, da eine Produktion in der B-Zelle selbst zu größeren Konzentrationen und somit zu höheren Intensitäten führen würde als ein bloßer Proteintransfer. Die übertragenden Partikel müssen sehr klein sein, da die eGFP-Übertragung nach Infektion mit Virusüberständen von Negativkontrollen durch Zentrifugation oder Filtration nicht reduziert werden konnte. Wurden humane PBMCs gesunder Spender mit Virusüberstand von Negativkontrollen infiziert, zeigten nur die B-Zellen einen eGFP-Anstieg im FACS, nicht aber andere primäre Immunzellen.

Da EBV einen ausgeprägten B-Zelltropismus besitzt und keine anderen Zellen des peripheren Blutes infiziert, lag die Vermutung nahe, dass die selektive Bindung durch ein oder mehrere virale Proteine, die in der Membran der Exosomen zu finden sind, vermittelt wurde. Die Arbeitsgruppe von Henri-Jaques Delecluse analysierte die Überstände von TR⁻2/293-Zellen nach Induktion des lytischen Zykluses und fand viele leere Viruspartikel ohne virale DNA und sehr selten (0,001% der infizierten Zellen) defekte infektiöse Viren, die das lytisch replizierte, TR⁻ EBV-Genom enthalten

(Feederle, 2005). Diese waren in der Lage, primäre B-Zellen zu infizieren.

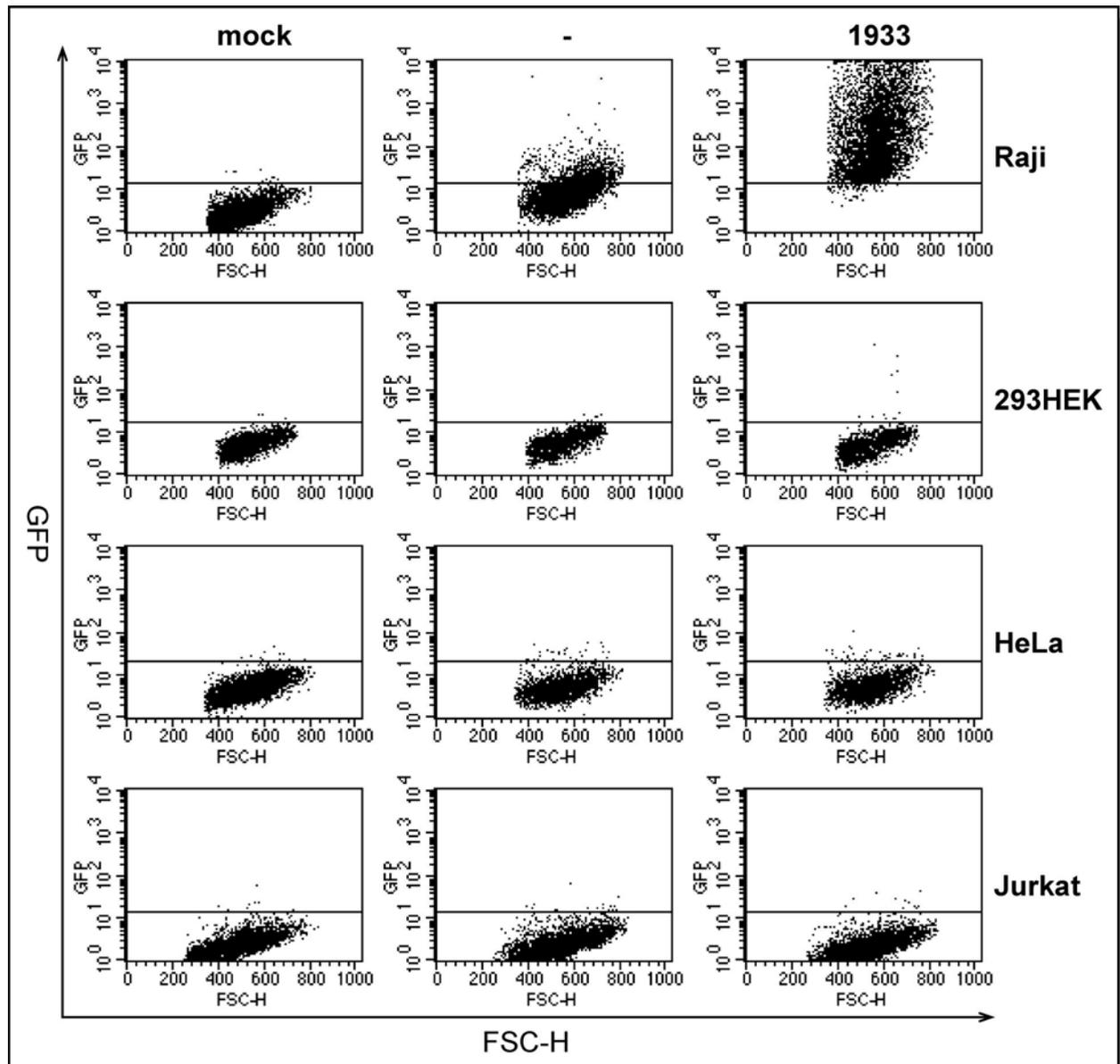


Abb. 25 Durchflusszytometrie von CD21⁻ Zelllinien nach Infektion mit rekombinantem eGFP-kodierendem EBV

293-VII⁺-Verpackungszellen wurden mit den beiden Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4 transfiziert (-) bzw. zusätzlich mit p1933. Mit den generierten Virusüberständen wurden verschiedene CD21⁻ Zelllinien infiziert. Als Positivkontrolle dienten CD21⁺ Raji-Zellen.

Abb. 25 zeigt die Ergebnisse einer Durchflusszytometrie, bei der die CD21⁻ Zelllinien 293HEK, HeLa und Jurkat keine positive Infektion mit rekombinantem eGFP-kodierendem EBV aufwiesen. In den folgenden beiden Kapiteln wurden Experimente durchgeführt, die die Beschaffenheit dieser Partikel näher charakterisieren sollten.

4.2.3.2 Mikroskopische Analyse des Übertrags durch Exosomen

Um ein genaueres Bild des eGFP-Transfers durch Exosomen zu bekommen, wurden Raji-Zellen nach Infektion in einem Konfokalem Lasermikroskop analysiert.

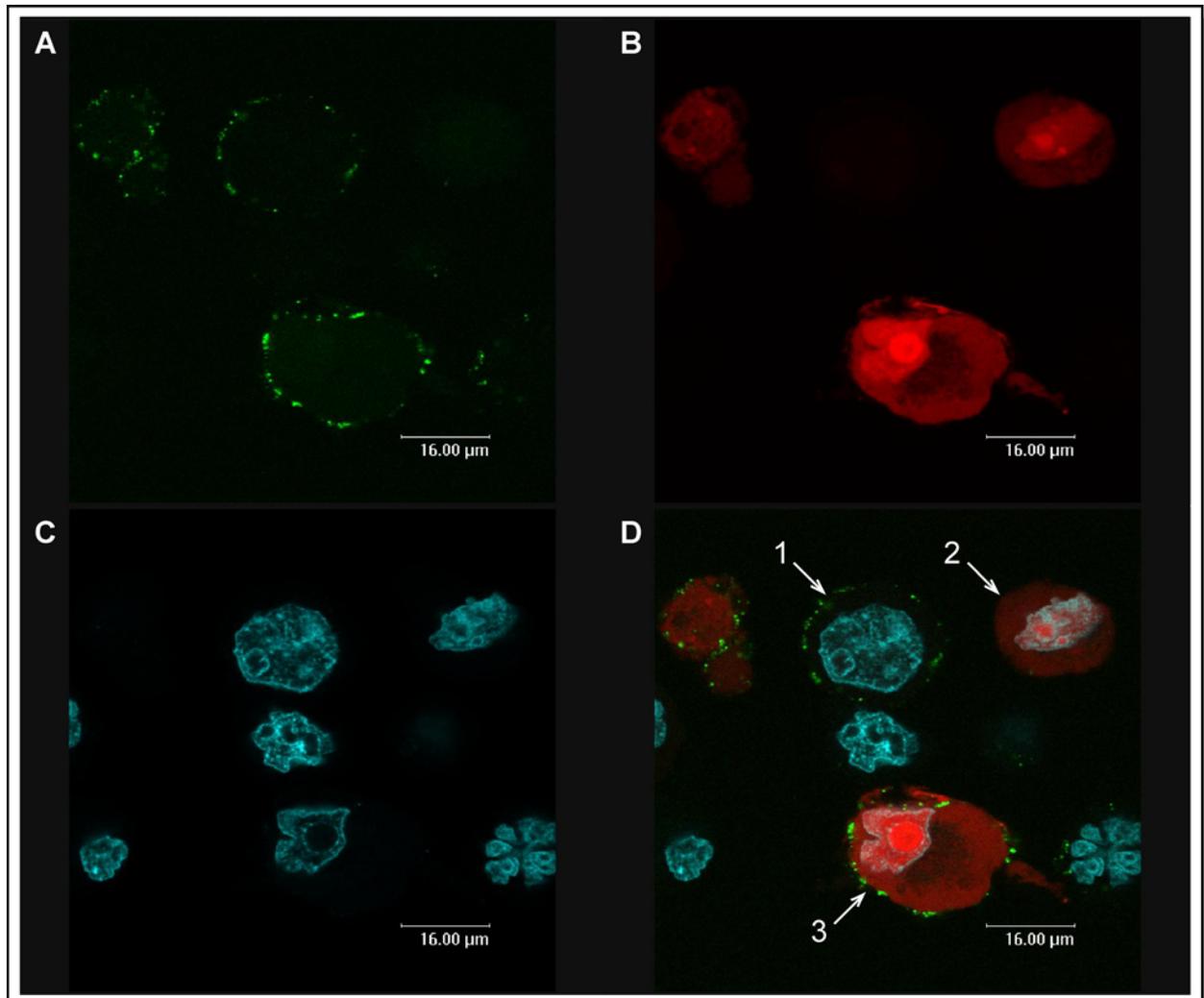


Abb. 26 Konfokale Lasermikroskopie von Raji-Zellen nach Infektion mit mRFP-kodierendem Virusüberstand

Die Verpackungszellen 293-VII+ wurden mit dem mRFP-kodierenden Plasmid p3100 und den Expressionsplasmiden für BZLF1 und BALF4 transfiziert. Mit dem Virusüberstand wurden Raji-Zellen infiziert und im Konfokalen Lasermikroskop auf eGFP (A) und mRFP (B) analysiert. In (C) ist die zelluläre DNA nach DAPI-Kernfärbung zu sehen. (D) zeigt die Überlagerung der 3 Fluoreszenzen, (1) kennzeichnet eine nur eGFP⁺, (2) eine nur mRFP⁺ und (3) eine doppelt-positive Raji-Zelle.

In Abb. 26 wird sichtbar, dass die eGFP⁺ Partikel auf der Zellmembran anlagern und nicht internalisieren (1). Das mRFP-Protein liegt dagegen im Zytoplasma verteilt vor (2). Ein eGFP-Übertrag findet also unabhängig von transienter Infektion durch rekombinantes EBV statt, kann aber auch zusammen auftreten (3).

Da eGFP in diesem Fall nicht in der Raji-Zelle translatiert worden sein kann, liegt die Vermutung nahe, dass das Protein aus dem Zytoplasma der Verpackungszelllinie mittels Exosomen transportiert worden war. Vermutlich binden die Exosomen selektiv an CD21 über gp350/220 auf der Zelloberfläche.

4.2.3.3 Immunantwort gegen das CMV-Protein pp65

Im nächsten Experiment wurde der Versuch unternommen, ein Fremd-Protein, in diesem Fall pp65, über Exosomen auf B-Zellen zu übertragen. Das Phosphoprotein pp65 ist ein immundominantes T-Zellantigen des humanen Cytomegalovirus und induziert bei gesunden, virusinfizierten Personen eine starke MHC-I-restringierte T-Zellantwort und eine lebenslang hohe Zahl an spezifischen Gedächtnis-T-Zellen.

Mit Hilfe der TR²/293-Zelllinie wurden nach Infektion mit einem pp65-exprimierenden mini-EBV-Plasmid aus dem Blut eines gesunden CMV-seropositiven Spenders die lymphoblastoide Zelllinie (LCL) THV1 von Andreas Moosmann hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Durch wiederholte Restimulation der T-Zellen mit bestrahlten pp65-LCLs wurde die autologe polyklonale und CMV-spezifische T-Zelllinie f46P ebenfalls von Andreas Moosmann generiert und bereitgestellt. Der CD8⁺ T-Zellklon f46P erkennt spezifisch das CD8-restringierte pp65-Epitop RPHERNGFTVL. Zytotoxische T-Zellen reagieren mit IFN- γ -Ausschüttung auf Kontakt mit dem eigens prozessierten und im Kontext mit MHC-Molekülen präsentierten Antigen. Mittels ELISA wurde die Sekretion von IFN- γ in den Überstand nach spezifischer Stimulation quantifiziert.

Im ersten Ansatz wurden Überstände aus der Verpackungszelllinie 293-VII⁺ nach Transfektion mit den nicht-verpackbaren Expressionsplasmiden für pp65 (pSG5-pp65) sowie BZLF1 und BALF4 gewonnen. Nach Anreicherung durch mehrstufige Zentrifugation (5min/1.200rpm, 20min/4.000rpm, 30min/7.500rpm, 1h/25.000rpm) wurden die mini-LCLs THV1 damit inkubiert. Der T-Zellklon f46P wurde im Verhältnis 2:5 mit den inkubierten mini-LCL für 12h gelagert. Die Reaktivierung der CMV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen wurde durch Analyse des Überstandes über einen IFN- γ -ELISA gemessen (Moosmann, 2002).

Wie in Abb. 27 deutlich wird, kann man mit den Überständen, die nach Transfektion von 293-VII⁺-Zellen mit dem Plasmid pSG5-pp65 hergestellt wurden, mini-LCLs THV1 inkubieren, so dass die T-Zelllinie f46P nach Kontakt spezifisch IFN- γ sezerniert. Das

Fremdprotein pp65 ist also durch nicht-viralen Transfer auf die mini-LCLs übertragen worden. Bei gleichzeitiger Transfektion des Expressionsplasmides von BZLF1 erhöht sich die Menge an produziertem IFN- γ , was auf Induktion des lytischen Zyklusses, erhöhte Exosomen-Produktion oder Segregation von gp350/220 zugeführt werden kann.

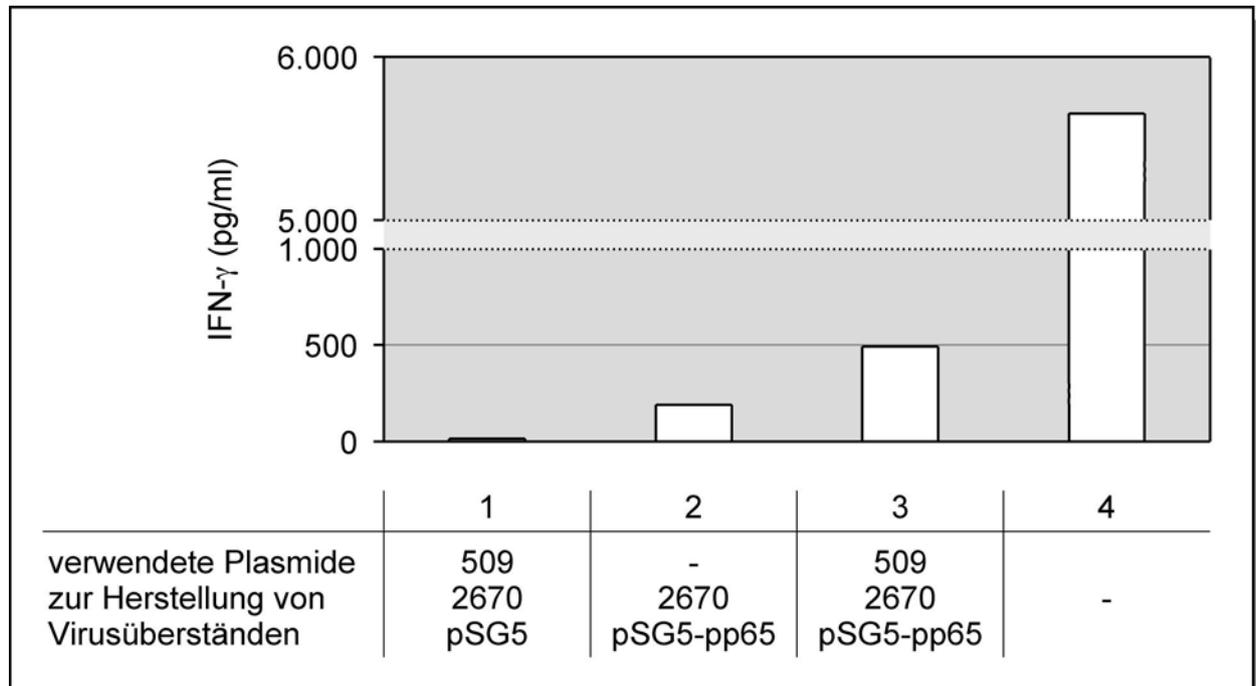


Abb. 27 Diagramm des T-Zell-Assays mittels IFN- γ -ELISA

Mit der Verpackungszelllinie 293-VII+ wurden 3 verschiedene Überstände generiert. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pSG5 (1) neben den Expressionsplasmiden für BZLF1 (p0509) und BALF4 (p2670) kotransfiziert. Im Ansatz (2) tragen die Exosomen BALF4 und pp65 (pSG5-pp65), bei (3) wurde zusätzlich der lytische Zyklus induziert. Im Ansatz (4) wurden die T-Zellen als Positivkontrolle mit der Stimulatorzelllinie THV1 inkubiert.

Um den Einfluss des viralen Hüllproteins gp350/220 bei der Bindung von Exosomen an B-Zellen zu untersuchen, wurden im nächsten Ansatz EBV⁻ 293HEK-Zellen nur mit dem pp65-Expressionsplasmid pSG5-pp65, sowie pSG5-pp65 zusammen mit einem nicht-verpackbarem Expressionsplasmid für das virale Glykoprotein gp350/220 transfiziert. Nach Anreicherung der Exosomen im Überstand durch mehrstufige Zentrifugation (10min/1.200rpm, 20min/4.000rpm, 70min/7.500rpm, 75min/25.000rpm) wurden die mini-LCLs THV1 inkubiert. Der T-Zellklon f46P wurde im Verhältnis 2:5 mit den infizierten LCL stimuliert.

Abb. 28 zeigt eine deutliche Aktivierung der T-Zellen nach Inkubation der mini-LCLs, welche mit Überständen aus dem Expressionsplasmid von pp65 behandelt wurden.

Werden 293HEK-Zellen gleichzeitig mit dem Expressionsplasmid von gp350/220 transfiziert, führt dies zu einer gesteigerten Aktivierung (siehe Ansatz 3 in Abb. 28). Wie schon in den vorherigen Kapiteln gezeigt, bestätigt dies die Beobachtung, dass ein Übertrag dieser als Exosomen definierten Partikel auf B-Zellen und durch die Interaktion des EBV-Glykoproteins gp350/220 mit CD21 noch verstärkt werden kann.

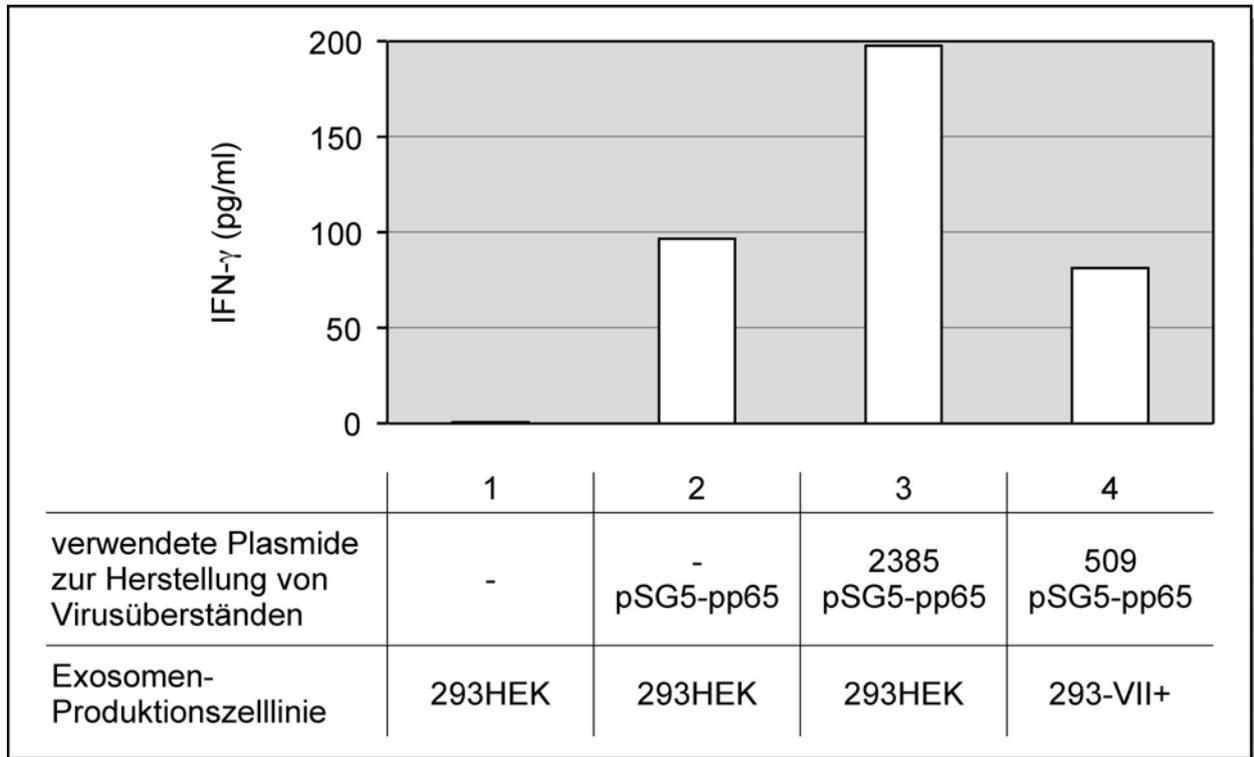


Abb. 28 Diagramm des T-Zell-Assays mittels IFN- γ -ELISA

In den Ansätzen (1) bis (3) wurden 293HEK-Zellen analysiert. (1) dient als Negativkontrolle und stellt bloßen Überstand ohne Transfektion dar. Für (2) wurden 293HEK-Zellen transfiziert mit dem Expressionsplasmid für pp65 (pSG5-pp65), und zusätzlich mit dem Expressionsplasmid für gp350/220 (p2385) (3). Für (4) wurden 293-VII+-Zellen neben Induktion des lytischen Zyklus mittels p0509 transfiziert mit pSG5-pp65.

5 DISKUSSION

Um Krankheiten auf zellulärer Ebene therapieren zu können, ist in der Regel ein Transfer von genetischem Material notwendig. Dieses transgene Material kann sehr effizient durch virale Vektoren in Zielzellen geschleust werden. Unterschiedlichste Viren werden auf Ihre Eignung als Genfähren untersucht.

Das Epstein-Barr-Virus zeichnet sich durch einige besondere Eigenschaften aus. Während virale Genome häufig klein sind und die Kapazität zur Aufnahme daher beschränkt ist, besitzt EBV mit ca. 172kb ein verhältnismäßig großes Genom und dadurch die Fähigkeit, relevante therapeutische Genabschnitte zu integrieren (Delecluse, 1998, Hammerschmidt, 1989, Kempkes, 1995a, Kempkes, 1995b, Wang, 1996). Eine stabile Weitergabe des EBV-Genoms samt Transgen als episomales Plasmid an Tochterzellen ist durch die Besonderheit der latenten Infektion ohne riskante Integration in das Zellgenom möglich. Da EBV einen sehr engen Zelltropismus besitzt, ist zudem ein zielgerichteter Gentransfer mit niedrigen MOI möglich (Wendtner, 2003). Andere Vektorsysteme benötigen bis zu 1.000-fach höhere Virus-Konzentrationen.

Durch die Möglichkeit der homologen Rekombination und die Einführung des bakteriellen F-Faktors kann das Genom von EBV in *E. coli* beliebig genetisch modifiziert werden (Altmann, 2005, Brielmeier, 1996, Delecluse, 1998, Dirmeier, 2005, Dirmeier, 2003, Kilger, 1998, Messerle, 1997, Neuhierl, 2005, Zimmer-Strobl, 1996). Nach Deletion der Verpackungssignale wurde die erste EBV-basierte Verpackungszelllinie etabliert (Delecluse, 1999). Diese Verpackungszelllinie ist für eine klinische Anwendung aber zu risikobehaftet, da EBV kausal mit einer Reihe von Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht wird (Liebowitz, 1998, Niedobitek, 1999, Rickinson, 1996). Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine neue Verpackungszelllinie zu generieren, in der das Helfergenom weitere Deletionen in entscheidenden Genen trägt, welche alle sicherheitsrelevanten Aspekte für einen Therapieansatz berücksichtigen. Die daraus entstehenden rekombinanten EBV-Partikel wurden auf Infektionseffizienz und Transformationspotential und getestet.

5.1 Berücksichtigung aller sicherheitsrelevanten Aspekte bei der Konstruktion der Verpackungszelllinie 293-VII+

5.1.1 Genetische Modifizierung des Helfergenoms p2831

Da EBV Krebs verursachen kann (Liebowitz, 1998, Niedobitek, 1999, Rickinson, 1996), musste für eine klinische Anwendung das Transformationspotential der EBV-basierten Vektoren ausgeschlossen werden. Es wurde bereits mehrfach die molekulare Natur der latenten EBV-Gene beschrieben, welche in der Regel zelluläre Funktionen nachahmen (Damania, 2004, Hammerschmidt, 2004, Kieff, 2001).

Latente EBV-Gene sind von den meisten lytischen Genen, welche vermutlich nur die Virusproduktion unterstützen, funktional unabhängig. Daher lag die Vermutung nahe, dass latente EBV-Gene für die Synthese von Virionen entbehrlich sind. Die Herstellung des Helfergenoms für diese optimierte Verpackungszelllinie erfolgte über mehrere homologe Rekombinationsschritte in *E. coli*. Durch Austausch der Gensequenzen innerhalb homologer Abschnitte wurden im Helfergenom schrittweise genetische Modifikationen in die Gene von EBNA2, LMP1, EBNA3A-C, BZLF1 und TR eingeführt und diese Gene dadurch inaktiviert bzw. teilweise deletiert. Durch diese Eliminierung riskanter Gene wird die Entstehung von rekombinanten EBV-Partikeln mit immortalisierendem und lytischem Charakter selbst nach möglicher Rekombination zwischen Helfergenom und Genvektor verhindert.

In der Literatur wurden bereits EBV-Mutanten beschrieben, denen einzelne Gene wie EBNA2 (Hammerschmidt, 1989), LMP1 (Dirmeier, 2003, Kaye, 1993), EBNA3A oder EBNA3C fehlen (Kempkes, 1995b, Tomkinson, 1993). Rekombinante Partikel dieser Mutanten waren nicht in der Lage, B-Zellen zu transformieren, oder wiesen einen stark beeinträchtigten Phänotyp auf. Um Mutationen im optimierten Helfergenom quantifizieren zu können, die das Immortalisierungspotential von EBV nicht vollständig inhibieren, aber dennoch wichtige Funktionen ausüben (Brielmeier, 1996, Hammerschmidt, 1989, Kempkes, 1995a), wurde ebenso wie in das Helfergenom der ersten Verpackungszelllinie die eGFP-Expressionskassette eingefügt (Delecluse, 1998). Ein neu beschriebenes, weniger zeitaufwendiges System zur Einführung genetischer Modifikationen in virale Genvektoren nutzt den Rekombinase-vermittelten Austausch von DNA (Nakano, 2005).

Andere latente Proteine wie LMP2A oder EBNA1 bewirken eine stabile Virus-Wirts-Beziehung (Damania, 2004, Kieff, 2001). EBNA1 ist für die episomale Erhaltung des EBV-Genoms oder EBV-basierter Vektoren essenziell (Yates, 1996), wird aber ebenfalls mit EBV-assoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht (Kang, 2001, Kang, 2005, Kennedy, 2003, Wilson, 1996). Die Sicherheit der Verpackungszelllinie ließe sich durch die stabile Integration von EBNA1 in das zelluläre Genom der Verpackungszelllinie bei Deletion von EBNA1 auf dem Helfergenom weiter steigern. Ein funktionaler Austausch von EBNA1 durch ein Protein, bei dem die EBNA1-DNA-Bindedomäne an die zellulären Chromatinkomponenten gebunden ist (Hung, 2001), könnte ebenfalls fortschrittlicher sein.

Das Protein BZLF1 ist für die Aktivierung der frühen lytischen Gene als Übergang in den lytischen Zyklus essenziell, ohne diese Aktivierung ist eine Produktion von Viruspartikeln nicht möglich (Feederle, 2000, Kieff, 2001, Schepers, 1993). Die Deletion von BZLF1 auf dem Helfergenom verhindert einen Übertrag dessen auf den Genvektor. Selbst wenn es zur unkontrollierten Freisetzung BZLF⁻ EBV-Partikeln kommen sollte, sind diese auf eine einzige Infektionsrunde beschränkt (Feederle, 2000, Kieff, 2001, Schepers, 1993). Ebenso wie BZLF1 wurden im letzten Schritt die terminalen repetitiven Verpackungssignale mittels homologer Rekombination deletiert. Dadurch wurde verhindert, dass bei der Herstellung infektiöser Viren das Helfergenom selbst verpackt wird.

Bei allen gentherapeutischen Anwendungen mit viralen Vektoren birgt die Präparation der Genvektoren eine große Gefahr, da die Verunreinigung mit infektiösen und replikationskompetenten Helfervirionen zu deren unkontrollierten Verbreitung führen kann. Im Falle der EBV-basierten, optimierten Verpackungszelllinie ist jedoch das Risiko der Freisetzung von Helfervirus durch die eingeführten genetischen Modifikationen eliminiert.

5.1.2 Etablierung der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII+

Durch Immortalisierungsexperimente wurde im weiteren Verlauf eine quantitative Aussage über das Maß der Rekombination sowie die Beschaffenheit der rekombinanten EBV-Partikel getroffen. Während die in der TR²/293-Verpackungszelllinie hergestellten EBV-Partikel eine geringe Anzahl an LCLs hervorriefen, konnte wie erwartet bei den in 293-VII+ hergestellten Partikeln keine proliferierenden Zellen nachgewiesen werden.

Als eine besondere Ausnahme innerhalb der Familie der Herpesviren gilt die Eigenschaft von EBV, zwischen dem latenten und lytischen Zustand *in vitro* wechseln zu können. Diese außergewöhnliche Fähigkeit ermöglicht die Generierung einer stabilen Verpackungszelllinie, in der das EBV-Helfergenom in der latenten Phase solange ruht, bis der lytische Zyklus etwa durch transiente Transfektion von einem BZLF1-kodierendem Expressionsplasmid induziert wird. Ein weiterer Vorteil dieses Systems liegt in der Tatsache, dass das EBV-Helfergenom als Episom eine stabile Weitergabe der Information an die Tochterzelle ohne Integration in das Wirtsgenom gewährt. Dadurch wird das Risiko einer Integration ins Wirtsgenom und einer Aktivierung von Onkogenen, wie etwa bei Retroviren beschrieben, minimiert (Aiyar, 1996, Cobrinik, 1991, Vora, 1994).

Vor kurzem wurde ein weiteres System zur Herstellung rekombinanter EBV-Partikel mit höheren Effizienzen publiziert. Das EBV-Genom des Akata-Stammes aus Burkitt-Lymphom-Zellen wurde in einen BAC-Vektor (*bacterial artificial chromosome*) kloniert (Brune, 2000, Kanda, 2004, Wagner, 2002). Als Produktionszelllinie dienten sowohl EBV⁺ und EBV⁻ Akata-Zellen (Takada, 1991), welche mit den EBV-basierten Helfergenomen transfiziert wurden. Diese können durch Antikörper-vermittelte Quervernetzung membranständiger IgG-Moleküle induziert werden (Shimizu, 1996, Takada, 1984, Takada, 1989). Interessanterweise unterstützt nur die EBV⁺ Akata-Zelllinie die episodale Formation des Helfergenoms, die EBV⁻ Zelllinie jedoch nur nach Überexpression von EBNA1 (Kanda, 2004). Anders als in diesem System ist in der optimierten Verpackungszelllinie 293-VII+ eine episodale Etablierung des Helfergenoms ohne Überexpression von EBNA1 möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, eine stabile Verpackungszelllinie zu generieren, welche die Herstellung von rekombinanten EBV-Partikeln ohne Verunreinigung durch Helfervirus erlaubt. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Zelllinie den lytischen Zyklus von EBV unterstützt und reife Viruspartikel mit der genetischen Information der Genvektoren produzieren kann. Für die Verpackungszelllinie TR²/293 war bereits gezeigt worden, dass die Verpackung von Genvektoren zu infektiösen Viruspartikeln führt (Delecluse, 1999, Wendtner, 2003). Dass nun die optimierte Verpackungszelllinie trotz der sieben Deletionen in der Lage ist, ebenso effizient wie TR²/293 zu verpacken, konnte durch Infektionsexperimente mit Raji-Zellen bestätigt werden. Im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie 293-2089 lag der Titer

der produzierten Viruspartikel beider Verpackungszelllinien um ein hundertfaches niedriger. Dies kann aber bei Verwendung von humanen Wildtyp- γ -Herpesviren in der Gentherapie akzeptiert werden, da im Falle der optimierten Verpackungszelllinie die generierten Virionen keine viralen Onkogene transduzieren können.

5.2 B-Zell-spezifische Transduktion

5.2.1 Rekombinante EBV-Partikel aus der optimierten Verpackungszelllinie infizieren B-Zellen

Die häufigsten virusbasierten Gentherapien richten sich gegen Krebserkrankungen, wobei etwa ein Tumor-Suppressor-Gen wie p53 eingeführt oder eine Anti-Tumor-Immunantwort aktiviert werden kann (Edelstein, 2004, Relph, 2004). Ein EBV-basiertes Verpackungssystem eignet sich in besonderem Maße für Gentherapien von B-Zellmalignomen wie der B-CLL, da diese CD21 exprimieren und somit eine natürliche Bindungsstelle für EBV bieten. Das enge Wirtsspektrum von EBV erhöht die Sicherheit eines zielgerichteten Gentransfers. Diese Limitierung ist von Vorteil für eine Anwendung bei B-Zellen als Zielzellen, jedoch für eine breite Anwendung von Nachteil.

Mit Überständen von induzierten 293-VII+-Zellen, die als Genvektor p1933 enthielten, ließen sich alle B-Zellarten infizieren. Allerdings zeigten alle B-CLL-Zellen eine niedrigere Infektionsrate als Raji-Zellen. Dies kann durch den Behandlungsstatus des Patienten verursacht sein, scheint aber mehr noch in der Natur der B-CLL-Zellen zu liegen. Im Vergleich zur Raji-Zelllinie sind B-CLL-Zellen *in vitro* weniger vital, sie proliferieren kaum und sind deshalb schlechter infizierbar. Ein weiterer Grund könnte die schwache Expression der Vitronectin-bindenden Integrine $\alpha_v\beta_5$ and $\alpha_v\beta_3$ sein, welche für die Internalisierung von Adenoviren als notwendig beschrieben worden sind (Cantwell, 1996, Wickham, 1993). Eine Aktivierung und Induktion der Proliferation sowie eine Steigerung der Vitalität und somit höhere Expressionsraten des Fremdgens in B-CLL-Zellen kann durch Zugabe von IL-2, IL-4, CD32-Feederzellen oder durch CD40-Stimulierung mittels CD40-Antikörper erreicht werden (Crawford, 1993, Wendel-Hansen, 1994).

Die Auswertung der Infektionen erfolgte in der Regel durch Messung am Durchflusszytometer. Da sich aufgrund unterschiedlicher Messmethoden innerhalb verschiedener Arbeitsgruppen Schwankungen des Titers ergeben, ist der direkte

Vergleich zu anderen Veröffentlichungen schwierig. Im Verlauf dieser Arbeit variierte der Titer ebenfalls. Dies ist jedoch nach eigenen Beobachtungen hauptsächlich auf den Zustand der Verpackungszellen zurückzuführen. Eine Quantifizierung der im Überstand enthaltenen Partikel ist ebenso wichtig wie die Bestimmung des Titers der infektiösen oder transduzierenden Partikel, da Verunreinigungen und Variationen in der Infektionsaktivität auch die Effizienz, Toxizität und Immunogenität beeinflussen können (Kay, 2001). Eine standardisierte Methode zur Quantifizierung des Titers ist dringend notwendig, um die spezifische Aktivität eines Genvektors zu bestimmen.

Die gewonnenen Virusüberstände wurden nur teilweise aufkonzentriert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Aufkonzentrieren eine überproportionale Erhöhung des Titers erreicht. Zellpopulationen wiesen nach Inkubation mit den aufkonzentrierten Überständen generell eine stärkere Intensität im Durchflusszytometer auf. Die p0588-basierten Plasmide p1933, p3304 und p3460 zeigten fünf- bis zehnfache höhere Transduktionseffizienzen als die „kleineren“ p1913-basierten. Während diese ein etwa 10-12kb kleines Genom besitzen, ist das der p0588-basierten Plasmide etwa 18kb groß. Neben *oriP* tragen die „großen“ Genvektoren den lytischen Replikationsursprung von B95-8 und das Gen der Hygromycintransferase. Da auch das p0588-basierte Plasmid p3460 mit *supF* als Selektionsmarker entsprechend hohe Effizienzen aufweist, müssen die Einbußen aus der „kleineren“ Genomgröße oder dem *oriLyt* des M-ABA-Stammes entstehen. Obwohl speziell nach Infektion mit Überständen, die aus p2924 hergestellt wurden, ein Antikörpertest und eine Antikörperfixierung durchgeführt wurden, erwies sich die Detektierung von hCD40L bzw. die Reproduzierbarkeit als extrem schwierig. Infektionen konnten nur mit aufkonzentrierten Überständen nachgewiesen werden. Mit Überständen aus dem „großen“ Genvektor p3304 konnte dagegen hCD40L im Durchflusszytometer analysiert werden.

In der Literatur wurde ein retrovirales System beschrieben, bei dem die Transduktionseffizienz von pantropischen Partikeln durch das Konzentrationsverhältnis zwischen Genvektor und dem Expressionsplasmid der Hüllproteine kontrolliert wird, welches in diesem System transient kotransfiziert wird (Chen, 2005). Es wäre zu überlegen, ob in diesem EBV-basierten System die Produktion von rekombinanten Viren durch Optimierung der Konzentrationsverhältnisse zwischen Genvektor und Expression von Hüllproteinen, etwa durch Überexpression von gp350/220 oder gp85, gesteigert werden kann (Haddad, 1989, Miller, 1988, Molesworth, 2000, Oda, 2000).

Um eine Erhöhung der Immunogenität infizierter B-CLL-Zellen zu detektieren, wurde in einem IFN- γ -ELISA die Aktivierung von T-Zellen durch hCD40L-Stimulierung analysiert. Zur erhöhten IFN- γ -Sezernierung reichten bereits B-CLL-Zellen, die mit nur induzierten Überständen der Verpackungszelllinie 293-VII+ inkubiert worden sind. Alle Proben, die eine Steigerung darüber hinaus zeigten, wurden mit verpackbarem hCD40L-Plasmid-Überständen inkubiert. Allerdings scheint der CD40L sowohl bei der Entwicklung als auch bei der Beständigkeit einer persistierenden EBV-Infektion eine Rolle zu spielen (Imadome, 2003). Nach Infektion aktiviert EBV die Induktion einer hCD40L-Expression und somit die Interaktion zwischen CD40L und CD40. Für eine antiapoptotische Wirkung von EBV und die B-Zell-Transformation ist neben der CD40L-CD40-Interaktion LMP1 notwendig. Somit scheint die EBV-induzierte CD40L-CD40-Interaktion zusammen mit LMP1 für das Überleben der Wirtszelle, für die B-Zell-Transformation sowie die B-Zell-Aktivierung verantwortlich zu sein (Busch, 1999).

5.2.2 Exosomen übertragen Fremdproteine auf B-Zellen

Im abschließenden Kapitel wurde das Phänomen des nicht-viralen Protein-Übertrages untersucht, welches vermutlich durch Exosomen verursacht wird. Dabei wurden die Eigenschaften der Exosomen sowie die Immunogenität eines Fremdproteins analysiert, welches durch diese auf B-Zellen übertragen worden ist.

Die schwach eGFP⁺ Erscheinung der Negativkontrollen bei Transduktionsversuchen trat immer dann auf, wenn diese durch Induktion des lytischen Zykluses ohne weiteren verpackbaren Genvektor in der Verpackungszelllinie hergestellt wurde. Die deutlich schwächere Fluoreszenz-Intensität im Vergleich zu Überständen, die nach Transfektion eines verpackbaren Genvektors entstanden sind, deutete ebenfalls auf einen Proteintransport des translatierten eGFPs hin. Da der eGFP-Übertrag weder durch Zentrifugation noch Filtration der Überstände eliminiert werden konnte, scheinen die ursächlichen Überträger-Partikel sehr klein, unter 100nm, zu sein. Darüber hinaus konnte diese Art von eGFP-Übertrag nur bei B-Zellen nachgewiesen werden. Diese EBV-ähnlichen Infektionseigenschaften wären ein Hinweis auf die Existenz von spezifischen viralen Proteinen, etwa das Hüllprotein gp350/220, in der Membran der „Transport-Partikel“, die für einen B-Zelltropismus sorgen. Diese sogenannten Exosomen entstehen während der Exozytose und werden aus dem Lumen von multivesikulären Körperchen freigesetzt. Exosomen übertragen Proteine auf Zellen durch Binden an der Zelloberfläche, Fusion mit der Plasmamembran oder Endozytose.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass Exosomen den Austritt viraler Partikel aus der Wirtsmembran unterstützen (Flanagan, 2003, Gould, 2003, Masciopinto, 2004, Nguyen, 2003, Vazirabadi, 2003). Daher lag die Vermutung nahe, dass die Verpackungszelllinie 293-VII⁺ nach Induktion des lytischen Zyklus Exosomen produziert, welche eGFP-Protein, das vom Helfergenom kodiert wird aus dem Zytoplasma umschließen. *In vitro*- und *in vivo*-Studien zeigen eine Mitwirkung der Exosomen an nicht-zellulärer Kommunikation, welcher zum Transfer von Molekülen zwischen Zellen führt (Février, 2004). Die Analyse der eGFP⁺ Raji-Zellen im Konfokalen Lasermikroskop nach Inkubation mit der Negativkontrolle zeigt eine Anlagerung der Exosomen, aber keine Internalisierung. Darüber hinaus wurde deutlich, dass diese Anlagerung bei gleichzeitiger EBV-Infektion derselben Zielzelle stattfinden kann, aber nicht muss.

Es wurde beschrieben, dass Verpackungszellen mit TR⁻ EBV-Genom nach Induktion des lytischen Zykluses viele leere Viruspartikel und sehr selten defekte infektiöse Viren produzieren, die das lytisch replizierte, TR⁻ EBV-Genom enthalten (Feederle, 2005). Aufgrund homologer Rekombination könnten lytisch replizierte Konkatermer-Stücke, die mehr als ein einzelnes Genom tragen und ohne vorherige Trennung inkorporiert wurden, in eine virale Einheit mit intakten EBV-Genom zurückverwandelt worden sein.

Mittels IFN- γ -ELISA konnte eine Aktivierung der autologen polyklonalen CMV-spezifischen T-Zelllinie f46P und somit der Übertrag des Fremdproteins pp65 durch Exosomen auf B-Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurde die Verpackungszelllinie 293-VII⁺ mit dem nicht-verpackbaren Expressionsplasmid für pp65, sowie den Expressionsplasmiden für BALF4 und für BZLF1 transfiziert. Bereits der Überstand aus pp65 und BALF4 nach Infektion der mini-LCLs THV1 aktiviert T-Zellen zur IFN- γ -Produktion, zusätzliches BZLF1 resultiert in einer weiteren Steigerung der Immunogenität. Anders als bisher vermutet, ist die Induktion des lytischen Zyklusses in diesem Fall nicht zwingend erforderlich.

Im Anschluss daran wurden EBV⁻ 293HEK-Zellen mit dem Expressionsplasmid für pp65 und zusätzlich mit dem Expressionsplasmid für gp350/220 transfiziert. Durch IFN- γ -Produktion konnte wiederum der pp65-Übertrag von den mini-LCLs THV1 auf die T-Zelllinie f46P nachgewiesen werden. Interessanterweise produziert auch die EBV⁻ Zelllinie 293HEK Exosomen, die pp65 auf B-Zellen übertragen können. Des Weiteren wurde ein Anstieg der IFN- γ -Produktion bei Kotransfektion des Expressionsplasmid für gp350/220 deutlich. Ein Übertrag der Exosomen auf B-Zellen kann also durch die

Interaktion des überexprimierten EBV-Glykoproteins gp350/220 mit CD21 noch verstärkt werden.

Auch aus Tumorzellen konnten *in vivo* und *in vitro* Exosomen isoliert werden, welche Tumorantigene sowie MHC-I-Antigen exprimieren (Andre, 2002, Wolfers, 2001). Diese sind einerseits in der Lage, kostimulatorische Moleküle zur T-Zell-Aktivierung zu unterdrücken und führen somit zur Inhibierung der Immunzellen und zur Tollerierung des Tumors durch das Immunsystem (Kim, 2004, Taylor, 2003, Whiteside, 2005). Andererseits kann eine Präsentation der Tumor-spezifischen Antigene aber auch zu einer Aktivierung von T-Zellen führen (Thery, 2002a, Wolfers, 2001).

Dieser Übertrag durch Exosomen könnte zur Entwicklung eines DNA-freien Impfstoffes, etwa zur spezifischen Induktion von EBV-spezifischen Immunantworten, führen. Ein idealer Impfstoff sollte stabil, auf molekularer Ebene definiert sein und eine effiziente Immunantwort hervorrufen. Leere virale Partikel wurden bereits für die Vakzinierung gegen einige Viren, etwa Hepatitis B und Papillomavirus verwendet (Greenstone, 1998, Mandic, 2004). Für eine potentielle Anwendung der EBV-Vakzine muss die Immunogenität und Sicherheit dieser leeren Partikel noch besser erforscht werden. Ein prophylaktischer Impfstoff aus Exosomen gegen Krebs (Chaput, 2004b), auch in Verbindung mit dem CpG-Oligonukleotid als Adjuvans (Chaput, 2004a), ist bereits in einem Mausmodell untersucht worden (Altieri, 2004). Dabei haben Exosomen Tumor-spezifische Immunität induziert und die Tumorentstehung verhindert. Eine Anwendung von Exosomen in der Immuntherapie gegen Krebs scheint vielversprechend zu sein. Erste Immuntherapie-Studien an Patienten mit Hautkrebs bzw. Lungenkrebs zeigten bereits vielversprechende spezifische Immunantwort, eine GMP-gerechte Herstellung der Exosomen war in beiden Fällen gewährleistet (Escudier, 2005, Morse, 2005).

5.3 Ausblick

Im Bereich Gentherapie als modernes Therapeutikum wird seit etwa 20 Jahren geforscht. Große Hoffnung ruhte auf dem schnellen Erfolg, die Entwicklung allerdings ist von Rückschlägen gezeichnet und langsamer als erwartet. Denn obwohl von vielen viralen wie nicht-viralen Vektoren eine hohe Genübertragungsrate gezeigt worden ist, erwies sich deren Transduktionsrate *in vivo* als äußerst moderat. Während virale Vektoren höhere Transduktionsraten als nicht-virale haben, ist deren labortechnische Herstellung weitaus aufwendiger und bergen eine höhere Gefahr einer Immunreaktion (Thomas, 2003).

Schwierig gestaltet sich auch die Regulation der Expressionshöhe und -dauer eines therapeutischen Gens in den Zielzellen. Darüber hinaus ist der Sicherheitsaspekt zu beachten. Vektoren müssen replikationsgeschwächt sein und die Gefahr der homologen Rekombination bestmöglich reduziert sein. Etwaige Genom-Integration sollte möglichst gezielt stattfinden und mögliche zytotoxische Reaktionen oder eine Überreaktion des Immunsystems vermieden werden.

Eine Alternative zu Gentherapien wäre eine präventive Maßnahme, etwa gegen virusassoziierte Formen von Krebs. Viele virale Vektoren, die für Gentherapien verwendet werden, induzieren eine Immunantwort gegen virale Antigene. Da in EBV-assoziierten Lymphomen praktisch alle Zellen das EBV-Genom tragen und latente Gene exprimieren, wohingegen nur wenige normale Zellen latent infiziert sind, wird an dem Einsatz von zielgerichteten Therapeutika gegen EBV zur spezifischen Eliminierung dieser Krebszellen geforscht (Israel, 2003).

Der hier beschriebene Gentherapie-Ansatz mit Verabreichung von EBV-basierten Genvektoren ist für Patienten, die bereits mit Wildtyp-EBV infiziert sind, eine vergleichsweise sichere Anwendung. Diese Einschränkung gilt nicht nur bei EBV, ist aber bei den meisten anderen viralen Vektoren umstritten. Eventuell könnte die hCD40L-Aktivität durch Koexpression von Zytokinen wie IL-2 noch gesteigert werden. Auch die Verwendung von synthetischen Metalloproteinase-Inhibitoren könnten die Interaktion von CD40 und CD40L steigern (Contin, 2003). Bevor EBV-basierte Vektorsysteme für die klinische Anwendung eingesetzt werden, muss eine umfassende Auswertung der Risiken erstellt werden. Dennoch scheint EBV auf dem Gebiet der Gentherapie gegen B-Zell-Lymphome ein vielversprechendes System zu sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bekämpfung von genetisch bedingten Krankheiten werden oft Medikamente eingesetzt, die nur die Symptome bekämpfen, ohne aber die Ursache des Leidens zu eliminieren. Mit Hilfe der Gentherapie, so die Hoffnung, soll der Krankheitsverursachende Gendefekt durch therapeutische Fremdgene geheilt werden. In dieser Arbeit wurde eine auf EBV basierte Verpackungszelllinie zur Herstellung von Genvektoren etabliert, welche unter Berücksichtigung aller derzeit bekannten Sicherheitsrisiken für eine Gentherapie optimiert wurde. Eine mögliche Anwendung für dieses EBV-basierte Gentransfersystem ist die Stimulierung von B-CLL-Zellen durch Expression des humanen CD40-Liganden. Dadurch sollen die Leukämiezellen einer Erkennung durch spezifische T-Zellen zugänglich gemacht werden.

Für die Verwendung eines EBV-Genvektorsystems spricht unter anderem die hohe Effizienz der spezifischen Transduktion humaner B-Zellen, die große Fremdkapazität und die Fähigkeit zur latenten Infektion und daher langandauernden Genexpression. Zudem repliziert EBV episomal, modifiziert also nicht das Zellgenom. Allerdings ist EBV ein potentiell Tumorvirus. Daher wurden alle fünf bekannten Onkogene sowie der Transaktivator BZLF1 aus dem Helfergenom entfernt. Durch Deletion der Verpackungssignale wurde das Helfergenom so modifiziert, daß es nicht selbst in Virionen verpackt und freigesetzt werden kann. Die Verpackungseffizienz der Helferezelllinie konnte durch FACS-Sortierung verbessert werden. Das EBV-Helfergenom wurde aus dieser Zelllinie 293-VII+ reisoliert und seine Integrität durch PCR und Restriktionslängenvergleich bestätigt. Selbst bei provozierter Rekombination wurden von der Verpackungszelllinie 293-VII+ keine Virionen freigesetzt, die B-Zellen transformieren können.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Etablierung des therapeutischen hCD40L-tragenden Genvektors p2924 mit möglichst geringer Homologie zum Helfervirusgenom (TR und *oriLyt* als einzigen EBV-Sequenzen) und Verzicht auf Antibiotika-Selektionsmarker (stattdessen das *nonsense suppressor*-Transfer-RNA-Gen *supF*). Der bereits etablierte eGFP-tragende Genvektor p1933, welcher um etwa 6kb größer war und zusätzlich *oriP* trug, zeigte aber bessere Transfektionseigenschaften als p2924. Aus diesem Grund wurde unter anderem ein weiteres Genvektorplasmid konstruiert, bei welchem eGFP von p1933 durch hCD40L ersetzt wurde. Die Infektion

bzw. Detektion von hCD40L auf B-CLL-Zellen war nur mit aufkonzentrierten Virusüberständen reproduzierbar, die mit diesem Plasmid hergestellt wurden. Allerdings trägt dieser Genvektor *Amp* als Selektionsmarker. Daher wurde zuletzt exemplarisch in dem eGFP-tragenden „großen“ Plasmid *Amp* durch *supF* ersetzt.

Bislang wurden zur Propagierung von *supF*-Plasmiden Bakterienstämme verwendet, die die amber-Mutationen auf einem extrachromosomalen Plasmid enthielten. Um die einfache Gewinnung reiner Plasmidpräparationen zu ermöglichen, wurde auf der Basis von DH10B ein neuer Bakterienstamm mit chromosomaler amber-Mutation etabliert. Es wurde gezeigt, daß dieser Stamm sich zur antibiotikafreien Selektion und Produktion von *supF*-tragenden Plasmiden eignet.

Somit stellt 293-VII+ eine optimierte Verpackungszelllinie dar, mit der EBV-basierte Genvektoren effizient hergestellt werden können, die sowohl etablierte B-Zelllinien als auch primäre B-Zellen transduzieren. Die erreichbaren Titer waren mit denen vergleichbar, die von der Verpackungszelllinie der ersten Generation (TR2/293) produziert wurden. Die Produktion von Interferon- γ durch T-Zellen war erhöht, wenn sie mit B-CLL-Zellen stimuliert wurden, die zuvor mit Überständen aus verpackbaren, hCD40L-tragenden Vektoren nach Induktion des lytischen Zyklus transduziert wurden. Dieses Ergebnis lässt auf Aktivierung des Immunsystems *in vivo* hoffen.

Ein völlig neuer Aspekt, der im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beobachtet werden konnte, war der Übertrag von eGFP-Protein aus der Verpackungszelllinie in Rezipientenzellen. Alle Beobachtungen lassen auf einen spezifischen Transfer des fluoreszierenden Proteins aus dem Zytoplasma der Verpackungszelle auf die Oberfläche der B-Zellen durch Exosomen schließen. Experimente mit dem Modellantigen pp65 zeigten, dass auch dieses Protein direkt übertragen werden konnte und dadurch die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen induzierte. In ähnlicher Weise konnten auch in einem reduzierten System die parentalen 293HEK-Zellen nach Transfektion mit Plasmiden für das EBV-Glykoprotein gp350/220 und das Antigen pp65 Überstände produzieren, die zu einer spezifischen Stimulation von T-Zellen führten. Diese Ergebnisse legen die zukünftige Entwicklung eines an EBV angelehnten Antigentransfersystems nahe, durch das mit Hilfe von B-Zellen als Stimulatoren eine spezifische T-Zellaktivierung erreicht werden kann.

7 ABKÜRZUNGEN

-	negativ
+	positiv
α -	anti
Abb.	Abbildung
<i>Amp</i>	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen (<i>antigene presenting cells</i>)
B-CLL	Chronisch-Lymphatische Leukämie der B-Zellen
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of determination</i>)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
<i>Cm</i>	Chloramphenicol
CMV	Cytomegalovirus
CR	Komplementrezeptor (<i>complementary receptor</i>)
Cy3	Indocarbocyanin
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dpm	radioaktive Zerfälle (<i>disintegrations</i>) pro Minute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA	EBV-nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verstärkt grün fluoreszierende Protein (<i>enhanced green fluorescence protein</i>)
etc.	<i>et cetera</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HEK	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
<i>Hyg</i>	Hygromycin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
<i>Kan</i>	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani

LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP	latentes Membranprotein
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MHC	Hauptkompartibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
n. d.	nicht ermittelt (<i>not determined</i>)
OD	Optische Dichte
<i>oriLyt</i>	lytischer Replikationsursprung
<i>oriP</i>	plasmidaler Replikationsursprung
pBLs	primäre B-Lymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pp	Phosphoprotein
r	resistent
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle

<i>Tet</i>	Tetracyclin
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TR	terminale repetitive Verpackungssignale (<i>terminal repeats</i>)
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
VCA	virales Hüllantigen (<i>viral capsid antigen</i>)
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

8 LITERATURVERZEICHNIS

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

Aiyar, A, Hindmarsh, P, Skalka, AM and Leis, J (1996) Concerted integration of linear retroviral DNA by the avian sarcoma virus integrase in vitro: dependence on both long terminal repeat termini. *Journal of Virology*, **70**, 3571-3580.

Altieri, SL, Khan, AN and Tomasi, TB (2004) Exosomes from plasmacytoma cells as a tumor vaccine. *Journal of Immunotherapy*, **27**, 282-288.

Altmann, M and Hammerschmidt, W (2005) Epstein-Barr virus provides a new paradigm for viral inhibition of apoptosis and cellular transformation. *PLoS Biology*, **3**, Epub.

Andre, P, Prasad, KS, Denis, CV, He, M, Papalia, JM, Hynes, RO, Phillips, DR and Wagner, DD (2002) CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nature Medicine*, **8**, 247-252.

Armitage, RJ, Fanslow, WC, Strockbine, L, Sato, TA, Clifford, KN, Macduff, BM, Anderson, DM, Gimpel, SD, Davis-Smith, T, Maliszewski, CR, Clark, EA, Smith, CA, Grabstein, KH, Cosman, D and Spriggs, MK (1992) Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, **357**, 80-82.

Arpin, C, Dechanet, J, Van Kooten, C, Merville, P, Grouard, G, Briere, F, Banchereau, J and Liu, YJ (1995) Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science*, **268**, 720-722.

Ayanlar-Batuman, O, Ebert, E and Hauptman, SP (1986) Defective interleukin-2 production and responsiveness by T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia of B cell variety. *Blood*, **67**, 279-284.

Baer, R, Bankier, AT, Biggin, MD, Deininger, PL, Farrell, PJ, Gibson, TJ, Hatfull, G, Hudson, GS, Satchwell, SC, Seguin, C, Tufnell, PS and Barell, BG (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, **310**, 207-211.

Balague, C, Zhou, J, Dai, Y, Alemany, R, Josephs, SF, Andreason, G, Hariharan, M, Sethi, E, Prokopenko, E, Jan, HY, Lou, YC, Hubert-Leslie, D, Ruiz, L and Zhang, WW (2000) Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood*, **95**, 820-828.

Banchereau, J, Bazan, F, Blanchard, D, Brière, F, Galizzi, JP, van Kooten, C, Liu, YJ, Rousset, F and Saeland, S (1994) The CD40 antigen and its ligand. *Annual Review of Immunology*, **12**, 881-922.

Banchereau, J, de Paoli, P, Valle, A, Garcia, E and Rousset, F (1991a) Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science*, **251**, 70-72.

Banchereau, J and Rousset, F (1991b) Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature*, **353**, 678-679.

- Banerjee, S, Livanos, E and Vos, JM (1995) Therapeutic gene delivery in human B-lymphoblastoid cells by engineered non-transforming infectious Epstein-Barr virus. *Nature Medicine*, **1**, 1303-1308.
- Baskar, S, Glimcher, L, Nabavi, N, Jones, RT and Ostrand-Rosenberg, S (1995) Major histocompatibility complex class II+ B7-1+ tumor cells are potent vaccines for stimulating tumor rejection in tumor-bearing mice. *The Journal of Experimental Medicine*, **181**, 619-629.
- Benihoud, K, Yeh, P and Perricaudet, M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, **10**, 440-447.
- Bhende, PM, Seaman, WT, Delecluse, H-J and Kenney, SC (2004) The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nature Genetics*, **36**, 1099-1104.
- Biagi, E, Yvon, E, Dotti, G, Amrolia, PJ, Takahashi, S, Popat, U, Marini, F, Andreeff, M, Brenner, MK and Rousseau, RF (2003) Bystander Transfer of Functional Human CD40 Ligand from Gene-Modified Fibroblasts to B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Human Gene Therapy*, **14**, 545-559.
- Binet, J-L, Auquier, A, Dighiero, G, Chastang, C, Piguët, H, Goasguen, J, Vaugier, G, Potron, G, Colona, P, Oberling, F, Thomas, M, Tchernia, G, Jacquillat, C, Boivin, P, Lesty, C, Duault, MT, Monconduit, M, Belabbès, S and Gremy, F (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, **48**, 198-206.
- Birnboim, HC and Doly, J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513-1523.
- Bonamino, M, Serafini, M, D'Amico, G, Gaipa, G, Todisco, E, Bernasconi, S, Golay, J, Biondi, A and Introna, M (2004) Functional transfer of CD40L gene in human B-cell precursor ALL blasts by second-generation SIN lentivectors. *Gene Therapy*, **11**, 85-93.
- Bornkamm, GW, Delius, H, Zimmer, U, Hudewentz, J and Epstein, MA (1980) Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. *Journal of Virology*, **35**, 603-618.
- Brielmeier, M, Mautner, J, Laux, G and Hammerschmidt, W (1996) Latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B-cell immortalization. *The Journal of General Virology*, **77**, 2807-2818.
- Brune, W, Messerle, M and Koszinowski, UH (2000) Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends In Genetics*, **16**, 254-259.
- Buhmann, R, Nolte, A, Westhaus, D, Emmerich, B and Hallek, M (1999) CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood*, **93**, 1992-2002.
- Busch, LK and Bishop, GA (1999) The EBV Transforming Protein, Latent Membrane Protein 1, Mimics and Cooperates with CD40 Signaling in B Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, **162**, 2555-2561.
- Buschle, M, Brenner, MK, Chen, IS, Drexler, HG, Gignac, SM and Rooney, CM (1990) Transfection and gene expression in normal and malignant primary B lymphocytes. *Journal Of Immunological Methods*, **133**, 77-85.

- Caligaris-Cappio, F (1999) New insights into the biology of B-chronic lymphocytic leukemia. In: *American Society of Hematology Education Program Book, Hematology*, pp. 249-254.
- Calos, MP (1996) The potential of extrachromosomal replicating vectors for gene therapy. *Trends In Genetics*, **12**, 463-466.
- Cantwell, M, Hua, T, Pappas, J and Kipps, TJ (1997) Acquired CD-40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Medicine*, **3**, 984-989.
- Cantwell, MJ, Sharma, S, Friedmann, T and Kipps, TJ (1996) Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, **88**, 4676-4683.
- Cantwell, MJ, Wierda, WG, Lossos, IS, Levy, R and Kipps, TJ (2001) T cell activation following infection of primary follicle center lymphoma B cells with adenovirus encoding CD154. *Leukemia*, **15**, 1451-1457.
- Carbone, E, Ruggiero, G, Terrazzano, G, Palomba, C, Manzo, C, Fontana, S, Spits, H, Karre, K and Zappacosta, S (1997) A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *The Journal of Experimental Medicine*, **185**, 2053-2060.
- Catalucci, D, Sporeno, E, Cirillo, A, Ciliberto, G, Nicosia, A and Colloca, S (2005) An Adenovirus Type 5 (Ad5) Amplicon-Based Packaging Cell Line for Production of High-Capacity Helper-Independent {Delta}E1-E2-E3-E4 Ad5 Vectors. *Journal of Virology*, **79**, 6400-6409.
- Cavazzana-Calvo, M, Hacein-Bey, S, de Saint Basile, G, Gross, F, Yvon, E, Nusbaum, P, Selz, F, Hue, C, Certain, S, Casanova, JL, Bousso, P, Deist, FL and Fischer, A (2000) Gene therapy of human severe combined immune deficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, **288**, 669-672.
- Chaput, N, Scharz, NEC, André, F, Taieb, J, Novault, S, Bonnaventure, P, Aubert, N, Bernard, J, Lemonnier, F, Merad, M, Adema, G, Adams, M, Ferrantini, M, Carpentier, AF, Escudier, B, Tursz, T, Angevin, E and Zitvogel, L (2004a) Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. II. Exosomes in CpG Adjuvants Efficiently Prime Naive Tc1 Lymphocytes Leading to Tumor Rejection. *The Journal of Immunology*, **172**, 2137-2146.
- Chaput, N, Taieb, J, Scharz, NEC, André, F, Angevin, E and Zitvogel, L (2004b) Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **53**, 234-239.
- Check, E (2002) Gene therapy: a tragic setback. *Nature*, **420**, 116-118.
- Chen, L, Ashe, S, Brady, WA, Hellström, I, Hellström, KE, Ledbetter, JA, McGowan, P and Linsley, PS (1992) Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, **71**, 1093-1102.
- Chen, Y, Miller, WM and Aiyar, A (2005) Transduction efficiency of pantropic retroviral vectors is controlled by the envelope plasmid to vector plasmid ratio. *Biotechnology Progress*, **21**, 274-282.
- Cheng, L, Ziegelhoffer, PR and Yang, NS (1993) In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **90**, 4455-4459.

- Christ, M, Louis, B, Stoeckel, F, Dieterle, A, Grave, L, Dreyer, D, Kintz, J, Ali Hadji, D, Lusky, M and Mehtali, M (2000) Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Human Gene Therapy*, **11**, 415-427.
- Chu, P, Deforce, D, Pedersen, IM, Kim, Y, Kitada, S, Reed, JC and Kipps, TJ (2002) Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **99**, 3854-3859.
- Chuang, SE, Chen, AL and Chao, CC (1995) Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Research*, **23**, 1641.
- Church, GM and Gilbert, W (1984) Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **81**, 1991-1995.
- Clark, EA and Ledbetter, JA (1994) How B and T cells talk to each other. *Nature*, **367**, 425-428.
- Cobrinik, D, Aiyar, A, Ge, Z, Huang, H and Leis, J (1991) Overlapping retroviral U5 sequence elements are required for efficient integration and initiation of reverse transcription. *Journal of Virology*, **65**, 3864-3872.
- Cohen, J, Charpilienne, A, Chilmonczyk, S and Estes, MK (1989a) Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology*, **171**, 131-140.
- Cohen, JI, Wang, F, Mannick, J and Kieff, E (1989b) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **86**, 9558-9562.
- Contin, C, Pitard, V, Itai, T, Nagata, S, Moreau, J-F and Déchanet-Merville, J (2003) Membrane-anchored CD40 Is Processed by the Tumor Necrosis Factor-alpha-converting Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 32801-32809.
- Countryman, J and Miller, G (1985) Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **82**, 4085-4089.
- Crawford, DH and Catovsky, D (1993) In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40. *Immunology*, **80**, 40-44.
- Damania, B (2004) Oncogenic gamma-herpesviruses: comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 656-668.
- Damle, RN, Wasil, T, Fais, F, Ghiotto, F, Valetto, A, Allen, SL, Buchbinder, A, Budman, D, Dittmar, K, Kolitz, J, Lichtman, SM, Schulman, P, Vinciguerra, VP, Rai, KR, Ferrarini, M and Chiorazzi, N (1999) IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 1840-1847.
- Davenport, MG and Pagano, JS (1999) Expression of EBNA-1 mRNA is regulated by cell cycle during Epstein- Barr virus type I latency. *Journal of Virology*, **73**, 3154-3161.

- Dazzi, F, D'Andrea, E, Biasi, E, De Silvestro, G, Gaidano, G, Schena, M, Tison, T, Vianello, F, Girolami, A and Caligaris-Cappio, F (1995) Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **75**, 26-32.
- Decker, T, Schneller, F, Kronschnable, M, Dechow, T, Lipford, GB, Wagner, H and Peschel, C (2000a) Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Experimental Hematology*, **28**, 558–568.
- Decker, T, Schneller, F, Sparwasser, T, Tretter, T, Lipford, GB, Wagner, H and Peschel, C (2000b) Immunostimulatory CpG oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, **95**, 999–1006.
- Delecluse, HJ, Hilsendegen, T, Pich, D, Zeidler, R and Hammerschmidt, W (1998) Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **95**, 8245-8250.
- Delecluse, HJ, Pich, D, Hilsendegen, T, Baum, C and Hammerschmidt, W (1999) A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **96**, 5188-5193.
- Diehl, LF, Karnell, LH and Menck, HR (1999) The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, **86**, 2684-2692.
- Dighiero, G, Maloum, K, Desablens, B, Cazin, B, Navarro, M, Leblay, R, Leporrier, M, Jaubert, J, Lepeu, G, Dreyfus, B, Binet, JL and Travade, P (1998) Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. The French Cooperation Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **338**, 1506-1514.
- Dighiero, G, Travade, P, Chevret, S, Fenaux, P, Chastang, C and Binet, J-L (1991) B-cell chronic lymphocytic leukemia: Present status and future directions. *Blood*, **78**, 1901-1914.
- Dirmeier, U, Hoffmann, R, Kilger, E, Schultheiss, U, Briseno, C, Gires, O, Kieser, A, Eick, D, Sugden, B and Hammerschmidt, W (2005) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene*, **24**, 1711-1717.
- Dirmeier, U, Neuhierl, B, Kilger, E, Reisbach, G, Sandberg, ML and Hammerschmidt, W (2003) Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Research*, **63**, 2982-2989.
- Edelstein, ML, Abedi, MR, Wixon, J and Edelstein, RM (2004) Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 - an overview. *The Journal of Gene Medicine*, **6**, 597-602.
- Epstein, MA, Achong, BG and Barr, YM (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, **15**, 702-703.

- Escudier, B, Dorval, T, Chaput, N, André, F, Caby, M-P, Novault, S, Flament, C, Leboulaire, C, Borg, C, Amigorena, S, Boccaccio, C, Bonnerot, C, Dhellin, O, Movassagh, M, Piperno, S, Robert, C, Serra, V, Valente, N, Le Pecq, J-B, Spatz, A, Lantz, O, Tursz, T, Angevin, E and Zitvogel, L (2005) Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of Translational Medicine*, **3**, 1-13.
- Espel, E, Fromental, C, Reichenbach, P and Nabholz, M (1990) Activity and interleukin 1 responsiveness of SV40 enhancer motifs in a rodent immature T cell line. *The EBMO Journal*, **9**, 929-937.
- Fais, F, Ghiotto, F, S., H, Sellars, B, Valetto, A, Allen, SL, Schulman, P, Vinciguerra, VP, Rai, K, Rassenti, LZ, Kipps, TJ, Dighiero, G, Schroeder, HWJ, Ferrarini, M and Chiorazzi, N (1998) Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, **102**, 1515-1525.
- Fanslow, WC, Clifford, KN, Seaman, M, Alderson, MR, Spriggs, MK, Armitage, RJ and Ramsdell, F (1994) Recombinant CD40 Ligand Exerts Potent Biologic Effects on T Cells. *Journal Of Immunology*, **152**, 4262-4269.
- Faulkner, GC, Krajewski, AS and Crawford, DH (2000) The ins and outs of EBV infection. *Trends in Microbiology*, **8**, 185-189.
- Feederle, R, Kost, M, Baumann, M, Janz, A, Drouet, E, Hammerschmidt, W and Delecluse, HJ (2000) The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *The EBMO Journal*, **19**, 3080-3089.
- Feederle, R, Shannon-Lowe, C, Baldwin, G and Delecluse, HJ (2005) Defective Infectious Particles and Rare Packaged Genomes Produced by Cells Carrying Terminal-Repeat-Negative Epstein-Barr Virus. *Journal of Virology*, **79**, 7641-7647.
- Fernandez, LA, MacSween, JM and Langley, GR (1977) T cell function in untreated B cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, **39**, 1168-1174.
- Flanagan, J, Middeldorp, J and Sculley, T (2003) Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *The Journal of General Virology*, **84**, 1871-1879.
- Foerster, J (1993) Wintrobe's Clinical Hematology. Lea & Febiger: Philadelphia, London.
- Freedman, AS (1990) Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **4**, 405-429.
- Freedman, AS, Boyd, AW, Bieber, FR, Daley, J, Rosen, K, Horowitz, JC, Levy, DN and Nadler, LM (1987) Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **70**, 418-427.
- Freese, UK, Laux, G, Hudewentz, J, Schwarz, E and Bornkamm, GW (1983) Two Distant Clusters of Partially Homologous Small Repeats of Epstein-Barr Virus Are Transcribed upon Induction of an Abortive or Lytic Cycle of the Virus. *Journal of Virology*, **48**, 731-743.
- Frisan, T, Levitsky, V and Massucci, M (2001) Generation of lymphoblastoid cell lines (LCLs). *Methods in Molecular Biology*, **174**, 125-127.

Février, B and Raposo, G (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 415-421.

Garrone, P, Neidhardt, EM, Garcia, E, Galibert, L, van Kooten, C and Banchereau, J (1995) Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, **182**, 1265-1273.

Gerber, P, Lucas, S, Nonoyama, M, Perlin, E and Goldstein, LI (1972) Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet*, **2**, 988-989.

Ghazal, P, Lubon, H, Reynolds-Kohler, C, Henninghausen, L and Nelson, JA (1990) Interactions between cellular regulatory proteins and a unique sequence region in the human cytomegalovirus major immediateearly promoter. *Virology*, **174**, 18-25.

Gong, M and Kieff, E (1990) Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110. *Journal of Virology*, **64**, 1507-1516.

Gorziglia, MI, Lapcevich, C, Roy, S, Kang, Q, Kadan, M, Wu, V, Pechan, P and Kaleko, M (1999) Generation of an adenovirus vector lacking E1, E2A, E3, and all of E4 except open reading frame 3. *Journal of Virology*, **73**, 6048-6055.

Gould, SJ, Booth, AM and Hildreth, JEK (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **100**, 10592-10597.

Graham, FL, Smiley, J, Russell, WC and Nairn, R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, **36**, 59-74.

Greenstone, HL, Nieland, JD, de Visser, KE, De Bruijn, ML, Kirnbauer, R, Roden, RB, Lowy, DR, Kast, WM and Schiller, JT (1998) Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **95**, 1800-1805.

Gresch, O, Engel, FB, Nestic, D, Tran, TT, England, HM, Hickman, ES, Korner, I, Gan, L, Chen, S and Castro-Obregon, S (2004) New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*, **33**, 151-163.

Griffin, BE, Björck, E, Bjursell, G and Lindahl, T (1981) Sequence complexity of circular Epstein-Barr virus DNA in transformed cells. *Journal of Virology*, **40**, 11-19.

Gruffat, H, Batisse, J, Pich, D, Neuhierl, B, Manet, E, Hammerschmidt, W and Sergeant, A (2002) Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *Journal of Virology*, **76**, 9635-9644.

Guipaud, O, Deriano, L, Salin, H, Vallat, L, Sabatier, L, Merle-Béral, H and Delic, J (2003) B-cell chronic lymphocytic leukemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet*, **4**, 506-514.

- Hacein-Bey-Abina, S, Von Kalle, C, Schmidt, M, McCormack, MP, Wulffraat, N, Leboulch, P, Lim, A, Osborne, CS, Pawliuk, R, Morillon, E, Sorensen, R, Forster, A, Fraser, P, Cohen, JI, de Saint Basile, G, Alexander, I, Wintergerst, U, Frebourg, T, Aurias, A, Stoppa-Lyonnet, D, Romana, S, Radford-Weiss, I, Gross, F, Valensi, F, Delabesse, E, Macintyre, E, Sigaux, F, Soulier, J, Leiva, LE, Wissler, M, Prinz, C, Rabbitts, TH, Le Deist, F, Fischer, A and Cavazzana-Calvo, M (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, **302**, 415-419.
- Haddad, RS and Hutt-Fletcher, LM (1989) Depletion of glycoprotein gp85 from virosomes made with Epstein-Barr virus proteins abolishes their ability to fuse with virus receptor-bearing cells. *Journal of Virology*, **63**, 4998-5005.
- Hamblin, T (2002) Chronic lymphocytic leukemia: one disease or two? *Annals of Hematology*, **81**, 299-303.
- Hamblin, TJ, Davis, Z, Gardiner, A, Oscier, DG and Stevenson, FK (1999) Unmutated IgV_H genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 1848-1854.
- Hammerschmidt, W and Sugden, B (1988a) Identification and characterization of *oriLyt*, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*, **55**, 427-433.
- Hammerschmidt, W and Sugden, B (1988b) Vectors derived from Epstein-Barr virus. In: *Current Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, pp. 23-30.
- Hammerschmidt, W and Sugden, B (1989) Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature*, **340**, 393-397.
- Hammerschmidt, W and Sugden, B (2004) Epstein-Barr virus sustains Burkitt's lymphomas and Hodgkin's disease. *Trends in Molecular Medicine*, **10**, 331-336.
- Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal Of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Hanahan, D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover, D (ed). *DNA cloning. A practical approach*. IRL Press: Oxford, pp. 109-135.
- Harms, JS, Oliveira, SC and Splitter, GA (1999) Regulation of transgene expression in genetic immunization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**, 155-162.
- Hegmans, JPJJ, Bard, MPL, Hemmes, A, Luider, TM, Kleijmeer, MJ, Prins, J-B, Zitvogel, L, Burgers, SA, Hoogsteden, HC and Lambrecht, BN (2004) Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *The American Journal of Pathology*, **164**, 1807-1815.
- Henle, W, Diehl, V, Kohn, G, Zur Hausen, H and Henle, G (1967) Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science*, **157**, 1064-1065.
- Henn, V, Steinbach, S, Buchner, K, Presek, P and Kroccek, RA (2001) The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*, **98**, 1047-1054.

Hettich, E, Janz, A, Zeidler, R, Pich, D, Hellebrand, E, Weissflog, B, Moosmann, A and Hammerschmidt, W (2006) Genetic design of an optimized packaging cell line for gene vectors transducing human B cells. *Gene Therapy*, **13**, 844-856.

Hicke, L (2001a) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell*, **106**, 527-530.

Hicke, L (2001b) Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **2**, 195-201.

Hiddemann, W, Longo, DL, Coiffier, B, Fisher, RI, Cabanillas, F, Cavalli, F, Nadler, LM, De Vita, VT, Lister, TA and Armitage, JO (1996) Lymphoma classification-the gap between biology and clinical management is closing. *Blood*, **88**, 4085-4089.

Hirt, B (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *Journal Of Molecular Biology*, **26**, 365-369.

Hitt, MM, Addison, CL and Graham, FL (1997) Human adenovirus vectors for gene transfer in mammalian cells. *Advances in Pharmacology*, **40**, 137-206.

Hollenbaugh, D, Grosmaire, LS, Kullas, CD, Chalupny, NJ, Braesch-Andersen, S, Noelle, RJ, Stamenkovic, I, Ledbetter, JA and Aruffo, A (1992) The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *The EMBO Journal*, **11**, 4313-4321.

Hung, SC, Kang, MS and Kieff, E (2001) Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **98**, 1865-1870.

Ihara, M, Oda, Y and Yayamoto, K (1985) Convenient construction of strains useful for transducing *recA* mutations with bacteriophage P1. *FEMS Microbiology Letters*, **30**, 33-35.

Imadome, K-I, Shirakata, M, Shimizu, N, Nonoyama, S and Yamanashi, Y (2003) CD40 ligand is a critical effector of Epstein-Barr virus in host cell survival and transformation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **100**, 7836-7840.

Israel, BF and Kenney, SC (2003) Virally targeted therapies for EBV-associated malignancies. *Oncogene*, **22**, 5122-5130.

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

Johnstone, RM, Adam, M, Hammond, JR, Orr, L and Turbide, C (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 9412-9420.

Jones, HW, Jr., McKusick, VA, Harper, PS and Wu, KD (1971) George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstetrics and Gynecology*, **38**, 945-949.

- Kalpana, GV (1999) Retroviral vectors for liver-directed gene therapy. *Seminars in Liver Disease*, **19**, 27-37.
- Kanda, T, Yajima, M, Ahsan, N, Tanaka, M and Takada, K (2004) Production of High-Titer Epstein-Barr Virus Recombinants Derived from Akata Cells by Using a Bacterial Artificial Chromosome System. *Journal of Virology*, **78**, 7004-7015.
- Kaneda, Y, Saeki, Y, Nakabayashi, M, Zhou, W-Z, Kaneda, M-W and Morishita, R (2000) Enhancement of transgene expression by cotransfection of oriP plasmid with EBNA-1 expression vector. *Human Gene Therapy*, **11**, 471-479.
- Kang, MS, Hung, SC and Kieff, E (2001) Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 activates transcription from episomal but not integrated DNA and does not alter lymphocyte growth. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **98**, 15233-15238.
- Kang, MS, Lu, H, Yasui, T, Sharpe, A, Warren, H, Cahir-McFarland, E, Bronson, R, Hung, SC and Kieff, E (2005) Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 does not induce lymphoma in transgenic FVB mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **102**, 820-825.
- Kato, A, Cantwell, MJ, Sharma, S and Kipps, TJ (1998) Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Clinical Investigation*, **101**, 1133-1141.
- Katzmann, DJ, Babst, M and Emr, SD (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, **106**, 145-155.
- Kay, MA, Glorioso, JC and Naldini, L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, **7**, 33-40.
- Kay, NE and Kaplan, ME (1986) Defective T cell responsiveness in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of activation events. *Blood*, **67**, 578-581.
- Kaye, KM, Izumi, KM and Kieff, E (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America*, **90**, 9150-9154.
- Kempkes, B, Pich, D, Zeidler, R and Hammerschmidt, W (1995a) immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **92**, 5875-5879.
- Kempkes, B, Pich, D, Zeidler, R, Sugden, B and Hammerschmidt, W (1995b) immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *Journal of Virology*, **69**, 231-238.
- Kempkes, B, Spitkovsky, D, Jansen-Dürr, P, Ellwart, JW, Delecluse, H-J, Rottenberger, C, Kremmer, E, Bornkamm, GW and Hammerschmidt, W (1995c) B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *The EMBO Journal*, **14**, 88-96.
- Kennedy, G, Komano, J and Sugden, B (2003) Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **100**, 14269-14274.

- Kieff, E (1996) Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields, BN, Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Monath, T. P., Melnick, J. L., Roizman, B., Straus, S. E. (ed). *Virology*. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, pp. 2343-2396.
- Kieff, E and Rickinson, AB (2001) Epstein-Barr virus and its replication. In: Knipe, DM, Howley, PM, Griffin, DE, Martin, MA, Lamb, RA, Roizman, B and Straus, SE (eds). *Fields' Virology*. Lippincott - Williams & Wilkins: Philadelphia, pp. 2511-2573.
- Kilger, E, Kieser, A, Baumann, M and Hammerschmidt, W (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *The EBMO Journal*, **17**, 1700-1709.
- Kim, JV, Latouche, J-B, Rivière, I and Sadelain, M (2004) The ABCs of artificial antigen presentation. *Nature Biotechnology*, **22**, 403-410.
- Kipps, TJ (1995) Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. In: Beutler, E, Lichtman, MA, Collier, BS and Kipps, TJ (eds). *Williams Hematology*. McGraw-Hill: New York, NY, pp. 1017-1039.
- Kipps, TJ (2000a) Chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion in Hematology*, **7**, 223-234.
- Kipps, TJ (2003) Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion in Hematology*, **10**, 312-318.
- Kipps, TJ, Chu, P and Wierda, WG (2000b) Immunogenetic therapy for B-cell malignancies. *Seminars in Oncology*, **27**, 104-109.
- Klein, E, Teramoto, N, Gogolak, P, Nagy, N and Bjorkholm, M (1999) LMP-1, the Epstein-Barr virus-encoded oncogene with a B cell activating mechanism similar to CD40. *Immunology Letters*, **68**, 147-154.
- Kovesdi, I, Brough, DE, Bruder, JT and Wickham, TJ (1997) Adenoviral vectors for gene transfer. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 583-589.
- Krisky, DM, Marconi, PC, Oligino, TJ, Rouse, RJ, Fink, DJ, Cohen, JB, Watkins, SC and Glorioso, JC (1998) Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy applications. *Gene Therapy*, **5**, 1517-1530.
- Laman, JD, Claassen, E and Noelle, RJ (1996) Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). *Critical Reviews in Immunology*, **16**, 59-108.
- Langle-Roualt, F, Patzel, V, Benavente, A, Taillez, M, Silvestre, N, Bompard, A, Sczakiel, G, Jacobs, E and Rittner, K (1998) Up to 100-fold increase of apparent gene expression in the presence of Epstein-Barr virus oriP sequences and EBNA1: implications of the nuclear import of plasmids. *Journal of Virology*, **72**, 6181-6185.
- Lapointe, R, Bellemare-Pelletier, A, Housseau, F, Thibodeau, J and Hwu, P (2003) CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Research*, **63**, 2836-2843.
- Laytragoon-Lewin, N, Chen, F, Avila-Carino, J, Zou, JZ, Mellstedt, H, Ernberg, I and Klein, G (1995) Epstein Barr virus (EBV)-carrying cells of a chronic lymphocytic leukemia (CLL) subpopulation express EBNA1 and LMPs but not EBNA2 in vivo. *International Journal Of Cancer*, **63**, 486-490.
- Lederberg, J (1963) Molecular biology, eugenics and euphenics. *Nature*, **198**, 428-429.

- Lenschow, DJ, Walunas, TL and Bluestone, JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual Review of Immunology*, **14**, 233-258.
- Li, S and Ma, Z (2001) Nonviral gene therapy. *Current Gene Therapy*, **1**, 201-226.
- Lieber, A, Steinwaerder, DS, Carlson, CA and Kay, MA (1999) Integrating adenovirus- adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. *Journal of Virology*, **73**, 9314-9324.
- Liebowitz, D (1998) Pathogenesis of Epstein-Barr virus. In: McCance, D (ed). *Human Tumor Virus*. American Society for Microbiology.
- Lundstrom, K (2003) Latest development in viral vectors for gene therapy. *TRENDS in Biotechnology*, **21**, 117-122.
- Lusky, M, Christ, M, Rittner, K, Dieterle, A, Dreyer, D, Mouro, B, Schultz, H, Stoeckel, F, Pavirani, A and Mehtali, M (1998) In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *Journal of Virology*, **72**, 2022-2032.
- Mandic, A and Vujkov, T (2004) Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Annals of Oncology*, **15**, 197-200.
- Masciopinto, F, Giovani, C, Campagnoli, S, Galli-Stampino, L, Colombatto, P, Brunetto, M, Yen, BTS, Houghton, M, Piero, P and Abrignani, S (2004) Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *European Journal Of Immunology*, **34**, 2834-2842.
- Matthews, NC, Wadhwa, M, Bird, C, Borrás, FE and Navarrete, CV (2000) Sustained Expression of CD154 (CD40L) and Proinflammatory Cytokine Production by Alloantigen-Stimulated Umbilical Cord Blood T Cells. *Journal Of Immunology*, **164**, 6206-6212.
- Matulonis, UA, Dosiou, C, Lamont, C, Freeman, GJ, Mauch, P, Nadler, LM and Griffin, JD (1995) Role of B7 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells. *Blood*, **85**, 2507-2515.
- McDyer, JF, Li, Z, John, S, Yu, X, Wu, C-y and Ragheb, JA (2002) IL-2 Receptor Blockade Inhibits Late, But Not Early, IFN- γ and CD40 Ligand Expression in Human T Cells: Disruption of Both IL-12-Dependent and -Independent Pathways of IFN- γ Production. *Journal Of Immunology*, **169**, 2736-2746.
- Messerle, M, Crnkovic, I, Hammerschmidt, W, Ziegler, H and Koszinowski, UH (1997) Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **94**, 14759-14763.
- Metzenberg, S (1990) Levels of Epstein-Barr virus DNA in lymphoblastoid cell lines are correlated with frequencies of spontaneous lytic growth but not with levels of expression of EBNA-1, EBNA-2, or latent membrane protein. *Journal of Virology*, **64**, 437-444.
- Middleton, T and Sugden, B (1994) Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA1. *Journal of Virology*, **68**, 4067-4071.
- Miga, A, Masters, S, Gonzalez, M and Noelle, RJ (2000) The role of CD40-CD154 interactions in the regulation of cell mediated immunity. *Immunological Investigation*, **29**, 111-114.

- Miller, AD (2000) Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview.
- Miller, DG, Adam, MA and Miller, AD (1990) Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are replicating at the time of infection. *Molecular And Cellular Biology*, **10**, 4239-4242.
- Miller, G, Shope, T, Lisco, H, Stitt, D and Lipman, M (1972) Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America*, **69**, 383-387.
- Miller, N and Hutt-Fletcher, LM (1988) A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, **62**, 2366-2372.
- Mindich, L, Cohen, J and Weisburd, M (1976) Isolation of nonsense suppressor mutants in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, **126**, 177-182.
- Molesworth, SJ, Lake, CM, Borza, CM, Turk, SM and Hutt-Fletcher, LM (2000) Epstein-barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *Journal of Virology*, **74**, 6324-6332.
- Montserrat, E and Rozman, C (1995) Chronic lymphocytic leukemia: present status. *Annals of Oncology*, **6**, 219-235.
- Moosmann, A, Khan, N, Cobbold, M, Zentz, C, Delecluse, HJ, Hollweck, G, Hislop, AD, Blake, NW, Croom-Carter, D, Wollenberg, B, Moss, PA, Zeidler, R, Rickinson, AB and Hammerschmidt, W (2002) B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood*, **100**, 1755-1764.
- Morel, PA and Oriss, TB (1998) Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Critical Reviews in Immunology*, **18**, 275-303.
- Morral, N, O'Neal, W, Rice, K, Leland, M, Kaplan, J, Piedra, PA, Zhou, H, Parks, RJ, Velji, R, Aguilar-Cordova, E, Wadsworth, S, Graham, FL, Kochanek, S, Carey, KD and Beaudet, AL (1999) Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **96**, 12816-12821.
- Morral, N, Parks, RJ, Zhou, H, Langston, C, Schiedner, G, Quinones, J, Graham, FL, Kochanek, S and Beaudet, AL (1998) High doses of a helper dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha 1-antitrypsin with negligible toxicity. *Human Gene Therapy*, **9**, 2709-2716.
- Morse, MA, Garst, J, Osada, T, Khan, S, Hobeika, A, Clay, TM, Valente, N, Shreeniwas, R, Sutton, MA, Delcayre, A, Hsu, D-H, Le Pecq, J-B and Lyerly, HK (2005) A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Translational Medicine*, **3**, 1-8.
- Morsy, MA and Caskey, CT (1999) Expanded-capacity adenoviral vectors - the helper-dependent vectors. *Molecular Medicine Today*, **5**, 18-24.
- Mueller, DL, Jenkins, MK and Schwartz, RH (1989) Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annual Review of Immunology*, **7**, 445-480.

- Muyrers, JP, Zhang, Y, Benes, V, Testa, G, Ansorge, W and Stewart, AF (2000) Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO reports*, **1**, 239-243.
- Nakano, M, Odaka, K, Takahashi, Y, Ishimura, M, Saito, I and Kanegae, Y (2005) Production of viral vectors using recombinase-mediated cassette exchange. *Nucleic Acids Research*, **33**, 76.
- Nemerow, GR, Houghten, RA, Moore, MD and Cooper, NR (1989) Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell*, **56**, 369-377.
- Nemerow, GR, Mold, C, Schwend, VK, Tollefson, V and Cooper, NR (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *Journal of Virology*, **61**, 1416-1420.
- Nemerow, GR, Wolfert, R, McNaughton, ME and Cooper, NR (1985) Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *Journal of Virology*, **55**, 347-351.
- Neuhierl, B and Delecluse, HJ (2005) Molecular genetics of DNA viruses: recombinant virus technology. *Methods in Molecular Biology*, **292**, 353-370.
- Neuhierl, B, Feederle, R, Hammerschmidt, W and Delecluse, HJ (2002) Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **99**, 15036-15041.
- Nguyen, DG, Booth, A, Gould, SJ and Hildreth, JEK (2003) Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 52347-52354.
- Niedobitek, G (1999) The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virchows Archiv*, **435**, 79-86.
- Niidome, T and Huang, L (2002) Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Therapy*, **9**, 1647-1652.
- Noelle, RJ, Roy, M, Shepherd, DM, Stamenkovic, I, Ledbetter, JA and Aruffo, A (1992) A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America*, **89**, 6550-6554.
- O'Brien, S, del Giglio, A and Keating, M (1995) Advances in the biology and treatment of B-cell chronic leukemia. *Blood*, **85**, 307-318.
- O'Connor, M, Peifer, M and Bender, W (1989) Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science*, **244**, 1307-1312.
- Oda, T, Imai, S, Chiba, S and Takada, K (2000) Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp85 cannot infect B cells and epithelial cells. *Virology*, **276**, 52-58.
- Pan, B-T and Johnstone, RM (1983a) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, **33**, 967-978.

Pan, BT, R., B and Johnstone, RM (1983b) Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. *The Biochemical Journal*, **210**, 37-47.

Pangalis, GA, Vassilakopoulos, TP, Dimopoulou, MN, Siakantaris, MP, Kontopidou, FN and Angelopoulou, MK (2002) B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematological Oncology*, **20**, 103-146.

Pansegrau, W, Lanka, E, Barth, PT, Figurski, DH, Guiney, DG, Haas, D, Helinski, DR, Schwab, H, Stanisich, VA and Thomas, CM (1994) Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *Journal Of Molecular Biology*, **239**, 623-663.

Pfüller, R and Hammerschmidt, W (1996) Plasmid-like replicative intermediates of the Epstein-Barr virus lytic origin of DNA replication. *Journal of Virology*, **70**, 3423-3431.

Pisitkun, T, Shen, R-F and Knepper, MA (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **101**, 13368-13373.

Pope, JH, Horne, MK and Scott, W (1968) Transformation of foetal human leukocytes *in vitro* by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *International Journal Of Cancer*, **3**, 857-866.

Posfai, G, Koob, MD, Kirkpatrick, HA and Blattner, FR (1997) Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the Escherichia coli O157:H7 genome. *Journal of Bacteriology*, **179**, 4426-4428.

Pulvertaft, JV (1964) Cytology of Burkitt's tumour (African Lymphoma). *Lancet*, **39**, 238-240.

Ranheim, EA, Cantwell, MJ and Kipps, TJ (1995) Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, **85**, 3556-3565.

Relph, K, Harrington, K and Pandha, H (2004) Recent developments and current status of gene therapy using viral vectors in the United Kingdom. *BMJ*, **329**, 839-842.

Rickinson, AB, Finerty, S and Epstein, MA (1982) Interaction of Epstein-Barr virus with leukaemic B cells in vitro. I. Abortive infection and rare cell line establishment from chronic lymphocytic leukaemic cells. *Clinical And Experimental Immunology*, **50**, 347-354.

Rickinson, AB and Kieff, E (1996) Epstein-Barr virus. In: Fields, BN, Knipe, DM, Howley, PM, Chanock, RM, Melnick, JL, Monath, T, Roizman, B and Straus, SE (eds). *Virology*. Lippincott- Raven Publishers: Philadelphia, pp. 2397-2446.

Rickinson, AB and Kieff, E (2001) Epstein-Barr virus. In: Knipe, DM, Howley, PM, Griffin, DE, Martin, MA, Lamb, RA, Roizman, B and Straus, SE (eds). *Fields Virology*. Lippincott - Williams & Wilkins: Philadelphia, pp. 2575-2627.

Roe, T, Reynolds, TC, Yu, G and Brown, PO (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO Journal*, **12**, 2099-2108.

Rousset, F, Garcia, E and Banchereau, J (1991) Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *Journal Of Experimental Medicine*, **173**, 705-710.

- Rowe, M, Lear, AL, Croom, CD, Davies, AH and Rickinson, AB (1992) Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *Journal of Virology*, **66**, 122-131.
- Roy, M, Aruffo, A, Ledbetter, J, Linsley, P, Kehry, M and Noelle, R (1995) Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *European Journal Of Immunology*, **25**, 596-603.
- Rozman, C and Montserrat, E (1995) Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **333**, 1052-1057.
- Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- Schall, TJ, Lewis, M, Koller, KJ, Lee, A, Rice, GC, Wong, GH, Gatanaga, T, Granger, GA, Lentz, R, Raab, H and al., e (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, **61**, 361-370.
- Scheibenbogen, C, Romero, P, Rivoltini, L, Herr, W, Schmittel, A, Cerottini, J-C, Woelfel, T, Eggermont, AMM and Keilholz, U (2000) Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN γ -ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *Journal Of Immunological Methods*, **244**, 81-89.
- Schepers, A, Pich, D and Hammerschmidt, W (1993) A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *The EMBO Journal*, **12**, 3921-3929.
- Schiedner, G, Morral, N, Parks, RJ, Wu, Y, Koopmans, SC, Langston, C, Graham, FL, Beaudet, AL and Kochanek, S (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature Genetics*, **18**, 180-183.
- Schultze, JL, Michalak, S, Seamon, MJ, Dranoff, G, Jung, K, Daley, J, Delgado, JC, Gribben, JG and Nadler, LM (1997) CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*, **100**, 2757-2765.
- Segura, E, Amigorena, S and Thery, C (2005) Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **35**, 89-93.
- Shamash, J, Davies, DC, Salam, A, Rohatiner, AZS, Young, BD and Lister, TA (1995) Induction of CD80 expression in low-grade B-cell lymphoma - a potential immunotherapeutic target. *Leukemia*, **9**, 1349-1352.
- Sheng, Y, Mancino, V and Birren, B (1995) Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Research*, **23**, 1990-1996.
- Shimizu, N, Yoshiyama, H and Takada, K (1996) Clonal propagation of Epstein-Barr virus (EBV) recombinants in EBV-negative Akata cells. *Journal of Virology*, **70**, 7260-7263.
- Shinde, S, Wu, Y, Guo, Y, Niu, Q, Xu, J, Grewal, IS, Flavell, R and Liu, Y (1996) CD40L is important for induction of, but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L. *Journal Of Immunology*, **157**, 2764-2768.

- Skare, J and Strominger, JL (1980) Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from the transforming B98-8 strain of Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **77**, 3860-3864.
- Southern, EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Of Molecular Biology*, **98**, 503-517.
- Spriggs, MK, Armitage, RJ, Strockbine, L, Clifford, KN, Macduff, BM, Sato, TA, Maliszewski, CR and Fanslow, WC (1992) Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *Journal Of Experimental Medicine*, **176**, 1543-1550.
- Stacchini, A, Aragno, M, Vallario, A, Alfarano, A, Circosta, P, Gottardi, D, Faldella, A, Rege-Cambrin, G, Thunberg, U, Nilsson, K and Caligaris-Cappio, F (1999) MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leukemia Research*, **23**, 127-136.
- Stilgenbauer, S, Lichter, P and Döhner, H (2000) Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, **4**, 48-72.
- Sugden, B and Mark, W (1977) Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, **23**, 503-508.
- Sugden, B, Phelps, M and Domoradzki, J (1979) Epstein-Barr virus DNA is amplified in transformed lymphocytes. *Journal of Virology*, **31**, 590-595.
- Takada, K (1984) Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. *International Journal Of Cancer*, **33**, 27-32.
- Takada, K, Horinouchi, K, Ono, Y, Aya, T, Osato, T, Takahashi, M and Hayasaka, S (1991) An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. *Virus Genes*, **5**, 147-156.
- Takada, K and Ono, Y (1989) Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *Journal of Virology*, **63**, 445-449.
- Takahashi, S, Rousseau, RF, Yotnda, P, Mei, Z, Dotti, G, Rill, D, Hurwitz, R, Marini, F, Andreeff, M and Brenner, MK (2001) Autologous antileukemic immune response induced by chronic lymphocytic leukemia B cells expressing the CD40 ligand and interleukin 2 transgenes. *Human Gene Therapy*, **12**, 659-670.
- Taylor, DD and Gercel-Taylor, C (2005) Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *British Journal Of Cancer*, **92**, 305-311.
- Taylor, DD, Gercel-Taylor, C, Lyons, KS, Stanson, J and Whiteside, TL (2003) T-Cell Apoptosis and Suppression of T-Cell Receptor/CD3-zeta by Fas Ligand-Containing Membrane Vesicles Shed from Ovarian Tumors. *Clinical Cancer Research*, **9**, 5113-5119.
- Teoh, G, Tai, YT, Urashima, M, Shirahama, S, Matsuzaki, M, Chauhan, D, Treon, SP, Raje, N, Hideshima, T, Shima, Y and Anderson, KC (2000) CD40 activation mediates p53-dependent cell cycle regulation in human multiple myeloma cell lines. *Blood*, **95**, 1039-1046.
- Thery, C, Duban, L, Segura, E, Veron, P, Lantz, O and Amigorena, S (2002a) Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology*, **3**, 1156-1162.

- Thery, C, Zitvogel, L and Amigorena, S (2002b) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology*, **2**, 569-579.
- Thomas, CE, Ehrhardt, A and Kay, MA (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews. Genetics*, **4**, 346-358.
- Thorley-Lawson, DA, Miyashita, EM and Khan, G (1996) Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes. *Trends in Microbiology*, **4**, 204-208.
- Tolba, KA, Bowers, WJ, Hilchey, SP, Halterman, MW, Howard, DF, Guiliano, RE, Federoff, HJ and Rosenblatt, JD (2001) Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **98**, 287-295.
- Tomkinson, B, Robertson, E and Kieff, E (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *Journal of Virology*, **67**, 2014-2025.
- Townsend, SE and Allison, JP (1993) Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science*, **259**, 368-370.
- Van den Hove, LE, Van Gool, SW, Vandenberghe, P, Bakkus, M, Thielemans, K, Boogaerts, MA and Ceuppens, JL (1997) CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia*, **11**, 572-580.
- Vazirabadi, G, Geiger, TR, Coffin, WFI and Martin, JM (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) and lytic LMP-1 localization in plasma membrane-derived extracellular vesicles and intracellular virions. *The Journal of General Virology*, **84**, 1997-2008.
- Vora, AC, McCord, M, Fitzgerald, ML, Inman, RB and Grandgenett, DP (1994) Efficient concerted integration of retrovirus-like DNA in vitro by avian myeloblastosis virus integrase. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4454-4461.
- Wagner, M, Ruzsics, Z and Koszinowski, UH (2002) Herpesvirus genetics has come of age. *Trends in Microbiology*, **10**, 318-324.
- Wang, F, Li, X, Annis, B and Faustman, DL (1995) Tap-1 and Tap-2 gene therapy selectively restores conformationally dependent HLA Class I expression in type I diabetic cells. *Human Gene Therapy*, **6**, 1005-1017.
- Wang, S and Vos, JM (1996) A hybrid herpesvirus infectious vector based on Epstein-Barr virus and herpes simplex virus type 1 for gene transfer into human cells in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, **70**, 8422-8430.
- Wendel-Hansen, V, Sallstrom, J, De Campos-Lima, PO, Kjellstrom, G, Sandlund, A, Siegbahn, A, Carlsson, M, Nilsson, K and Rosen, A (1994) Epstein-Barr virus (EBV) can immortalize B-cell cells activated by cytokines. *Leukemia*, **8**, 476-484.
- Wendtner, C-M, Kofler, DM, Theiss, HD, Kurzeder, C, Buhmann, R, Schweighofer, C, Perabo, L, Danhauser-Riedl, S, Baumert, J, Hiddemann, W, Hallek, M and Büning, H (2002) Efficient gene transfer of CD40 ligand into primary B-CLL cells using recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Blood*, **100**, 1655-1661.

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

Whiteside, TL (2005) Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *British Journal Of Cancer*, **92**, 209-211.

Wickham, TJ, Mathias, P, Cheresh, DA and Nemerow, GR (1993) Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, **73**, 309-319.

Wierda, WG, Cantwell, MJ, Woods, SJ, Rassenti, LZ, Prussak, CE and Kipps, TJ (2000) CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **96**, 2917-2924.

Wilkinson, DE and Weller, SK (2004) Recruitment of cellular recombination and repair proteins to sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication is dependent on the composition of viral proteins within prereplicative sites and correlates with the induction of the DNA damage response. *Journal of Virology*, **78**, 4783-4796.

Wilson, JB, Bell, JL and Levine, AJ (1996) Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *The EMBO Journal*, **15**, 3117-3126.

Wolfers, J, Lozier, A, Raposo, G, Regnault, A, They, C, Masurier, C, Flament, C, Pouzieux, S, Faure, F, Tursz, T, Angevin, E, Amigorena, S and Zitvogel, L (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*, **7**, 297-303.

Wolos, JA and Davey, FR (1979) Depressed stimulation in the MLR by B lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia: failure to demonstrate a suppressor cell. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **14**, 77-85.

Wubbolts, R, Leckie, RS, Veenhuizen, PTM, Schwarzmann, G, Möbius, W, Hoernschemeyer, J, Slot, J-W, Geuze, HJ and Stoorvogel, W (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *Journal Of Biological Chemistry*, **278**, 10963-10972.

Yates, JL (1996) Epstein-Barr virus DNA replication. In: DePamphilis, ML (ed). *DNA replication in eukaryotic cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, pp. 751-773.

Yates, JL and Guan, N (1991) Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *Journal of Virology*, **65**, 483-488.

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

Yellin, MJ, Sinning, J, Covey, LR, Sherman, W, Lee, JJ, Glickman-Nir, E, Sippel, KC, Rogers, J, Cleary, AM and Parker, M (1994) T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity. *Journal Of Immunology*, **153**, 666-674.

Zeidler, R, Meissner, P, Eissner, G, Lazis, S and Hammerschmidt, W (1996) Rapid proliferation of B cells from adenoids in response to Epstein-Barr virus infection. *Cancer Research*, **56**, 5610-5614.

Zimber-Strobl, U, Kempkes, B, Marschall, G, Zeidler, R, Van Kooten, C, Banchereau, J, Bornkamm, GW and Hammerschmidt, W (1996) Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *The EMBO Journal*, **15**, 7070-7078.

zur Hausen, H, O'Neill, FJ and Freese, UK (1978) Persisting oncogenic herpesvirus induced by tumour promoter TPA. *Nature*, **272**, 373-375.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Annette Janz für die hervorragende Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die unermüdliche Unterstützung bei der Lösung aller Probleme.

Ich bedanke mich herzlich bei

Herrn PD Dr. Reinhard Zeidler für die hervorragende, wissenschaftliche Betreuung sowie für seine Unterstützung und seinen Beistand bei allen Problemen dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für seine unermüdliche Unterstützung, wissenschaftlichen Rat und für seine ständige Diskussionsbereitschaft

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey dafür, dass er die Pflichten des offiziellen Betreuers übernommen hat,

allen Mitarbeitern des Instituts für Genvektoren der gsf für die angenehmen und kollegiale Zusammenarbeit sowie praktische Unterstützung,

allen betreuenden Ärzten und besonders Frau Ciliberti der Medizinischen Klinik III des Münchener Klinikums Großhadern für die Bereitstellung von Patienten-Proben.

Meinen Kollegen aus dem Labor, Marc Borath, Gabi Hollweck, Markus Kalla, Andreas Moosmann, Bernhard Neuhierl, Bianca Weissflog, Tine Wiesner und Caro Zentz, danke ich für die angenehme und kollegiale Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Eva Hettich
Geburtsdatum: 06.04.1977
Geburtsort: Dachau
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1983-1987 Grundschule in München-Untermenzing

1987-1996 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am
Wittelsbacher-Gymnasium,
Facharbeit in Biologie am Max-Planck-Institut für Biochemie:
„Auftrennung eines Proteingemisches mit Hilfe
der Gel-Elektrophorese“

1996-2001 Studium der Biologie an der Technischen Universität München,
Diplomarbeit am Lehrstuhl Biologische Chemie:
„Rekombinante Herstellung des humanen NOGO-Proteins“

2001-2006 Promotion bei Vaecgene Biotech GmbH in Kooperation mit
gsf-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit