

**Eignung von SIV_{smm}PBj-abgeleiteten lentiviralen
Vektoren für die Transduktion primärer Zellen und
für immuntherapeutische Anwendungen**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich 14
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Julia Kaiser
aus Wiesbaden

Frankfurt am Main 2009
(D 30)

Vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:.....Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter:.....Prof. Dr. Bernd Ludwig

Gutachter:.....Prof. Dr. Klaus Cichutek

Datum der Disputation:.....08.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gentherapie	1
1.2 Lentiviren	3
1.2.1 Lentivirale Vektoren	6
1.2.2 Das simiane Immundefizienzvirus SIV _{smm} PBj und davon abgeleitete Vektoren	9
1.3 Mögliche Zielzellen für den Gentransfer mit von SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektoren	10
1.3.1 Hämatopoetische Stammzellen	11
1.3.2 Makrophagen	13
1.3.3 Dendritische Zellen	14
1.3.3.1 Immuntherapie mit dendritischen Zellen	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Lösungen	20
2.1.3 Antibiotika	21
2.1.4 Plasmide	21
2.1.5 Bakterienstämme	22
2.1.6 Enzyme	22
2.1.7 Kits	23
2.1.8 Zytokine und Wachstumsfaktoren	23
2.1.9 Antikörper	24
2.1.10 Zelllinien	25
2.1.11 Verbrauchsmaterial	25
2.1.12 Geräte	26

2.2 Methoden	27
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	27
2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien	27
2.2.1.2 Lagerung von Bakterien	27
2.2.1.3 Transformation von Bakterien	27
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.2.1 Restriktion von Plasmid-DNA	28
2.2.2.2 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA	28
2.2.2.3 Dephosphorylierung von DNA durch Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	29
2.2.2.4 Auffüllen überstehender Enden von DNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	29
2.2.2.5 DNA-Reinigung	29
2.2.2.6 Ligation	30
2.2.2.7 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien ("Mini-Präp")	30
2.2.2.8 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp")	30
2.2.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA	31
2.2.3 Zellbiologische Methoden	31
2.2.3.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien	31
2.2.3.2 Lagerung von eukaryotischen Zellen	31
2.2.3.2.1 Lagerung von Zelllinien	31
2.2.3.2.2 Lagerung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)	32
2.2.3.2.3 Lagerung von humanen hämatopoetischen Stammzellen (HSC)	32
2.2.3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Calcium-Phosphat zur Vektorproduktion	32
2.2.3.4 Konzentration retroviraler Partikel durch Ultrazentrifugation	33
2.2.3.5 Titration von retroviralen Vektoren	34
2.2.3.6 Präparation von humanem AB-Serum	34
2.2.3.7 Isolierung und Kultivierung von primären Zellen	34
2.2.3.7.1 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) aus Blut	34
2.2.3.7.2 Isolierung primärer humaner CD14⁺ Monozyten mittels MACS[®] ("magnetic cell sorting") (Positivisolierung)	35
2.2.3.7.3 Isolierung primärer humaner B-Lymphozyten durch magnetische Zell-Separierung mit Dynabeads (Negativdepletion)	36
2.2.3.7.4 Kultivierung humaner B-Lymphozyten	36

2.2.3.7.5 Isolierung primärer humaner CD8+-T-Lymphozyten durch magnetische Zell-Separierung mit Dynabeads (Negativdepletion)	37
2.2.3.7.6 Isolierung primärer simianer Monozyten mittels MACS (Positivisolierung) ...	37
2.2.3.7.7 Kultivierung von simianen Monozyten	38
2.2.3.7.8 Isolierung primärer muriner Monozyten (Negativdepletion)	38
2.2.3.7.9 Kultivierung muriner Monozyten	39
2.2.3.7.10 Kultivierung von humanen hämatopoetischen Stammzellen	39
2.2.3.8 Differenzierung von primären Zellen	40
2.2.3.8.1 Differenzierung von humanen unreifen und reifen dendritischen Zellen aus Monozyten	40
2.2.3.8.2 Differenzierung von Makrophagen aus Monozyten	41
2.2.3.9 Transduktion von primären Zellen	41
2.2.3.9.1 Multiplicity of Infection (MOI)	41
2.2.3.9.2 Transduktion von Monozyten und unreifen dendritischen Zellen	41
2.2.3.9.3 Transduktion von B-Lymphozyten	42
2.2.3.9.4 Transduktion von simianen Monozyten	42
2.2.3.9.5 Transduktion von murinen Monozzten	42
2.2.3.9.6 Transduktion von humanen Makrophagen	43
2.2.3.9.7 Transduktion von humanen hämatopoetischen Stammzellen	43
2.2.3.10 Generierung von Mart-spezifischen CD8 ⁺ -T-Zellen	43
2.2.3.10.1 Stimulierung von CD8 ⁺ -T-Zellen mit dendritischen Zellen	43
2.2.3.10.2 Stimulierung von CD8 ⁺ -T-Zellen mit Makrophagen	44
2.2.3.11 Progenitorzellassay	44
2.2.4 Analytische Methoden	45
2.2.4.1 Analytische Durchflusszytometrie "Fluorescence Activated Cell Sorting" (FACS)	45
2.2.4.2 EGFP-Nachweis	46
2.2.4.3 Nachweis des Mart-Proteins mittels einer intrazellulären FACS-Färbung	46
2.2.4.4 Nachweis von Oberflächenmarkerproteinen auf PBMCs durch FACS	46
2.2.4.5 MHC-Dextramer-Färbung	47
2.2.4.6 Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der lytischen Kapazität von zytotoxischen T-Zellen	47
2.2.4.6.1 Bestimmung der optimalen Zielzellichte für den Zytotoxizitätsassay	47
2.2.4.6.2 Bestimmung der lytischen Kapazität von zytotoxischen T-Zellen	48
2.2.4.7 Bestimmung der Zytokinproduktion von dendritischen Zellen mittels eines Zytokin-Arrays	49

2.2.4.8 Bestimmung der Zytokinproduktion mittels eines IFN- γ -, TNF- α - und GM-CSF-ELISAs (Enzyme linked immunosorbent assay)	49
2.2.4.9 May-Grünwald-Giemsa-Färbung	50
3. Ergebnisse	51
3.1 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Transduktion humaner hämatopoetischer Stammzellen	53
3.1.1 Transduktion von humanen hämatopoetischen Stammzellen	53
3.1.1.1 Zeitlicher Verlauf der CD34-Expression der hämatopoetischen Stammzellen während der Kultivierung	54
3.1.1.2 Transduktionseigenschaften von SIV _{smm} PBj-, HIV-2- und HIV-1-Vektoren auf humanen hämatopoetischen Stammzellen	55
3.1.2 Differenzierungspotenzial von transduzierten hämatopoetischen Stammzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	56
3.1.2.1 Optimierung des Transduktionsprotokolls zur Erhöhung der Transduktionseffizienz von lentiviralen Vektoren auf hämatopoetischen Stammzellen	56
3.1.2.2 Einfluss der Transduktion mit lentiviralen Vektoren auf das Differenzierungspotenzial hämatopoetischer Stammzellen <i>in vitro</i>	57
3.1.2.2.1 Einfluss der Transduktion auf die Oberflächenmarkerexpression von hämatopoetischen Stammzellen	58
3.1.2.2.2 Transduktionseffizienz der verschiedenen Vektoren auf Stammzellen aus Nabelschnurblut	59
3.1.2.2.3 <i>In vitro</i> -Analyse des Differenzierungspotenzials von transduzierten Stammzellen im Progenitorzellassay	60
3.1.3 Analyse der transduzierten Stammzellen nach Repopulierung von NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-} -Mäuse	64
3.1.3.1 Engraftment und EGFP-Expression der transplantierten Stammzellen	64
3.1.3.2 CD34-Stammzellmarkerexpression in NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-} -Mäusen	66
3.1.3.3 <i>In vivo</i> -Differenzierungspotenzial von transduzierten und transplantierten CD34 ⁺ -Zellen in der NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-} -Maus	67
3.2 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Transduktion humaner B-Lymphozyten	68
3.2.1 Isolierung und Kultivierung von humanen B-Lymphozyten	68
3.2.2 Transduktionseigenschaften von SIV _{smm} PBj- und HIV-1-Vektoren auf humanen B-Lymphozyten	69

3.3 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Transduktion humaner Makrophagen	71
3.3.1 Isolierung humaner Monozyten	71
3.3.2 Differenzierung und Charakterisierung von humanen Monozyten und Makrophagen	71
3.3.2.1 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen	71
3.3.2.2 Nachweis der Differenzierung zu Makrophagen	72
3.3.2.3 Zellmorphologie während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen	73
3.3.3 Transduktionseigenschaften der lentiviralen Vektoren auf Monozyten und Makrophagen	73
3.4 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Transduktion humaner dendritischer Zellen	75
3.4.1 Differenzierung und Charakterisierung von humanen Monozyten und myeloiden dendritischen Zellen	75
3.4.1.1 Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen	75
3.4.1.2 Nachweis der Differenzierung zu dendritischen Zellen	76
3.4.1.3 Zellmorphologie während der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen	79
3.4.2 Transduktionseigenschaften der lentiviralen Vektoren auf Monozyten und unreifen dendritischen Zellen	80
3.5 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Generierung von zytotoxischen T-Zellen	81
3.5.1 Transduktion von humanen Monozyten und unreifen dendritischen Zellen	81
3.5.2 Einfluss der Transduktion mit SIV _{smm} PBj-Vektoren auf die Oberflächenmarker dendritischer Zellen	82
3.5.3 Einfluss der Transduktion mit SIV _{smm} PBj-Vektoren auf die Zytokinserzenierung von reifen dendritischen Zellen	83
3.5.4 Generierung eines <i>mart-1</i> -übertragenden Vektors	84
3.5.4.1 Klonierung des <i>mart-1</i> Gens in den Transfervektor pPBj-4xko	85
3.5.5 Transduktion von Monozyten und unreifen dendritischen Zellen mit [SIV _{4xko-Mart} (VSV)+Vpx]-Vektoren	87
3.5.6 Generierung von Mart-spezifischen zytotoxischen T-Zellen mit transduzierten dendritischen Zellen	87

3.5.6.1 Analyse der Mart-Spezifität der generierten T-Zellen	89
3.5.6.2 Funktionalität der Mart-spezifischen zytotoxischen T-Zellen	90
3.5.6.2.1 Charakterisierung der Melanomzelllinien	90
3.5.6.3 Zytokinsezernierung von zytotoxischen T-Zellen	91
3.5.6.4 Zytotoxische Aktivität der generierten zytotoxischen T-Zellen	93
3.5.6.4.1 Quantitative Analyse der lytischen Kapazität der zytotoxischen T-Zellen	94
3.5.6.4.1.1 Bestimmung der optimalen Zelldichte der Zielzellen für den Zytotoxizitätsassay	95
3.5.6.4.1.2 Bestimmung der lytischen Kapazität der zytotoxischen T-Zellen	96
3.5.7 Eignung von Makrophagen zum T-Zellpriming nach Transduktion mit SIV _{smm} PBj-Vektoren	97
3.6 Mögliche Tiermodelle für Anwendungen des SIV_{smm}PBj-Vektoren	99
3.6.1 Transduktion von murinen Monozyten	99
3.6.1.1 Isolierung und Kultivierung muriner Monozyten	99
3.6.1.2 Transduktionseffizienz von SIV _{smm} PBj- und HIV-1-Vektoren auf murinen Monozyten	102
3.6.2 Eignung lentiviraler Vektoren zur Transduktion simianer Monozyten	103
3.6.2.1 Isolierung und Kultivierung primärer simianer Monozyten	103
3.6.2.2 Transduktionseffizienz von SIV _{smm} PBj- und HIV-1-Vektoren auf simianen Monozyten	105
4. Diskussion	108
4.1 Transduktion von humanen hämatopoetischen Stammzellen	108
4.1.1 Transduktionseffizienz von SIV _{smm} PBj-Vektoren für humane hämatopoetische Stammzellen	109
4.1.2 Lentivirale Vektoren können das <i>in vitro</i> -Differenzierungspotenzial von hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen	110
4.1.3 Die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen mit lentiviralen Vektoren hat keinen Einfluss auf das <i>in vivo</i> -Differenzierungspotenzial	112
4.2 SIV_{smm}PBj-abgeleitete Vektoren besitzen keinen Transduktionsvorteil für humane B-Lymphozyten	114

4.3 Effiziente Transduktion von humanen Makrophagen und dendritischen Zellen	115
4.4 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zum Priming von CD8⁺-T-Zellen	116
4.4.1 Einfluss der Transduktion auf Phänotyp und Zytokinsekretion von dendritischen Zellen	116
4.4.2 Effiziente Transduktion von Monozyten mit <i>mart</i>-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektoren	117
4.4.3 Antigenpezifität und Funktionalität der generierten zytotoxische T-Zellen	118
4.4.4 Mit SIV_{smm}PBj-Vektoren transduzierte Monozyten können nach Differenzierung zu Makrophagen zytotoxische T-Zellen generieren	119
4.5 Das Mausmodell ist für die Anwendung von SIV_{smm}PBj-Vektoren nicht geeignet	120
4.6 Affen sind als Tiermodell für die Anwendung des SIV_{smm}PBj-Vektors geeignet	122
5. Zusammenfassung	124
6. Literaturverzeichnis	126
7. Abkürzungsverzeichnis	142
8. Danksagung	144

1 Einleitung

1.1 Gentherapie

Es gibt eine Vielzahl von Krankheiten, die im Rahmen konventioneller Behandlungsmöglichkeiten nur eingeschränkt therapierbar und in vielen Fällen letztlich nicht heilbar sind. Hierzu zählen unter anderem HIV-Infektionen, Alzheimer oder verschiedene Krebserkrankungen. Neben den etablierten Therapiemöglichkeiten könnte die Gentherapie eine weitere mögliche Behandlung darstellen. Ziel ist es hierbei unter anderem, therapeutische Gene mit Hilfe sogenannten Genfähren in Zellen einzuschleusen, welche die Symptome lindern oder die Krankheit sogar heilen könnten. Wird die Erkrankung z.B. durch einen Gendefekt ausgelöst, kann eine intakte Kopie des defekten Gens in die Zellen eingebracht werden. Wird die Erkrankung durch eine Infektion ausgelöst, können therapeutische Gene beispielsweise in Immunzellen eingeschleust werden, um eine Immunantwort gegen den Erreger zu fördern. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Einbringen von Suizidgenen in Tumorzellen, welche in den Zellen Apoptose auslösen können.

Insgesamt wurden bis September 2008 weltweit ca. 1500 Gentherapiestudien durchgeführt (Quelle: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). Die Anwendungsgebiete möglicher Gentransferarzneimittel sind vielfältig. Ungefähr 2/3 der Studien entfielen auf die Behandlung von Krebserkrankungen (66,5%), 9% auf kardiovaskuläre Erkrankungen, 8,2% auf monogene Erkrankungen und 6,6% auf Infektionserkrankungen.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten den Gentransfer mit Hilfe der Genfähren durchzuführen: 1. *Ex vivo*. Bei diesem Ansatz werden dem Körper die Zielzellen entnommen und *in vitro* mit der entsprechenden Genfähre behandelt, um das Gen in die Zellen einzubringen. Anschließend werden dem Patienten die Zellen wieder reimplantiert. 2. *In vivo*. Hier werden die geeigneten Genfähren direkt systemisch appliziert oder in einen bestimmten Bereich des Körpers injiziert, z.B. in Tumore. Bei dieser Methode ist es wichtig, dass das therapeutische Gen gezielt und effizient in die gewünschten Zielzellen eingebracht werden kann.

Um ein Gen *in vitro* in eine Zelle einzubringen, gibt es eine Vielzahl von Methoden, wie z.B. Transfektion oder Elektroporation. Mit diesen Methoden ist das Spektrum an Zielzellen jedoch eingeschränkt, da sich Gene in die meisten primären Zellen nicht oder nur mit geringer Effizienz einschleusen lassen.

Eine mögliche Strategie, um diese Nachteile zu umgehen, ist der Einsatz von viralen Vektoren. Hier wird sich die Eigenschaft von Viren zu nutze gemacht, ihre genetische Informationen in Zellen einschleusen zu können. Bei dem Einsatz von Viren als Genfähren werden die pathogenen viralen Bestandteile entfernt, so dass keine Krankheiten ausgelöst und keine neuen Viren produziert werden können. Man spricht nun von viralen Vektoren, der Vorgang des Gentransfers wird Transduktion genannt.

Die viralen Vektoren sind von den verschiedensten Viren abgeleitet. In Abb. 1.1 sind die unterschiedlichen Genfähren aufgeführt, welche bis 2007 weltweit in gentherapeutischen Studien eingesetzt wurden.

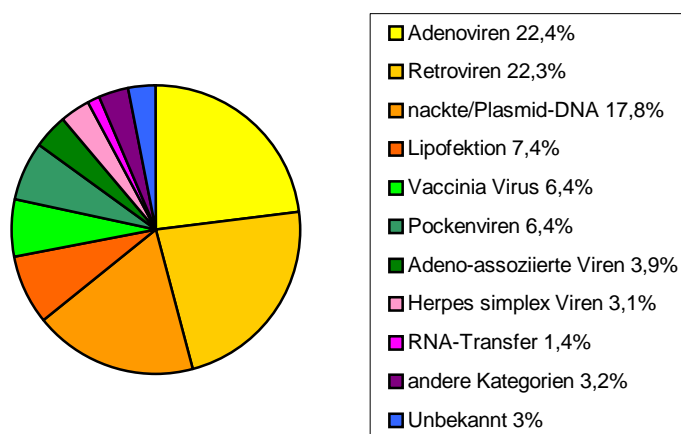


Abb. 1.1: Eingesetzte Genfähren in gentherapeutischen Studien. Gezeigt ist die prozentuale Aufteilung der verschiedenen Gentransfermethoden in Gentherapiestudien, welche bis 2007 weltweit eingesetzt wurden. Quelle: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>.

Es wurden je knapp $\frac{1}{4}$ der Gentherapiestudien mit Adenovektoren bzw. retroviralen Vektoren durchgeführt. Retrovirale Vektoren, insbesondere lentivirale, haben gegenüber Adenovirus-abgeleiteten Vektoren den großen Vorteil, dass sie das therapeutische Gen stabil in die Zielzelle einbringen können, wodurch eine langfristige Expression möglich ist. Dies ist für eine Langzeittherapie von chronischen Krankheiten wie beispielsweise Parkinson unabdingbar (Kordower *et al.*, 2000). Des weiteren besteht die Möglichkeit einer mehrmaligen Applikation, da lentivirale Vektoren nur schwach immunogen sind. Aufgrund der besonderen Eigenschaften werden Lentiviren und davon abgeleitete Vektoren im Folgenden näher beschrieben.

1.2 Lentiviren

Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren. Sie erhielten ihren Namen aufgrund des charakteristischen langsamen Infektionsverlaufs (lat. *lentus* = langsam). Der bekannteste Vertreter der Gruppe ist das humane Immundefizienzvirus (HIV), welches sich in die zwei Stämme HIV-1 und HIV-2 gliedert. Ein weiteres Immundefizienzvirus ist das simiane Immundefizienzvirus (SIV), das 1985 erstmals beschrieben wurde (Daniel *et al.*, 1985) und von dem bis heute eine Vielzahl von Isolaten aus verschiedenen Spezies gewonnen werden konnten. Die verschiedenen Lentiviren können aufgrund phylogenetischer Verwandtschaft in 5 unterschiedliche Gruppen unterteilt werden: I. HIV-1/SIV_{cpz} (Huet *et al.*, 1990); II. HIV-2/SIV_{smm}/SIV_{mac} (Hirsch *et al.*, 1998); III. SIV_{agm} (Johnson *et al.*, 1990); IV. SIV_{mnd} (Tsujimoto *et al.*, 1989); V. SIV_{syk} (Hirsch *et al.*, 1993). Es konnte nachgewiesen werden, dass sich HIV-1 aus dem simianen Immundefizienzvirus der Schimpansen (SIV_{cpz}) entwickelt hat (Huet *et al.*, 1990) und HIV-2 aus dem SIV der Schopfmangabe (SIV_{smm}) (Hirsch *et al.*, 1989).

Das Erbgut der Lentiviren besteht aus RNA, welche nach Transfer in die Wirtszellen durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wird, damit sie anschließend durch die Integrase in die DNA der Wirtszelle eingebaut werden kann. Neben der Protease werden beide Enzyme von dem viralen *pol*-Gen kodiert. Ein weiteres Gen ist *gag*, welches die genetische Information für die Capsid-, Matrix- und die Nucleocapsidproteine enthält. Die Glykoproteine, die in die Membran eingelagert sind, werden durch das *env*-Gen kodiert und auch als Hüllproteine bezeichnet. Von allen drei Genen wird zunächst je ein Vorläuferprotein synthetisiert. Die Gag- und Pol-Vorläuferproteine werden von der viralen Protease in die einzelnen Proteine prozessiert. Für die Spaltung des Env-Vorläuferproteins ist eine zelluläre Protease verantwortlich. Die Expression der viralen Gene wird durch die 5'-LTR (long terminal repeat) gesteuert, welche starke Promoter- und Enhancer-Elemente beinhaltet.

Lentiviren enthalten auch transaktivatorische Gene: *Tat* (transactivator of transcription) und *rev* (regulator of expression of virion proteins). *Tat* kann die Transkription der LTR um mehr als das 100-fache verstärken, indem es den Komplex zwischen mRNA und der RNA-Polymerase II stabilisiert. Das *Rev* Protein unterstützt den Transport der ungespleißten viralen RNA aus dem Kern, indem es Kernexportproteine rekrutiert (Modrow *et al.*, 2003). Der Genomaufbau von HIV-1 und HIV-2, sowie eine Darstellung eines viralen Partikels ist in Abb. 1.2 schematisch dargestellt. Wie zu sehen ist, trägt die virale RNA ein Verpackungssignal (ψ), dadurch wird sie in die viralen Partikel inkorporiert. Pro Virus werden zwei identische RNA-Einzelstränge verpackt.

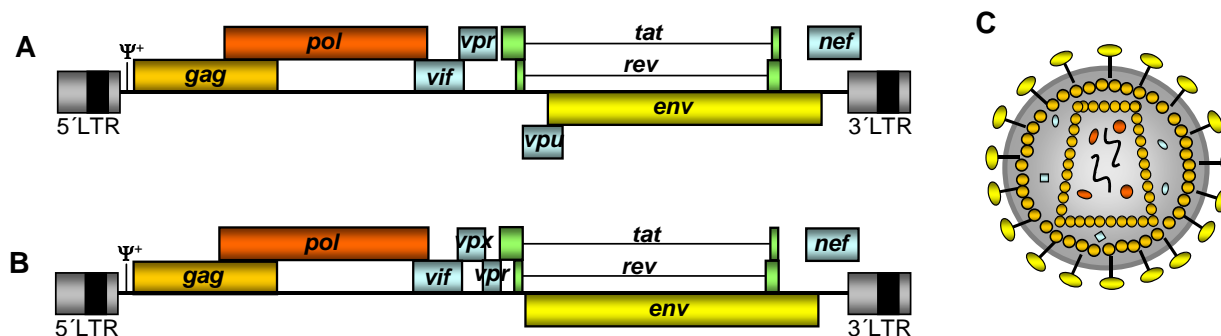


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von Lentiviren. A: Genomstruktur von HIV-1. B: Genomstruktur von HIV-2. C: Schematische Darstellung eines lentiviralen Partikels. Die Farben der in A und B dargestellten Gene entsprechen den in C gezeigten viralen Bestandteilen. Ψ = Verpackungssignal.

Lentiviren enthalten zusätzlich noch weitere Gene, die vier akzessorischen Gene *vif*, *vpr*, *nef* und *vpu* bzw. *vpx*, wobei die HIV-1-Gruppe *vpu* und die HIV-2-Gruppe *vpx* besitzt. Die akzessorischen Proteine spielen während der Replikation und Pathogenese *in vivo* eine wichtige Rolle. Sie geben den Lentiviren im Vergleich zu den anderen Retroviren besondere Eigenschaften, welche im Folgenden kurz beschrieben werden.

Vif (virion infectivity factor). Vif ist nicht essentiell für die Replikation des Virus in Zelllinien, jedoch für die in primären T-Lymphozyten. In der Abwesenheit von Vif verhindert das Wirtsprotein APOBEC3G (A3G - Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G) eine produktive Infektion von HIV (Sheehy *et al.*, 2002), indem es durch Interaktion mit der viralen RNA und dem Gag Protein in neu entstehende Virionen verpackt (Bogerd *et al.*, 2008) und somit in neu infizierte Zellen übertragen wird. Dort fügt es während der reversen Transkription C zu U Mutationen in das virale Genom ein, wodurch die virale Ausbreitung durch den Verlust der genetischen Integrität verhindert wird (Harris *et al.*, 2004). Ist jedoch Vif in der Zelle vorhanden, verhindert es den A3G-Einbau, indem es durch Bindung die Polyubiquitinierung und nachfolgend die Degradation von A3G induziert (Yu *et al.*, 2003).

Vpr (viral protein R). Vpr bewirkt in den infizierten Zellen einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase des Zellzyklus und kann Apoptose induzieren (Fukumori, *et al.*, 2000; Stivahtis *et al.*, 1997). Sind die Zellen in der G2-Phase arretiert, läuft die Transkription von HIV-1 aktiver ab und es können somit mehr Viren gebildet werden (Goh *et al.*, 1998). Andersen *et al.* (2006) konnten zeigen, dass der Signalweg, welcher den G2-Arrest bewirkt, mit dem Apoptose-Signalweg eng verbunden ist. Es wäre möglich, dass der Zellzyklusarrest nur ein

Nebenprodukt der Zerstörung eines Wirtsprotein ist, welches eine Rolle in der Zellzyklusprogression spielt und eine andere in dem Wirts-vermittelten Schutz gegen Viren. Des weiteren scheint Vpr in dem Kerntransport des PIC involviert zu sein (Kamata *et al.*, 2005).

Nef (negative factor). Das virale Protein wird nicht für Replikation auf Zelllinien benötigt, jedoch für die in ruhenden PBMCs (Spina *et al.*, 1994). Pizzato *et al.* (2007) zeigten eine durch Nef bedingt erhöhte Infektiosität, indem es das Aktinnetzwerk manipuliert und es dadurch dem viralen Kern den Eintritt während der initialen Phase der Infektion ermöglicht. Nef ist auch an der Herabregulierung von CD4- und MHC-I-Molekülen (Noviello *et al.*, 2008; Atkins *et al.*, 2008) beteiligt (Schwartz *et al.*, 1996; Aiken *et al.*, 1994; Roeth *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass durch die Herabregulierung der CD4-Rezeptoren eine Superinfektion vermieden wird, wodurch die Replikation und Verbreitung des Virus herabgesetzt werden würde (Chaudhuri *et al.*, 2007). Durch die Herabregulierung der MHC-Moleküle versucht das Virus einer Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen (Swigut *et al.*, 2004). Kestler *et al.* (1991) zeigten, dass Nef in infizierten Rhesusmakaken für die Entstehung einer hohen Virämie und von simianem AIDS eine wichtige Rolle spielt (Brenner *et al.*, 2006).

Vpu (viral protein U). Wie das akzessorische Protein Nef ist Vpr an der Herabregulierung des CD4-Rezeptors beteiligt (Margottin *et al.*, 1998). Dadurch wird die Interaktion von CD4 und dem viralen Env an der Zelloberfläche reduziert und mehr Viren können freigesetzt werden (Lama *et al.*, 1999). Des weiteren konnte eine Interaktion mit dem zellulären Membranprotein Tetherin (CD317) nachgewiesen werden (Neil *et al.*, 2008). Wenn Vpu nicht vorhanden ist, bindet das Membranprotein Tetherin die buddenden Partikel an die Zelloberfläche. Dadurch werden sie internalisiert und endosomal abgebaut (Neil *et al.*, 2008; Neil *et al.*, 2006). Ist jedoch Vpu in der Zelle vorhanden, interagiert es mit Tetherin und kann dadurch dessen Interaktion mit den viralen Partikeln verhindern (Van Damme *et al.*, 2008).

Vpx (viral protein x). Dieses Protein wird nur von der HIV-2-Gruppe (HIV-2, SIVmac, SIVsmm, SIVmnd-2, SIVrcm, SIVdrl) kodiert (Tristem *et al.*, 1998; Beer *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003). Unter den verschiedenen Lentiviren ist die Sequenz stark konserviert (Henderson *et al.*, 1998). Vpx ist durch Genduplikation von *vpr* entstanden (Tristem *et al.*, 1990), das Vpx Protein besitzt jedoch im Vergleich zu Vpr unterschiedliche Eigenschaften. So kann es die Zellen beispielsweise nicht in der G2-Phase arretieren (Fletcher *et al.*, 1996). Das Vpx Protein besitzt ein Kernlokalisierungssignal (NLS) (Belshan *et al.*, 2003) und ist notwendig für die Kernlokalisierung der viralen DNA in ruhenden Zellen (Mueller *et al.*, 2004), nicht jedoch für die Integration in das Wirtsgenom (Ueno *et al.*, 2003). In Tierversuchen konnte gezeigt

werden, dass Vpx für die virale Pathogenität wichtig ist. Rhesusmakaken, welche mit einer Vpx-Mutante (SIVmac Δ vpx) infiziert wurden, zeigten eine geringere virale Last als die Tiere, welche mit WT-Virus infiziert wurden. Auch konnte der Ausbruch von AIDS verspätet oder gar nicht beobachtet werden (Gibbs *et al.*, 1995). Des Weiteren konnten Hirsch *et al.* (1998) zeigen, dass für eine effektive Virusverbreitung und Pathogenese von SIVsmm in Schweinsaffen das Vpx Protein essentiell ist. Srivastava *et al.* (2008) zeigten ebenfalls die essentielle Funktion von Vpx für die Infektion von Makrophagen mit SIVsmm.

1.2.1 Lentivirale Vektoren

Lentivirale Vektoren haben den Vorteil, dass sie, im Gegenteil zu γ -retroviralen Vektoren, für die Integration des Transgens in die Zielzelle keine Zellteilung benötigen, so dass auch ruhende Zellen transduziert werden können (Naldini *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1990). Ein Nachteil bei dem Einsatz von viralen Vektoren ist die Möglichkeit der Generierung von replikationskompetenten Viren während der Vektorproduktion durch Rekombination der Vektorplasmide. Diese Gefahr kann jedoch stark reduziert werden, indem die viralen Gene auf mehrere Plasmide aufgeteilt werden. In Abb. 1.3 ist die schematische Struktur eines 3-Plasmidsystems für die Generierung von lentiviralen Vektoren schematisch dargestellt.

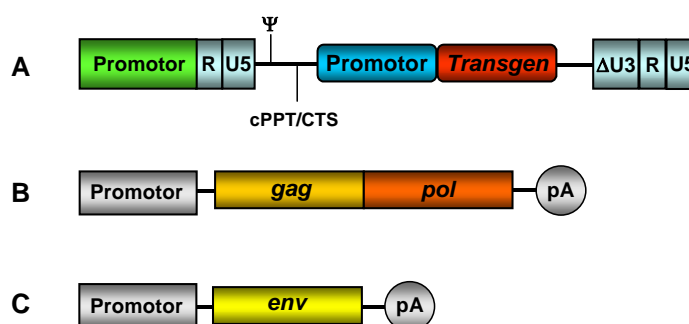


Abb. 1.3 Schematische Darstellung eines 3-Plasmidsystems. A: Transfervektor; B: Verpackungsvektor; C: Hüllexpressionsvektor. ψ : Verpackungssignal; cPPT: zentraler Polypurintrakt; CTS: zentrale Terminationssequenz; pA: Polyadenylierungssignal.

Bei einem 3-Plasmidsystemen sind das *env*-Gen, die *gag/pol*-Gene und das therapeutische Gen jeweils auf ein separates Plasmid aufgeteilt, wobei nur letzteres ein Verpackungssignal trägt (Transfervektor) (Dull *et al.*, 1998). Somit wird sichergestellt, dass nur die RNA in die entstehenden Partikel verpackt wird, welche das Transgen trägt. Das *tat*-Gen kann ganz entfernt werden, wenn ein starker Promotor in die 5'LTR eingesetzt wird. Durch

Kodonoptimierung wird das *rev*-Gen nicht mehr benötigt. Das cPPT/CTS (zentraler Polypurintrakt, zentrale Terminationssequenz) muss im Transfervektor vorhanden sein, um während der reversen Transkription eine Tripelhelix zu bilden, die den Transport des Präintegrationskomplexes (PIC) in den Kern vermittelt. Vektoren mit diesen Elementen haben einen höheren Titer und eine stärkere Transgenexpression in den Zielzellen (Follenzi *et al.*, 2000). Um das Vektordesign weiter zu verbessern, können post-transkriptionelle Elemente eingesetzt werden, wie z.B. das Woodchuck hepatitis B post-transcriptional regulatory element (WPRE). Dieses Element kann die Genexpression durch Modifizierung der Polyadenylierung, des RNA-Exports und der Translation erhöhen (Zufferey *et al.*, 1999). Bei einer *in vivo* Applikation der lentiviralen Vektoren besteht die Gefahr der Insertionsmutagenese. Da die virale LTR starke Promotoren enthält, können nach Integration der viralen DNA in den Zielzellen beispielsweise Protoonkogene transkribiert werden. So traten in Tiermodellen (Li *et al.*, 2002; Seggewiss *et al.*, 2006) und in einer klinischen Studie (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003) nach Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen mit retroviralen Vektoren Leukämien auf. Um dies zu verhindern werden sogenannte SIN (Self-inactivating)-Vektoren eingesetzt, bei welchen die 3'LTR deletiert ist (siehe Abb. 1.3 A) (Miyoshi *et al.*, 1998). Modlich *et al.* konnten zeigen, dass ein SIN-Vektor zwar immer noch Insertionsmutagenese auslösen kann, jedoch mit einer signifikant geringeren Frequenz als Vektoren, die eine vollständige LTR enthalten (Modlich *et al.*, 2006).

Durch die Aufteilung des *env*-Gens auf ein separates Plasmid (Hülleexpressionsvektor) können die Glykoproteine verschiedener Viren eingesetzt werden. Dadurch kann das Wirtsspektrum erweitert werden. Werden die Vektoren beispielsweise mit dem Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) pseudotypisiert, können die Partikel durch Ultrazentrifugation effizient aufkonzentriert werden, da das Hüllprotein sehr stabil ist. Der Zelleintritt wird durch einen ubiquitären Rezeptor vermittelt (Burns *et al.*, 1993; Sanders *et al.*, 2002), wodurch das Zielzellspektrum stark erweitert ist. Viele Glykoproteine anderer Viren interagieren mit Rezeptoren eines bestimmten Zelltyps, wodurch eine Zell-spezifische Transgenexpression erzielt werden kann. So wurden HIV-1-abgeleitete Vektoren erfolgreich mit dem Hüllprotein von Filoviren pseudotypisiert, was eine Transduktion von Lungenzellen und Myozyten ermöglicht (Kobinger *et al.*, 2001). Hepatozyten können mit HIV-1-Vektoren transduziert werden, wenn die Partikel mit dem Hüllprotein des Sendavirus pseudotypisiert werden (Kowolik *et al.*, 2002).

In Abb. 1.4 ist die Herstellung lentiviraler Vektoren mittels transienter Transfektion schematisch dargestellt. Eine geeignete Verpackungszelle wird mit den verschiedenen Plasmiden, die zur Generierung der viralen Vektoren essentiell sind, transfiziert. Die Plasmide kodieren für die viralen Proteine, Gag und Pol, das Hüllprotein und die virale RNA

des Transfervektors, die in der Produzentenlinie exprimiert werden. Die gebildeten viralen Partikel werden von den transfizierten Zellen in das Kulturmedium abgegeben. Der Überstand, welcher die Vektoren enthält, kann gegebenenfalls durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und anschließend für die Transduktion von Zielzellen eingesetzt werden. Da nur der Transfektor ein Verpackungssignal trägt, wird nur diese RNA in die entstehenden Vektoren verpackt und in die Zielzelle übertragen.

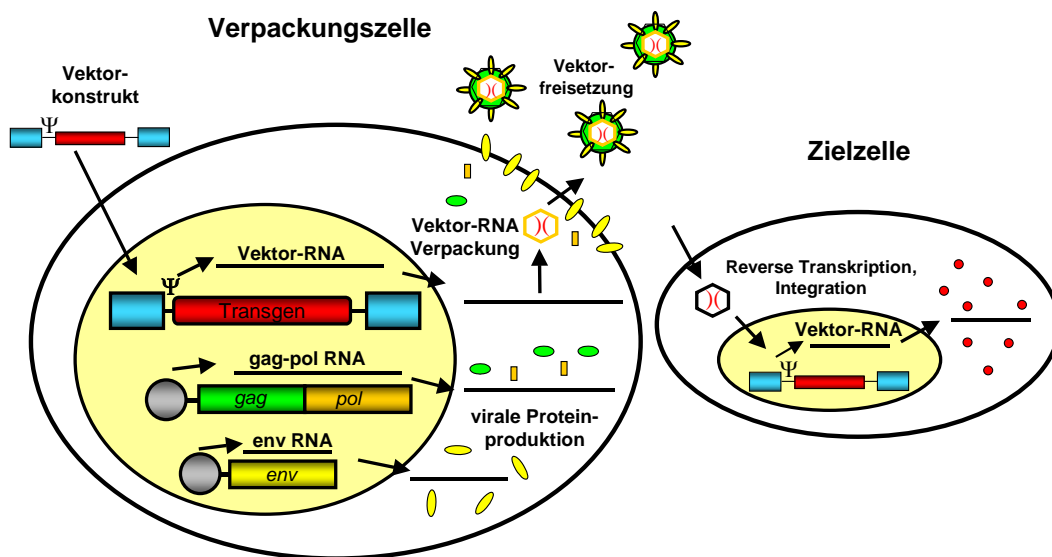


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Generierung viraler Vektoren. Eine Verpackungszelle wird mit den Vektorplasmiden transfiziert. Die Zelle produziert die viralen Vektoren, welche sich im Zellüberstand befinden. Die Vektoren können für die Transduktion von Zielzellen eingesetzt werden. Modifiziert nach Buchschacher *et al.*, 2000.

Die in den Vektoren vorhandene Reverse Transkriptase bzw. Integrase vermitteln die reverse Transkription und den Einbau des Fremdgens in das Wirtsgenom. Anschließend wird das Transgen in der Zielzelle exprimiert.

Lentivirale Vektoren, welche von dem simianen Immundefizienzvirus SIV_{smm}PBj abgeleitet sind, besitzen besondere Eigenschaften und werden im Folgenden näher beschrieben.

1.2.2 Das simiane Immundefizienzvirus SIV_{simm}PBj und davon abgeleitete Vektoren

Das simiane Immundefizienzvirus SIV_{simm}PBj14 wurde aus PBMCs eines Schweinsaffen (PBj) isoliert, welcher 14 Monate zuvor mit dem apathogenen Virus SIV_{simm}9 infiziert wurde (Fultz *et al.*, 1989). Werden Schweinsaffen (*macaca nemestrina*) mit diesem Isolat infiziert, entwickeln ca. 80-90% aller Tiere innerhalb von 3-7 Tagen akute Krankheiten (z. B. blutige Diarrhö) und sterben nach 8 Tagen bis 2 Monaten (Hirsch *et al.*, 2000; Dewhurst *et al.*, 1990). Die starke Pathogenität des Virus scheint jedoch teilweise speziesspezifisch zu sein. Werden Rhesusaffen (*macaca mulatta*) mit SIV_{simm}PBj14 infiziert, liegt die Sterblichkeitsrate bei 30-50% (Lewis *et al.*, 1992), bei Schopfmangaben (*cercocebus torquatus atys*) beträgt sie ca. 75% (Fultz *et al.*, 1994). Auch *in vitro* zeigt das Virus höchst ungewöhnliche Eigenschaften für ein Lentivirus: Im Vergleich mit dem parental Virus SIV_{simm}9 repliziert das SIV_{simm}PBj-Virus sehr effizient auf humanen PBMCs (Fultz P, *et al.*, 1989). Das SIV_{simm}PBj-Virus repliziert auch im Unterschied zu anderen SIV-Isolaten auf Schimpansen-PBMCs und kann unstimulierte Schweinsaffen-PBMCs infizieren und auf ihnen replizieren (Fultz, 1991). Fultz *et al.* konnten zeigen, dass das parentale Virus SIV_{simm}9 durch Serum des PBj-Makaken neutralisiert wird, SIV_{simm}PBj14 jedoch nicht (Fultz *et al.*, 1989). Aufgrund dessen könnte das Virus durch Immunselektion generiert worden sein. Um die Pathogenitätsdeterminanten dieses Virus zu finden, wurde das Genom mit dem des Parentalvirus verglichen. Insgesamt konnten 57 Punktmutationen gefunden werden, welche Änderungen in 36 Aminosäuren bewirkten (Novembre *et al.*, 1993). Dabei konnte eine Insertion von 22bp in der Enhancerregion der LTR detektiert werden, welche eine 2. Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B beinhaltet. 5 zusätzlich inserierte Aminosäuren wurden im Hüllprotein gefunden (Courgnaud *et al.*, 1992). Dies wäre eine mögliche Ursache für das erweiterte Wirtsspektrum. Eine mögliche Pathogenitätsdeterminante könnte das *nef*-Gen sein. Wird *in vitro* eine Mutation in dieses *nef*-Gen eingefügt, bewirkt diese eine verminderte Replikationsfähigkeit in unstimulierten PBMCs und *in vivo* können mit dem resultierenden Virus Schweinsaffen zwar infiziert werden, es brechen jedoch keine – für das Parentalvirus SIV_{simm}PBj14 charakteristische – akute Krankheiten aus (Novembre *et al.*, 1996).

Das Genom von SIV_{simm}PBj14 wurde mittels PCR als 3'- und 5'-Hälfte amplifiziert und aus den enthaltenen Hälften drei infektiöse SIV_{simm}PBj-Molekularklone generiert, u.a. SIV_{simm}PBj1.9 (Dewhurst *et al.*, 1990). Dewhurst *et al.* zeigten, dass dieser Molekularklon *in vitro* die gleichen, für ein Lentivirus ungewöhnliche Eigenschaften wie das Virus SIV_{simm}PBj14 besitzt.

Die einzigartigen Replikationsfähigkeiten des Molekularklons SIV_{simm}PBj1.9 warf die Frage auf, ob auch davon abgeleitete Vektoren besondere Eigenschaften besitzen. Aufgrund

dessen wurde zunächst ein einfaches, replikationsdefizientes Vektorsystem generiert, in welchem das virale *env*-Gen deletiert und anstelle eines therapeutischen Gens eine CMV-EGFP-Expressionskassette inseriert wurde. Dieser mit VSV-G pseudotypisierte Vektor [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)] konnte im Gegensatz zu HIV-1-abgeleiteten Vektoren in der G0-Phase des Zellzyklus arretierte Osteosarkomzellen und diploide Fibroblasten (Alpha-1) transduzieren. Auch kann der SIV_{smm}PBj-Vektor sehr effizient humane primäre Monozyten transduzieren, während HIV-1-Vektoren diese Fähigkeit nicht besitzen (Mühlebach *et al.*, 2005). Werden alle akzessorischen Gene ausgeknockt, ist der SIV_{smm}PBj-Vektor nicht mehr in der Lage, Monozyten zu transduzieren. Diese Eigenschaft des SIV_{smm}PBj-Vektors ist abhängig von der Anwesenheit des akzessorischen Proteins Vpx. Wird es *in trans* bereit gestellt, kann der 4xko-Vektor mit der gleichen Effizienz Monozyten transduzieren wie der Vektor [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)], welcher alle vier akzessorischen Gene besitzt. Die Transduktionsfähigkeit des SIV_{smm}PBj-Vektors auf in der G0-Phase-arretierten Alpha-1-Zellen ist jedoch unabhängig von der Anwesenheit der akzessorischen Gene (Wolfrum *et al.*, 2007).

1.3 Mögliche Zielzellen für den Gentransfer mit SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektoren

Die effiziente Transduktion verschiedener Zellpopulationen mit lentiviralen Vektoren wurde bereits vielfach beschrieben. Hierbei ist der Gentransfer in primäre Zellen von besonderem Interesse. Sollen primäre Zellen zu therapeutischen Zwecken transduziert werden, ist es oft das Ziel, die Zellen nicht zu stimulieren, da diese so wichtige Eigenschaften verlieren könnten. Werden beispielsweise Stammzellen mit Zytokinen stimuliert, können sie ihre pluripotenten Eigenschaften verlieren, sowie ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Auf unstimulierten Zellen ist die Transduktionseffizienz von mit VSV-G-pseudotypisierten HIV-1-abgeleiteten Vektoren jedoch oft sehr gering. Beispielsweise können ruhende B- und T-Zellen nicht transduziert werden, erst durch eine Transition der T-Zellen von der G0- bzw. G1a-Phase in die G1b-Phase kann eine erhöhte Transduktionseffizienz erzielt werden (Korin *et al.*, 1999; Unutmaz *et al.*, 1999; Salmon *et al.*, 2000; Bovia *et al.*, 2003). Kürzlich konnte Frecha *et al.* (2008) jedoch zeigen, dass unstimulierte, naive T-Zellen transduziert werden können, indem ein HIV-1-Vektor mit den Glykoproteinen des Masernvirus pseudotypisiert wurde. Darüber hinaus sind auch primäre Zellen wie Monozyten, sowie daraus differenzierte dendritische Zellen und Makrophagen sind nicht permissiv für HIV-1-Vektoren. Nur bei hohen MOIs (multiplicity of infection) können diese Zellen transduziert werden. Für gentherapeutische Anwendung besonders interessante Zielzellen sind in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.3.1 Hämatopoetische Stammzellen

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSCs) sind für die konstante Erneuerung aller Blutzellen verantwortlich. Die meisten reifen Blutzellen haben nur eine kurze Lebensdauer, pro Tag werden ca. 1×10^{12} Zellen umgesetzt (Ogawa *et al.*, 1993). Dieser Zellerneuerungsprozess wird Hämatopoese genannt und ist ein stark regulierter Prozess von Zellproliferation und –differenzierung, welcher in terminal differenzierte Blutzelltypen endet, wobei sich die HSCs selbst regenerieren können (Abb. 1.5). Die meisten HSCs befinden sich im Knochenmark (1-3% der Knochenmarkzellen), eine geringe Anzahl befindet sich auch im Blut (0,1% der PBMCs) (Bender *et al.*, 1991; Orlic *et al.*, 1994).

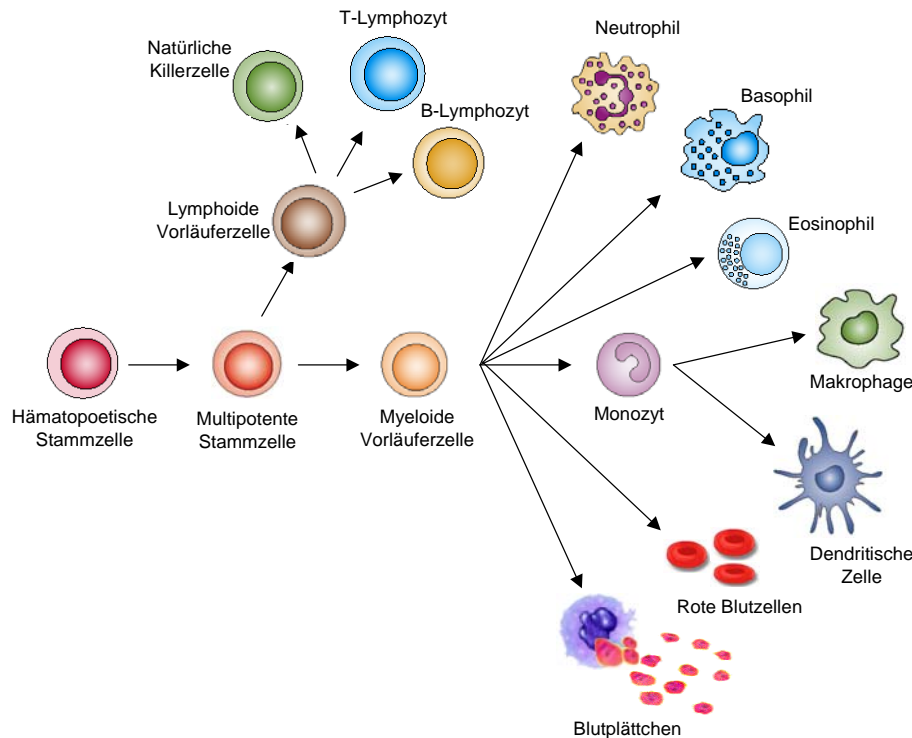


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Hämatopoese. Gezeigt ist die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in die verschiedenen Zellen des Blutes. Modifiziert nach Winslow *et al.*, 2001.

Stammzellen sind langlebig und haben ein großes Repopulierungspotenzial. Neben der Differenzierung in die vielen verschiedenen spezialisierten Zelltypen des Blutes konnte gezeigt werden, dass HSCs auch zu Hepatozyten differenzieren können (Lagasse *et al.*, 2000). Aufgrund dessen haben sie theoretisch das Potenzial, nach Gentransfer Defekte in den hämatopoetischen Linien und auch in nicht-hämatopoetischen Zellen zu kurieren. In Frage kommen dabei eine Reihe von genetischen, malignen oder infektiösen Krankheiten,

z.B. SCID (severe combined immunodeficiency), chronische Granulomatose (CGD), Beta-Thalassämien oder HIV-1-Infektionen. Dabei könnten die Gendefekte in HSCs nicht nur korrigiert werden, sondern man könnte Zellen mit verbesserten Eigenschaften herstellen, z.B. Lymphozyten mit Resistenz gegen Infektionen wie HIV-1, oder die Expression von Tumor-assoziierten Antigen (TAAs) oder Zytokinen in dendritischen Zellen um Immunantworten gegen Tumore hervorzurufen.

Hämatopoetische Stammzellen sind auch wegen der einfachen Gewinnung und der etablierten Transplantationsmethoden im Patienten attraktive Zielzellen. Sie können aus Blut oder aus Knochenmark über den Stammzellmarker CD34 durch Positivisolierung gewonnen werden (Krause *et al.*, 1994).

Die meisten gentherapeutischen Studien mit HSCs wurden mit γ -retroviralen Vektoren durchgeführt. Da HSCs jedoch ruhende Zellen sind, ist die Transduktionseffizienz mit diesen Vektoren sehr gering. Aufgrund dessen war für eine effiziente Transduktion eine Stimulierung der Zellen notwendig. Lentivirale Vektoren bieten den Vorteil auch ruhende Zellen transduzieren zu können. Dadurch ist nur eine minimale Stimulierung notwendig, es wird keine Differenzierung induziert und der Stammzellphänotyp wird erhalten. Akkina *et al.* haben 1996 zum ersten mal HSC mit einem HIV-1-Vektor transduziert, und Miyoshi *et al.* (1998) konnten mit transduzierten HSCs erfolgreich NOD/SCID-Mäuse repopulieren (Woods *et al.*, 2000). Verhoeyen *et al.* (2005) konnten sehr effizient vollkommen unstimulierte CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor transduzieren. Sie erreichten dies, indem sie früh-wirkende Zytokine (Thrombopoietin, Stammzellfaktor) an das Env Protein fusionierten.

Da es sich jedoch in der Literatur abzeichnet, dass die CD34⁺ Stammzellen eine relativ heterogene Population zu sein scheint, sind weitere Marker zur genaueren Charakterisierung notwendig. Ein solcher Marker könnte z.B. der Aktivierungsmarker CD38 darstellen. Bhatia *et al.* (1997) konnten zeigen, dass mit einer CD34⁺CD38⁻-Population NOD/SCID-Mäuse sehr effizient repopuliert und auch mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor transduziert werden (Case *et al.*, 1999; Guenechea *et al.*, 2000) können.

Es ist jedoch umstritten, ob CD34 bereits ein Aktivierungsmarker ist und ob CD34⁺-Zellen das Potenzial einer Stammzelle besitzen (Morel *et al.*, 1998). Es scheint, dass CD34⁻-Zellen die Vorläuferzellen von CD34⁺-Zellen sind (Nakamura *et al.*, 1999). In Mausversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass ein kleiner Teil muriner CD34⁺ hämatopoetischer Stammzellen nach Transplantation in einen CD34⁻-Phänotyp zurückkehren können (Sato *et al.*, 1999). Dao *et al.* (2003) konnten die Reversibilität der CD34-Expression auf humanen hämatopoetischen Stammzellen nach Transplantation in NOD/SCID-Mäuse bestätigen.

Durch diesen Nachweis stehen die Daten nicht im Widerspruch zu bisherigen Publikationen, in denen gezeigt werden konnten, dass CD34⁺-Zellen die Fähigkeit besitzen eine Langzeithämatopoese durchführen können (Osawa *et al.*, 1996).

1.3.2 Makrophagen

Die Vorläuferzellen von Makrophagen sind Monozyten. Monozyten differenzieren aus hämatopoetischen Stammzellen und zirkulieren für ca. 12-24 Stunden im Blut. Anschließend treten sie in Gewebe ein und differenzieren entweder zu Makrophagen oder zu dendritischen Zellen. Makrophagen sind Phagozyten, welche in vielen Körpergeweben vorkommen und bei der angeborenen Immunität eine entscheidende Rolle spielen (Janeway *et al.*, 2001). Die Hauptaufgabe dieser Zellen besteht in der Aufnahme von toten Zellen und Pathogenen. Dabei können sie Erreger ohne Unterstützung der adaptiven Immunantwort beseitigen. Phagozytieren Makrophagen Pathogene werden sie aktiviert, u.a. geschieht dies durch die Bindung von LPS an den Rezeptor CD14. Die Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine, welche weitere neutrophile Zellen anlocken. Können Makrophagen aufgenommene Erreger nicht eliminieren, wird über sie die erworbene Immunantwort aktiviert (Janeway *et al.*, 2001). Diese phagozytotischen Zellen können Antigene der Pathogene auf MHC Klasse II Molekülen präsentieren. Durch die Aktivierung der Makrophagen durch Pathogene werden vermehrt MHC Moleküle gebildet, aber auch co-stimulatorische Moleküle wie CD86 und CD80 werden exprimiert. Dadurch können T-Zellen stimuliert werden, welche wiederum die Infektion bekämpfen können. Makrophagen können auch die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen induzieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass mit Hilfe von Makrophagen eine anti-Tumorantwort induziert werden kann (Mehortra *et al.*, 2006). In dieser Studie wurden Makrophagen mit Peptiden des Tumor-assoziierten Antigen (TAA) Mart-1, welches von Melanomzellen exprimiert wird, beladen. Diese Zellen konnten effizient CD8⁺-T-Zellen gegen das TAA primen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die resultierenden zytotoxischen T-Zellen (CTLs) Melanomzellen erkennen und lysieren können (Mehortra *et al.*, 2006).

1.3.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) wurden 1973 zum ersten Mal von Steinman und Cohn beschrieben (Steinman *et al.*, 1973). Sie sind die „Schaltzentrale“ im Immunsystem. Sie kontrollieren sowohl die adaptive, als auch die erworbene Immunantwort, da sie mit allen Zellen des Immunsystems in Wechselwirkung treten können (Banchereau *et al.*, 2000). Sie sind die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen (APC). DCs sind eine sehr heterogene Leukozytenpopulation (Abb. 1.6). Sie unterscheiden sich in ihren Vorläuferzellen, ihrer anatomischen Lokalisation, ihrer Funktion und der Art der Immunantwort (Banchereau *et al.*, 2000).

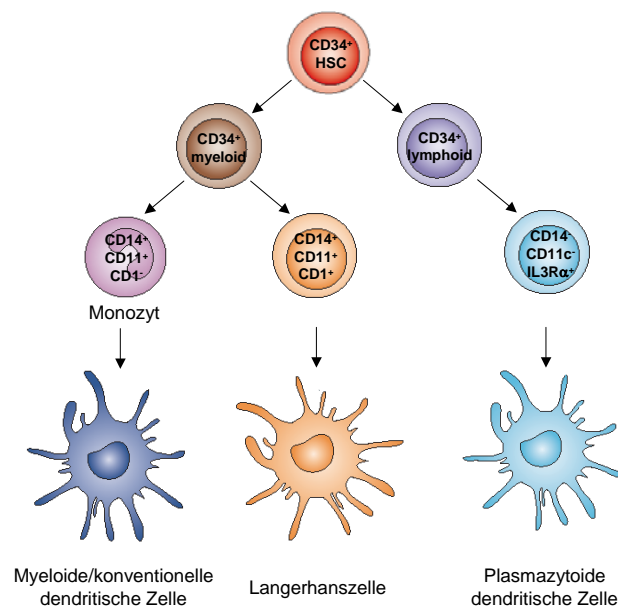


Abb.1.6: Verschiedene DC-Typen. Aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC) differenzieren myeloide und lymphoide Vorläuferzellen. Aus diesen Zellen differenzieren über weitere Vorläuferzellen myeloide bzw. konventionelle DCs, Langerhanszellen und plasmazytoide DCs. Modifiziert nach Banchereau *et al.*, 2000.

Die Vorläuferzellen myeloider DCs sind hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark. Aus ihnen differenzieren Monozyten, welche zu unreifen DCs (imDCs) werden und vom Blut in die Gewebe wandern und dort verbleiben. Sie verhalten sich phagozytisch als auch makropinozytisch und nehmen große Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit, sowie Pathogene oder sterbende Zellen auf (Sallusto *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 1998; Inaba *et al.*, 1993). DCs sind darauf spezialisiert Antigene aufzunehmen und Lymphozyten zur Erkennung zu präsentieren.

Erhalten die Zellen ein sogenanntes „Danger-Signal“ (z.B. durch LPS, Zytokine oder sterbende Zellen) werden sie aktiviert. Sie wandern über die Lymphflüssigkeit zu den regionalen Lymphknoten (Liu *et al.*, 2005). Dort angekommen, sind die unreifen DCs maturiert und stellt nun eine sehr effektive antigenpräsentierenden Zelle (APC) dar. Reife DCs haben die Fähigkeit verloren, neue Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Im Gegensatz dazu synthetisieren sie vermehrt MHC Moleküle, exprimieren große Mengen Adhäsionsmoleküle, sowie die co-stimulatorischen Rezeptoren CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) (Abb. 1.7 A) (Zhou *et al.*, 1996; Caux *et al.*, 1994). Diese Rezeptoren sind besonders wichtig, da durch ihre Bindung naive T-Zellen aktiviert werden können (Abb. 1.7 B).

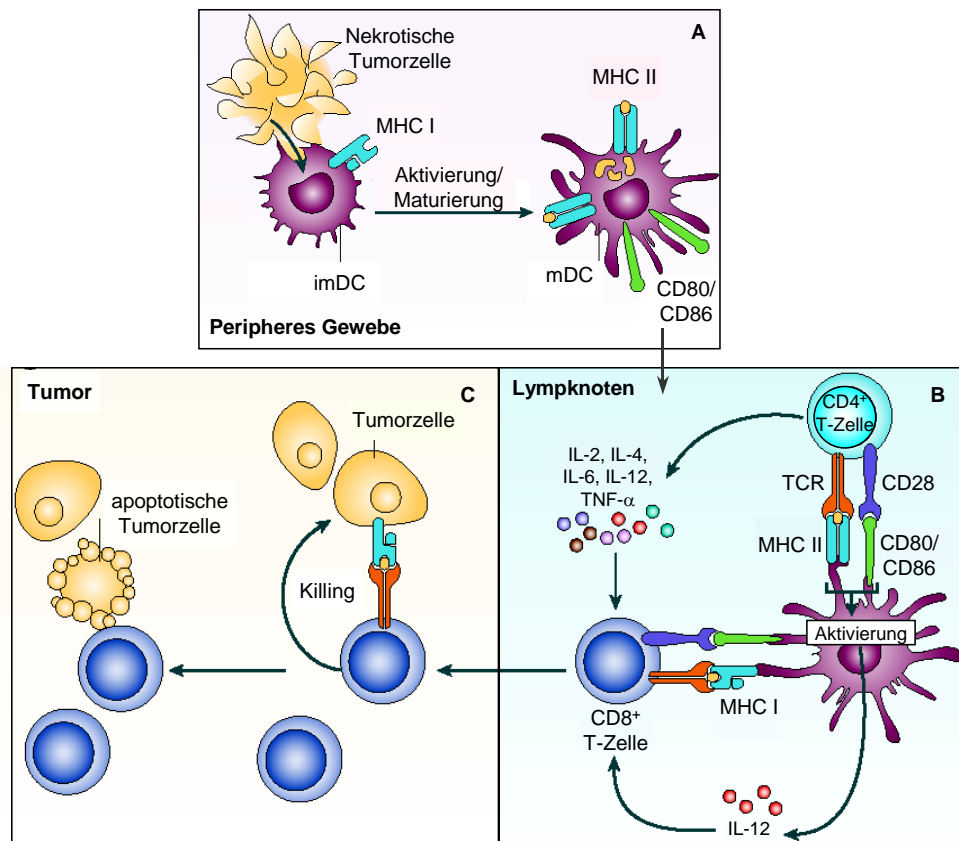


Abb. 1.7: Die Rolle von dendritischen Zellen in der Antitumor-Immunität. Unreife DCs (imDCs) nehmen im peripheren Gewebe nekrotische Tumorzellen auf. Dadurch werden sie aktiviert und maturieren zu reifen DCs (mDCs) (A). In Lymphknoten präsentieren sie Tumorantigene auf MHC-Molekülen Klasse I und II und exprimieren die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. mDCs können dadurch CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aktivieren (B), so dass diese Zellen Tumorzellen erkennen und lysieren können (C). Modifiziert nach Gabrilovich, 2004.

Das erste Zusammentreffen von T-Zellen mit Antigenen auf der Oberfläche einer DC wird oft als Priming bezeichnet. Stammt das Antigen beispielsweise von einer Tumorzelle, erkennt die aktivierte T-Zelle den Tumor und kann ihn zerstören (Abb.1.7 C).

Ein Marker für reife DCs ist CD83 (Freudenthal *et al.*, 1990). Die Funktion dieses Rezeptors ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Aerts-Toegaert *et al.* (2007) konnten jedoch zeigen, dass durch Herabregulierung des Rezeptors die Kapazität der DCs verringert wird, funktionelle Tumorantigen-spezifische CD8⁺-T-Zellen primen zu können. Auch werden auf reifen DCs neue Dendriten gebildet, wodurch die Oberfläche vergrößert wird, um mehr Antigene präsentieren zu können (Mellman *et al.*, 2001). Die Epitope der Antigene, welche zuvor von den unreifen DCs (imDCs) aufgenommen wurden, werden nun auf den MHC-Molekülen Klasse I und II präsentiert. Auch sezernieren aktivierte DCs Zytokine, welche sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort beeinflussen können. So synthetisieren sie große Mengen an IL-12. Dieses Zytokin aktiviert CD8⁺-T-Zellen und natürliche Killerzellen (NKZ) und initiiert die Differenzierung von CD4-T-Helferzellen zu Th1-Zellen, welche wiederum IFN- γ sezernieren und Makrophagen aktivieren können. Reife DCs produzieren auch IL-4, welches die Differenzierung von CD4-Zellen zu Th2-Zellen unterstützt. Diese Zellen sezernieren neben IL-4 auch IL-5, dadurch werden wiederum Eosinophile und B-Zellen aktiviert. Reife DCs setzen auch Chemokine frei, um T- und B-Zellen anzulocken (Adema *et al.*, 1997; Castellino *et al.*, 2006) und um die Viabilität von zirkulierenden T-Lymphozyten zu erhalten (Brocker *et al.*, 1997).

1.3.3.1 Immuntherapie mit dendritischen Zellen

Die Immuntherapie mit dendritischen Zellen ist eine mögliche Methode, um eine Immunantwort gegen Tumore auszulösen (Banchereau *et al.*, 2005). Viele Tumorzellen exprimieren immunsuppressive Faktoren, welche die DC-Differenzierung, -Maturierung und -Funktion beeinflussen, wie beispielsweise M-CSF, IL-6, IL-10 oder TGF- β (Gabrilovich, 2004).

Diese immunsupprimierten DCs exprimieren kein CD80 und kein CD86 und besitzen deshalb keine T-Zell stimulatorische Aktivität (Chaux *et al.*, 1996). Präsentieren diese unreifen DCs T-Zellen Antigene (z.B. TAAs), induzieren sie Toleranz gegenüber den Antigenen, welche sie tragen, dadurch greifen die T-Zellen die Tumorzellen nicht an (Steinman *et al.*, 2003; Steinman *et al.*, 2007) (Abb. 1.8). Des Weiteren sind viele TAAs nur schwach immunogen, dadurch wird keine Immunantwort ausgelöst (Rosenberg *et al.*, 2001).

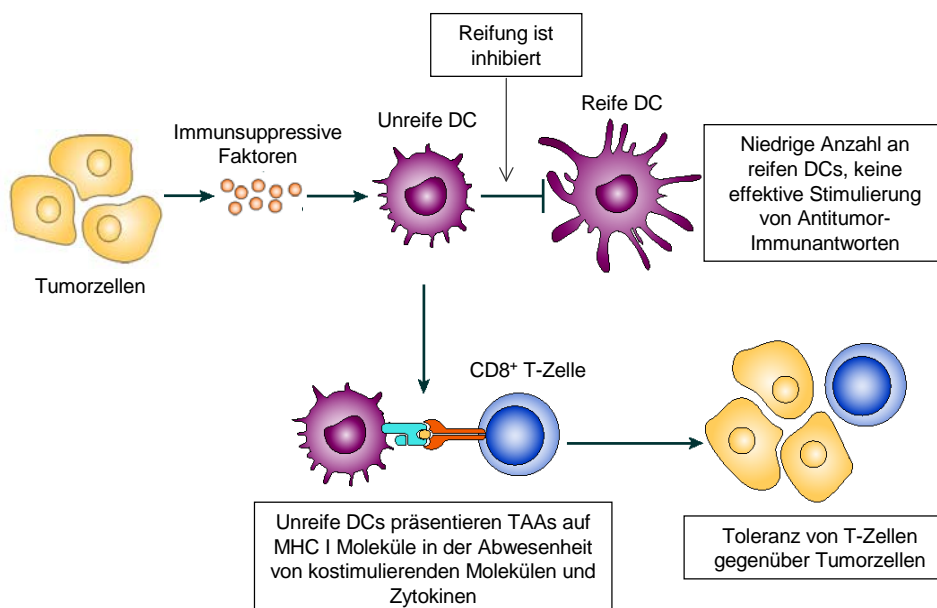


Abb. 1.8: Beeinflussung der DC-Differenzierung durch immunsuppressive Faktoren.

Tumorzellen können immunsuppressive Faktoren sezernieren, welche die Maturierung von unreifen DCs (imDCs) inhibieren. Präsentieren imDCs Tumorantigene (TAA) CD8⁺-T-Zellen, wird Toleranz gegenüber den präsentierten Antigenen induziert und die Tumorzellen werden nicht angegriffen. Modifiziert nach Gabrilovich, 2004.

Eine Möglichkeit um eine Immunantwort gegen Tumore auszulösen besteht darin, dendritische Zellen mit Tumorantigenen zu beladen, um so T-Zellen gegen dieses Antigen zu primen. So können mit Antigenen *ex vivo* beladene DCs in Mäusen eine protektive Immunität gegen Infektionen (Ludewig *et al.*, 1998) und gegen Tumore hervorrufen (Mayordomo *et al.*, 1995). Eine Möglichkeit um Antigene durch dendritische Zellen präsentieren zu lassen, ist das Einbringen von TAAs mit Hilfe von lentiviralen Vektoren. Dies hat den Vorteil, dass das Antigen in der Zelle selbst exprimiert wird und so dauerhaft präsentiert werden kann. Da die transduzierten DCs das Antigen in verschiedene Peptidfragmente spalten, werden auch verschiedene Epitope des Antigens präsentiert. Dadurch wird die Möglichkeit erhöht, eine T-Zelle mit einem spezifischen (T-Zellrezeptor) TCR zu finden. Des weiteren induzieren mit adenoviralen Vektoren transduzierte DCs eine stärkere Immunantwort als mit Peptiden beladene DCs (Nakamura *et al.*, 2005). Durch die Identifizierung einer großen Anzahl von Antigenen, welche von den verschiedenen Tumortypen exprimiert werden, stehen diese TAAs für eine Klonierung in Vektoren zur Verfügung (Boom *et al.*, 1996). Besonders gut untersucht sind die TAAs von Melanomzellen.

Um eine funktionelle Antitumorreaktivität hervorzurufen, sind mehrere Signale nötig: (1) Die Antigene, welche von DCs auf den MHC-Molekülen präsentiert werden, müssen durch die T-

Zellen erkannt werden. (2) Die T-Zellen müssen durch die Co-Rezeptoren CD80 und CD86 ein stimulatorisches Signal erhalten. (3) Ein inflammatorisches Umfeld ist notwendig. Dieses wird durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems gebildet, wie beispielsweise durch Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) in DCs (Iwasaki *et al.*, 2004). Um Tumorspezifische CTLs zu aktivieren, muss ein andauerndes TLR-Signaling zusammen mit der TAA-Präsentation stattfinden (Yang *et al.*, 2004). Obwohl in lentiviralen Vektoren die meisten viralen Gene deletiert worden sind, können sie immer noch das angeborene Immunsystem aktivieren, da dsRNA als Zwischenprodukt während der reversen Transkription entsteht. Diese kann durch TLRs erkannt werden. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass lentivirale Vektoren effizient Antitumor-Antworten induzieren konnten. Dullaers *et al.* (2006) immunisierten Mäuse mit OVA-(Ovalbumin)-transduzierten DCs. Diese Mäuse waren daraufhin befähigt autologe, mit OVA-Peptid-gepulste Nierenzellen *in vivo* zu eliminieren. In einem anderen Mausversuch war die resultierende CTL-Antwort nach Immunisierung mit einem lentiviralen Vektor auch schützend gegen einen nachfolgenden Challenge mit einer letalen Dosis von OVA-exprimierenden B16 Melanomzellen. Ebenso konnte das Wachstum von bereits existierenden Tumoren verlangsamt werden (He *et al.*, 2005).

Für den Einsatz von lentiviralen Vektoren in der Tumorthherapie gibt es zwei Möglichkeiten. Die DCs können *ex vivo* transduziert werden oder die lentiviralen Vektoren können direkt appliziert werden. Es konnte in Mausversuchen gezeigt werden, dass die direkte Applikation der Partikel eine stärkere Immunantwort hervorrufen kann, als die *ex vivo* transduzierten und reinjizierten DCs. Sowohl die Stärke und die Langlebigkeit, als auch die Anzahl der IFN- γ -produzierenden CTLs und deren lytische Kapazität sind bei der Applikation der lentiviralen Vektoren signifikant höher (Dullaers *et al.*, 2006).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Lentivirale Vektoren sind für den Einsatz für gentherapeutische Anwendungen besonders geeignet, da sie ein therapeutisches Gen auch in die DNA von nicht-mitotischen Zellen integrieren können. Allerdings sind ruhende primäre Zellen nur mit geringer Effizienz transduzierbar. In der Arbeitsgruppe konnte jedoch ein vom SIV_{smm}PBj-abgeleiteter Vektor entwickelt werden, der im Gegensatz zu den häufig verwendeten HIV-1-abgeleiteten lentiviralen Vektoren in der G0-Phase des Zellzyklus arretierte Zelllinien und auch primäre humane Monozyten effizient transduzieren kann.

In dieser Arbeit sollte das Potenzial dieses neuen Vektors für die Transduktion weiterer primärer Zellen untersucht werden. Dabei wurden Zellen ausgewählt, welche als Zielzellen für gentherapeutische Anwendungen in Frage kommen, insbesondere humane B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und hämatopoetische Stammzellen. Dendritische Zellen sind attraktiv für eine Immuntherapie, da sie die Schaltzentrale des Immunsystems sind und mit allen Immunzellen interagieren können. Da Stammzellen für eine Gentherapie besonders interessant sind, sollte nicht nur die reine Transduktionseffizienz, sondern auch der Einfluss der Transduktion auf deren Differenzierungspotenzial genauer untersucht werden.

Weiterhin sollte der SIV_{smm}PBj-Vektor auch in einem ersten Ansatz auf seine mögliche Eignung für eine Gentherapie untersucht werden. Da Monozyten die Vorläufer von dendritischen Zellen und Makrophagen sind, welche effektive Antigen-präsentierende Zellen darstellen, sollte der Vektor in einer Strategie zur Immuntherapie von Krebs erprobt werden. Als therapeutisches Gen kam das Tumorantigen Mart-1 in Frage, welches von vielen Melanomzellen exprimiert wird. Diese Untersuchung sollte in *in vitro*-Studien mit humanen Zellen durchgeführt werden.

Um eine mögliche Anwendung des SIV_{smm}PBj-Vektors *in vivo* untersuchen zu können, sollte schließlich getestet werden, ob die Maus oder nicht-menschliche Primaten als Tiermodelle in Frage kommen. Daher wurde geprüft, ob der bisher bekannte Vorteil der Fähigkeit zur Monozytentransduktion auch in diesen Spezies nachzuweisen ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle
2-Log Ladder	NEB
Agar Agar	Merck
Agarose	Biozym, Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's)	Promega
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll Histopaque	Sigma
Fötale Kälberserum (FCS)	Seromed/Biochrom
Giemsa-Lösung	Roth
Glycerin	Calbiochem, Merck
GM-CSF EASIA	Biosource
May-Grünwald-Lösung	Roth
Mercaptoethanol	Sigma
M-Lyse-Puffer	R&D Systems
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck
Saccharose	Merck
Saponin	Sigma
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma

2.1.2 Lösungen

Tabelle 2.2: Verwendete Lösungen

Medien, Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
6x DNA-Probenpuffer	Glycerin 33% (v/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v)
FACS-Waschpuffer	NaN ₃ 0,1% (w/v) FCS 1% (v/v) in PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
FACS-Fixierlösung	Paraformaldehyd 1% (w/v) in PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
MACS-Waschpuffer	BSA 2% (w/v) EDTA 2 mM in PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
TAE, pH 7,5	Tris-Acetat 40 mM

	EDTA 1 mM
Perm-Lösung	Saponin 0,1% FCS 1% NaN ₃ 1% in PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
Wasch-Lösung	FCS 2% in RPMI 1640
Fix-Lösung	Paraformaldehyd 4% in PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
Saccharose-Lösung	Saccharose 20% (w/v) in PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)

2.1.3 Antibiotika

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O/EtOH 1:1	Boehringer Mannheim
Kanamycin	50 µg/ml	10 mg/ml in H ₂ O	Boehringer Mannheim
Penicillin	100 Einheiten/ml	2,5 × 10 ⁵ Einheiten/ml	Serva
Streptomycin	50 µg/ml	12,5 mg/ml	Serva

2.1.4 Plasmide

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Charakterisierung	Bezugsquelle / Literatur
<i>Hüllprotein-Expressionsplasmide:</i>		
PMD.G	VSV-G; HCMV-IEP; human beta globin IVS 2 und polyA; Amp ^r ;	Blömer U (Kiel)/ Ory D, <i>et al.</i> [1996]
<i>Expressionsplasmide:</i>		
pcVpx	CMV-Prom; SV40pA; SIVPBjvpxORF; Amp ^R ; f1 ori; SV40 ori	Wolfrum, N. (PEI)
pEGFP-N1	CMV-Prom; EGFP; SV40 pA; f1 ori; SV40 ori; Kan ^r /Neo ^r ; HSVtkpA; pUC ori	Clontech
pMart-N1	Basiert auf pEGFP-N1, das <i>mart</i> -Gen ist an Stelle des <i>egfp</i> -Gens inseriert	Diese Arbeit
Piraup969A0266D6	<i>mart-1</i> -Gen aus humanem Hautmelanom, kloniert in Vektor pOTB7	RZPD
<i>Env-deletierte Proviren mit Markergen (egfp):</i>		
pPBjΔE-4xko	<i>Vif-vpx</i> -, <i>vpr</i> - und <i>nef</i> -deletierte Version des pPBjΔ <i>env</i> -Klons	Wolfrum, N. (PEI)
pPBjΔE-EGFP7	pPBjΔ <i>env</i> mit CMV- <i>egfp</i> -Kassette aus pEGFP-N1 hinter RRE kloniert	Mühlebach, M. (PEI)

PNL4-3ΔE-EGFP4	pNL4-3Δenv mit CMV- <i>egfp</i> -Kassette aus pEGFP-N1 hinter RRE kloniert	Mühlebach, M. (PEI)
pPBj-4xko-EGFP	<i>Vif-vpx</i> -, <i>vpr</i> - und <i>nef</i> -deletierte Version des pPBjΔenv-Klons; <i>egfp</i> -Gen im deletiertem <i>env</i>	Kaiser, J. (PEI)
pPBj-4xko-Mart	<i>Vif-vpx</i> -, <i>vpr</i> - und <i>nef</i> -deletierte Version des pPBjΔenv-Klons; <i>mart</i> -Gen im deletiertem <i>env</i>	Diese Arbeit
pRODA-ΔEnv-EGFP	pRodAΔenv mit deletiertem <i>nef</i> und inseriertem <i>egfp</i> -Gen	Dittmar; Virologie Heidelberg
<i>Env-deletierte Proviren mit Markergen (mart-1):</i>		
pPBj-4xko-Mart-1	<i>Vif-vpx</i> -, <i>vpr</i> - und <i>nef</i> -deletierte Version des pPBjΔenv-Klons; <i>mart-1</i> -Gen im deletiertem <i>env</i>	Diese Arbeit

2.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 2.5: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> Top 10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> GM2163	F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx78</i> , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> (Str ^R), <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>dam13::Tn9</i> (Cam ^R), <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i> , <i>rfbD1</i>	New England Biolabs
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> DM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ-, <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

2.1.6 Enzyme

Tabelle 2.6: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Puffer	Optimale Aktivitätstemperatur	Bezugsquelle
<i>Afl</i> III	NEB 3	37°C	New England Biolabs
<i>BsaB</i> I	NEB 2	60°C	New England Biolabs
<i>BsrG</i> I	NEB 2 + BSA	37°C	New England Biolabs
<i>EcoR</i> I	EcoRI Puffer	37°C	New England Biolabs
<i>Kas</i> I	NEB 2 + BSA	37°C	New England Biolabs
<i>Not</i> I	NEB 3 + BSA	37°C	New England Biolabs
<i>SnaB</i> I	NEB 4 + BSA	37°C	New England Biolabs

Tabelle 2.7: Verwendete Enzyme

Enzyme	Puffer	Optimale Aktivitätstemperatur	Bezugsquelle
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	NEB 3	37°C	New England Biolabs
Klenow-Polymerase	EcoPol-Puffer	37°C	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	T4 DNA Ligase- Puffer	25°C	New England Biolabs
Quick Ligase	Quick Ligase Puffer	25°C	New England Biolabs

2.1.7 Kits

Tabelle 2.8: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
B cell negative isolation kit	Dynal
CD8 T cell negative isolation kit	Dynal
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
GM-CSF EASIA	Biosource
Human Cytokine array 1	RayBio
IFN- γ EASIA	Biosource
Jetsorb DNA Gel Extraction Kit / 300	Genomed
Monocyte positiv Isolation Kit	Miltenyi Biotech
Monocyte positive isolation kit – non human	Miltenyi Biotech
Plasmid Midi/Maxi Prep Kit	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen
QIAQuick PCR Purification Kit	Qiagen
TNF- α EASIA	Biosource

2.1.8 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Tabelle 2.9: Verwendete Zytokine und Wachstumsfaktoren

Für Kultivierung von	Zytokin	Hersteller
Dendritischen Zellen	IL-4	CellGro
	GM-CSF	CellGro
	IL-6	CellGro
	IL-1 β	CellGro
	TNF- α	CellGro
	PGE ₂	Sigma
Makrophagen	M-CSF	R&D Systems
B-Lymphozyten	IL-4	R&D Systems
	IL-2	R&D Systems
	IL-10	R&D Systems
	CD40L	R&D Systems
CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	Proleukin S (IL-2)	Novartis
Hämatopoetischen Stammzellen	Flt-3 Ligand	CellSystems
	SCF	CellSystems
	IL-6	CellSystems
	IL-3	CellSystems

2.1.9 Antikörper

Tabelle 2.10: Verwendete Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Markierung	Klon
Human-anti-CD3	DAKO	PE	UCHT1
Human-anti-CD4	BD Pharmingen	PE	RPA-T4
Human-anti-CD8	DAKO	FITC	DK25
Human-anti-CD11c	Acris	FITC	BU15
Human-anti-CD14	DAKO	PE	TÜK4
Human-anti-CD19	DAKO	PE	HD37
Human-anti-CD33	BD Pharmingen	FITC	HIM3-4
Human-anti-CD34	Beckman Coulter	PE	581
Human-anti-CD38	Beckman Coulter	PE-PC5	LS198-4-3
Human-anti-CD69	DAKO	FITC	FN50
Human-anti-CD80	BD Pharmingen	PE	L307.4
Human-anti-CD83	BD Pharmingen	PE	HB15e
Human-anti-CD86	Biologend	PE	IT2.2
Human-anti-CD209	Miltenyi Biotech	FITC	DCN47.5
Human-anti-HLA-A2	Acris	FITC	SM1818F
Human-anti-HLA-A,B,C	BD	FITC	G46-2.6
Human-anti-HLA-DR, -DQ, -DR	DAKO	FITC	CR3143
Human-anti-Mart-1	Abcam	-	M2-7C10
MHC-Mart	DAKO	FITC	-
IgG1 (mouse)	Beckman Coulter	PE	679.1Mc7
IgG1 (mouse)	Beckman Coulter	PE-PC5	679.1Mc7
Mouse-anti- IgG2b	Acris	FITC	SM12F
Mouse-anti-Ly6C	SouthernBiotech	PE	HK1.4
Mouse-anti-11b	BD Pharmingen	PerCP-CY5.5	A95-1
Mouse-anti-IgG1	BD Pharmingen	PE	MOP-21
Mouse-anti-IgG1	BD Pharmingen	FITC	A85-1
Mouse-anti-IgG2a	DAKO	PE	DAK-GO5
Mouse-anti-IgG Fc(ab) ₂	SIGMA	FITC	-
Rat-anti-IgG2b	BD Pharmingen	PerCP-CY5.5	A95-1
Rat-anti-IgG2c	BD Pharmingen	PE	A23-1

2.1.10 Zelllinien

Tabelle 2.11: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zellen	Charakterisierung	Literatur/Bezug
HT1080	Humane Fibrosarcom-Zelllinie	ECACC No 85111505
293 T	abgeleitet von humanen embryonalen Nierenzellen (293) transformiert durch großes T-Antigen von SV 40.	DuBridge, RB <i>et al.</i> [1987]
UKRV-Mel 15a	Humane Melanomzelllinie; Mart ⁺ ; HLA-A2 ⁺	Prof. Schadendorf (DKFZ)
UKRV-Mel 21a	Humane Melanomzelllinie; Mart ⁺ ; HLA-A2 ⁺	Prof. Schadendorf (DKFZ)
Ma-Mel 59a	Humane Melanomzelllinie: Mart ⁺ ; HLA-A2 ⁻	Prof. Schadendorf (DKFZ)
Ma-Mel 91a	Humane Melanomzelllinie; Mart ⁻ ; HLA-A2 ⁺	Prof. Schadendorf (DKFZ)

2.1.11 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.12: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
3cc Spritzen	StemCell Technologies
Beads (anti-sheep)	Dynal
Behandelte Gewebekulturschalen 35mm	StemCell Technologies
Blunt-end Nadeln	StemCell Technologies
Blutentnahmeröhrchen S-Monovette	Sarstedt
CellGro DC Medium	CellGenix
Combitips plus (5, 10ml)	Eppendorf
D-MEM	Biochrom AG
Humanes AB-Serum	Sigma
Luria-Bertani Medium (LB)	Medienküche, Pei
MACS Filter	Miltenyi Biotech
MACS Säulen	Miltenyi Biotech
Minisart Filter (450nm)	Sartoriusstedim
PBS-Dolbecco 1x	Biochrom AG
Puffer (TBS, PBS, Tris-Cl, SSC 20x etc.)	PEI
RPMI	Biochrom AG
S.O.C. Medium	Medienküche, Pei
StemSpan Medium	CellSytems
Stericup (450 nm Filter)	Millipore
Zellkulturasser	Sigma, PAA
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one
Zellkulturplatten	Nunc
Zentrifugenröhrchen (25x89 mm)	Beckman

2.1.12 Geräte

Tabelle 2.13: Geräte

Gerät	Hersteller
Backterienschüttler Innova 4230	New Brunswick Scientific
CO ₂ -Brutschränke (BBD 6220)	Cytoperm, Heraeus
Einfrierbox	Mr. Frosty, Nunc
Einkanalpipetten 0,5-10 µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf AG
Flow Cytometer	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Heizblöcke (Thermomixer)	Eppendorf Ag
Kühlblock	Isosafe, Eppendorf AG
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge	HERAEUS Sepatech
MACS-MultiStand	Miltenyi Biotec
Magnetrührer	Combimag Ret, Janke & Kunkel
Mikroskope	Axiovert 25, Axiolab, Zeiss
Mikrowelle	Sharp
Multiskan RC	Thermo Labsystems
Netzgerät: Model 200/2.0 Power Supply	Biorad
Optima L-70K Ultrazentrifuge mit SW28 (Rotor)	Beckman Coulter
Pipettierhilfe	Pipetboy acu, Integra Biosciences
Sterilbank	Steril Gard III Advance, The Baker Company
Stickstofftank (Apollo Chronos)	Messer
Tiefkühlschränke (-80°C)	New Brunswick Scientific
Tischzentrifuge: Biofuge fresco	Heraeus
Vakuumpumpe	Vacunsafe, IBS Integra Biosciences
Vortexer	Scientific Industries
Waagen	Sartorius LP820
Wasserbad	GFL
Wecker	neoLab 2-2002
Zentrifugen: Minifuge T; J2-21	Heraeus; Beckman

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Flüssigkultur

Zur Kultivierung der verwendeten Bakterienstämme wird LB-Medium unter Zusatz eines zur Selektion bestimmten Antibiotikums eingesetzt. Die Bakterien werden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 - 0,6 bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Eine Kultivierung bei 25°C ist erforderlich, wenn die Plasmide eine bestimmte Größe überschreiten (> 11 kb) oder eine hohe Rekombinationswahrscheinlichkeit besitzen (z.B. Plasmide mit zwei LTR-Regionen).

Nährböden

Zur Kultivierung der Bakterien auf Nährböden wird dem LB-Medium 1,5% (w/v) Agar Agar zugesetzt und aufgekocht. Falls ein Antibiotikum zur Selektion benötigt wird, muss die Lösung vor Zugabe auf 50°C abgekühlt sein. Ca. 30 ml der Lösung werden in eine Petrischale gegossen. Zur Anzucht der Bakterien werden 100µl einer Bakteriensuspension auf dem Agar ausgestrichen und 24 h bei 37°C bzw. 48 h bei 25°C inkubiert.

2.2.1.2 Lagerung von Bakterien

800 µl einer Bakteriensuspension werden mit 200 µl Glycerin vermischt, ca. 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei -80°C gelagert.

Zur erneuten Kultivierung wird mit einer Impföse ein wenig der gefrorenen Bakteriensuspension abgenommen und in ein Flüssigkulturmedium überführt.

2.2.1.3 Transformation von Bakterien

Zur Herstellung der Bakterienstocks werden 100 µl chemisch kompetente Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Die gewünschte Plasmidmenge (50 ng - 1 µg) wird dazu gegeben, vorsichtig vermischt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock im Wasserbad von 42°C für 45 sec. werden die Bakterien sofort wieder auf Eis gekühlt und in 500 µl S.O.C.-Medium aufgenommen. Der Transformationsansatz wird bei 37°C bzw. 25°C (bei Plasmiden <11 kb oder bei Plasmiden, die eine hohe Rekombinationswahrscheinlichkeit aufweisen) für 1,5 h bzw. 3 h geschüttelt. 100µl dieser Suspension werden unverdünnt und 4-fach

konzentriert auf je eine Agarplatte (mit entsprechendem Selektionsantibiotikum) ausgestrichen. Diese Platten werden bei 37°C bzw. 25°C inkubiert bis Kolonien gewachsen sind.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Restriktion von Plasmid-DNA

Um Plasmide für eine Klonierung einzusetzen oder um eine Restriktionsanalyse durchzuführen, muss die DNA spezifisch durch Typ II Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Diese Enzyme erkennen eine für sie charakteristische palindromische DNA-Sequenz und hydrolysieren an dieser Stelle eine bestimmte Phosphodiesterbindung.

Für einen Restriktionsanalyse werden 1 µg DNA in einem 20 µl Ansatz angesetzt, für einen präparativen Verdau 10 µg in 100 µl. Pro µg DNA werden 5 bis 10 Units Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Puffer können aus Katalogen des jeweiligen Herstellers entnommen werden. Die Inkubation erfolgt bei der jeweiligen optimalen Temperatur des Restriktionsenzym für 0,5 bis 2 h. (Verwendete Restriktionsenzyme s. 2.1.6)

2.2.2.2 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA

DNA-Fragmente verschiedener Länge können in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die durch Phosphatgruppen negativ geladene DNA wandert entsprechend ihres Molekulargewichts und Form im elektrischen Feld, so dass anhand eines mit aufgetragenen DNA-Markers die Fragmentgröße bestimmt werden kann.

Für DNA-Fragmente im Größenbereich zwischen 0,5 und 9 kb werden 1%-ige Agarosegele verwendet. Dazu wird 1% Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Zu der noch warmen Lösung werden 50 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und in einen speziellen Träger gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, die somit unter UV-Licht sichtbar wird. Die DNA-Proben werden mit einem Zehntel DNA-Probenpuffer in die Geltaschen aufgetragen und bei einer Spannung von 70 bis 100 V aufgetrennt. Ein passender DNA-Marker wird als Größenstandard mit aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht betrachtet und die zu isolierenden Banden aus dem Gel herausgeschnitten. Für die Isolierung der gewünschten Fragmente wird das QIAquick Gel Extraction II Kit (für Fragmentgrößen von 100 bp bis 10 kb) bzw. das

JETSORB Gel Extraction Kit/300 Genomed III (für Fragmentgrößen von 20 bp bis 45 kb) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde bei beiden Methoden in H₂O bidest gelöst und bei –20°C gelagert.

2.2.2.3 Dephosphorylierung von DNA durch Calf Intestinal Phosphatase (CIP)

Um eine Eigenligation des linearisierten Klonierungsvektors zu vermeiden, werden mit Hilfe der CIP die Enden des linearisierten Plasmids dephosphoryliert. Das Enzym hydrolysiert die 5'-endständigen Phosphatgruppen der DNA.

Die jeweilige Menge DNA, 10 µl NEB-Puffer 3 und 1 µl CIP werden mit H₂O bidest auf ein Volumen von 100µl aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 37°C für 1 h inkubiert.

Anschließend wird die DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit I (2.2.2.5) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.2.4 Auffüllen überstehender Enden von DNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

Wenn ein DNA-Fragment, das nach einem Restriktionsverdau überstehende Enden ("sticky ends") aufweist, für eine Klonierung glatte Enden ("blunt ends") benötigt, können die überstehenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt werden. Das Klenow-Fragment enthält die Polymerase-Einheit der DNA-Polymerase I und füllt die überstehenden Enden des 5'-Endes eines DNA-Fragments auf.

Für einen 100 µl-Ansatz wird die entsprechende Menge DNA-Fragment, 10 µl EcoPol-Puffer (NEB), 2 µl dNTPs und 1 µl Klenow-Fragment eingesetzt mit H₂O bidest auf das Volumen von 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 25°C für 15 min inkubiert. Anschließend wird die DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit I nach Angaben des Herstellers (2.2.2.5) aufgereinigt.

2.2.2.5 DNA-Reinigung

Das QIAquick PCR Purification Kit I wird für Fragmente zwischen 100 bp bis 10 kb eingesetzt, um sie von Nucleotiden, Polymerasen oder Salzen zu reinigen. Dazu wird die Probe auf eine Säule aufgetragen, an welche die DNA bindet, während andere ungewünschte Substanzen von der Säule gewaschen werden können. Anschließend kann die gereinigte DNA von der Säule gewaschen und in H₂O aufgenommen werden.

2.2.2.6 Ligation

Die Enden zweier DNA-Fragmente können mit Hilfe des Enzyms Ligase miteinander verbunden werden. Ligasen schließen die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphat-Gruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende. Für die Ligation wird die T4-DNA-Ligase von NEB verwendet. Um eine möglichst hohe Ausbeute des gewünschten Klonierungsprodukts zu erhalten, setzt man die zwei- bis dreifache molare Menge des zu ligierenden Fragments gegenüber dem Klonierungsvektor ein. Zu der errechneten DNA-Menge wird 2 µl T4-DNA-Ligase und 2 µl Ligase-Puffer (NEB) gegeben und mit H₂O bidest auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 16 °C für 12 h inkubiert. Anschließend kann direkt die Transformation der DNA in Bakterien durchgeführt werden.

2.2.2.7 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien ("Mini-Präp")

Für die Isolierung kleiner DNA-Mengen aus Bakterien wird das QIAprep Miniprep Kit (nach Angaben des Herstellers) verwendet, welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert. Mit diesem Kit können bis zu 20 µg DNA aus 1-5 ml einer Bakterienkultur isoliert werden. Von einer 5 ml Kultur werden 500 µl abgenommen (evtl. für eine spätere Kultivierung), der Rest zentrifugiert und mit Hilfe einer Säule, an welche die DNA bindet, isoliert. Dadurch können Verunreinigungen wie RNA und Proteine entfernt werden. Die DNA kann mit H₂O bidest von der Säule in ein Auffanggefäß eluiert werden.

2.2.2.8 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp")

Für die Isolierung großer DNA-Mengen wird das QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Prep Kit (nach Angaben des Herstellers) verwendet. Mit diesem Kit können bis zu 500 µg DNA isoliert werden. Dazu werden 200-250 ml einer Bakterienkultur, die das gewünschte Plasmid enthält, eingesetzt. Die Zellen werden lysiert und die Plasmid-DNA wird durch Bindung an eine Säule aufgereinigt. Die eluierte DNA wird anschließend getrocknet, in 200 µl H₂O bidest aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Mit Hilfe eines Photometers kann die Konzentration von DNA in Lösung bestimmt werden. Dies geschieht anhand der Absorption bei der Wellenlänge 260 nm, welche von den aromatischen Ringen der Basen der Nucleinsäuren absorbiert wird. Dabei werden Quarzküvetten verwendet, da diese das UV-Licht nicht absorbieren.

Durch die Bestimmung des Verhältnis E_{260}/E_{280} kann die Reinheit der DNA beurteilt werden. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt aufgrund der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm. Eine reine DNA-Lösung hat einen Wert von 1,8, ist sie jedoch mit Proteinen kontaminiert, sinkt dieser Wert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Alle Zellen werden in einem Zellinkubator bei 37°C, 6% CO₂ und 96%-iger Wasserdampfatosphäre kultiviert. Adhärenent wachsende Zellen werden in DMEM-Medium mit 10% Komplement-inaktiviertem (56°C, 30 min) fötalem Kälberserum (FCS), 200nM L-Glutamin, Streptomycin und Penicillin kultiviert.

Die adhärenent wachsenden Zellen werden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 passagiert. Dazu wird der Medienüberstand in der Kulturfalsche verworfen und die Zellen mit PBS (ohne Ca, Mg) gewaschen. Anschließend wird PBS (ohne Ca, Mg) mit 1 mM EDTA zur Ablösung der Zellen hinzugegeben und die Zellen im Brutschrank für ca. 3-5 Minuten inkubiert. Die abgelösten Zellen werden in Medium aufgenommen, der entsprechende Anteil zur weiteren Kultivierung zurück in die Zellkulturflasche gegeben und mit frischem Medium aufgefüllt.

2.2.3.2 Lagerung von eukaryotischen Zellen

2.2.3.2.1 Lagerung von Zelllinien

Subkonfluent gewachsene Zellen werden in einer großen Kulturflasche mit PBS (mit 1mM EDTA) abgelöst und in Medium aufgenommen. Anschließend werden die Zellen pelletiert (10 min; 1200rpm; 4°C; Heraeus Minifuge T). Das Pellet wird in 7,5 ml gekühltem Einfriermedium resuspendiert, die Zellsuspension auf fünf vorgekühlte 2 ml Kryoröhrchen (Nunc) aufgeteilt und für 2 bis 4 h bei -20°C eingefroren. Anschließend erfolgt eine Lagerung bei -80°C,

bevor die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden. Zum Wiederauftauen der Zellen wird die teilweise noch gefrorene Suspension in 20 ml frischem Kulturmedium in einer Kulturflasche im Brutschrank inkubiert. Nach 4 bis 5 h haben sich die Zellen abgesetzt, so dass ein Mediumwechsel erfolgen kann.

2.2.3.2 Lagerung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)

$3\text{-}10 \times 10^7$ PBMCs werden in 1ml kaltem FCS mit 10% DMSO pro Kryoröhrchen in Einfrierboxen für 3 Tage bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Wiederauftauen der Zellen werden zu der teilweise gefrorenen Suspension tropfenweise PBS zugefügt und anschließend zentrifugiert.

2.2.3.2.3 Lagerung von humanen hämatopoetischen Stammzellen (HSC)

Die humanen HSC werden in einer Dichte zwischen $9\text{-}13 \times 10^5$ Zellen in 1 ml kaltem humanem AB-Serum mit 10% DMSO aufgenommen und mittels einer Einfriermaschine nach einem speziellen Einfrierprotokoll ($1^\circ\text{C}/\text{Minute}$) auf -140°C gebracht und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Calcium-Phosphat zur Vektorproduktion

Diese Transfektionsmethode beruht auf dem Prinzip, dass durch das Mischen von DNA mit Calciumchlorid und einem phosphathaltigen Puffer sich kleine DNA-Calciumphosphat-Kristalle bilden. Diese Kristalle werden dann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.

293T-Zellen werden in 6-Lochplatten einen Tag vor Transfektion in einer Dichte von 6×10^5 Zellen/6-Loch ausgesät. Wird die Transfektion in T175-Flaschen durchgeführt, werden die Zellen 3 Tage vor Beginn mit einer Dichte von 4×10^6 Zellen/T175 ausgesät.

Eine Stunde vor Transfektionsbeginn wird das Medium abgenommen und durch frisches Medium mit $25 \mu\text{M}$ Chloroquin ausgetauscht. Das Chloroquin verhindert den Abbau der Plasmid-DNA. In einem 6-Loch werden $800 \mu\text{l}$ und in einer T175-Flasche 5 ml frisches Medium hinzugegeben. Für den Transfektionsansatz werden die folgenden Mengen für eine

T175-Flasche angegeben. Für die Transfektion von anderen Kulturgefäßen müssen die Mengen der Oberfläche entsprechend umgerechnet werden.

Für den Transfektionsansatz werden die verschiedenen Plasmidmengen gemischt und 150 µl CaCl₂ hinzugegeben. Mit H₂O (bidest) wird das Volumen auf 1,5 ml aufgefüllt. Im nächsten Schritt wird langsam 2x HBS unter Aufschäumen des Ansatzes durch das Ausblasen einer Pipette dazu getropft. Anschließend wird der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und für 8 Stunden inkubiert. Danach erfolgt ein Mediumwechsel.

In Tabelle 2.14 sind die Plasmidmengen angegeben, die für die Vektorproduktion in diesem Labor eingesetzt werden. Die Angaben entsprechen der Transfektion von einer T175-Zellkulturflasche.

Tabelle 2.14: Plasmidmengen für Transfektion

Resultierender Vektor	Transfektor	Hüllexpressionskonstrukt (pMD.G 2)	VpX _{PBJ} -Expressionsplasmid
[SIV _{PBJ} -EGFP(VSV)]	pPBJ-Δenv-EGFP7: 73 µg	36 µg	-
[SIV _{4xko} -EGFP(VSV)]	pPBJ-Δenv -4xko: 73 µg	36 µg	-
[SIV _{4xko} -EGFPVpX(VSV)]	pPBJ-Δenv -4xko: 73 µg	36 µg	27 µg
[SIV _{4xko} -MartVpX (VSV)]	pPBJ-Δenv-Mart-1: 46 µg	18 µg	18 µg
[HIV-1 _{EGFP} (VSV)]	PNL ₄₋₃ Δenv-EGFP : 73 µg	15 µg	-
[HIV-2 _{EGFP} (VSV)]	pRodA-Δenv-EGFP: 45 µg	20 µg	-

2.2.3.4 Konzentration retroviraler Partikel durch Ultrazentrifugation

Um Vektorstocks zu erstellen, werden die Medienüberstände der 293T-Zellen 24 h nach Transfektion abgenommen, verworfen und neues Medium zugeben. Nach 48h und 72h werden die Medienüberstände jeweils gesammelt, zweimal zentrifugiert (10 min; 3000 rpm; 4°C; Minifuge T, Heraeus) und das Zellpellet jedes Mal verworfen. Um evtl. vorhandene Zellfragmente oder andere Partikel zu eliminieren, werden die Überstände durch ein 450 nm Sterilfilter filtriert. 30 ml der frisch filtrierten Vektorüberstände werden auf 5 ml einer 20%-igen sterilen Saccharoselösung in ein Polyallomer-Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Überstände werden dann in einem SW28-Rotor (Beckman-Coulter GmbH) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (2 h; 25.000 rpm; 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100µl Medium resuspendiert. Dabei wird das Medium verwendet, in welchem die Zielzellen kultiviert werden. Die Vektoren werden für 30 min bei 4°C geschüttelt. Das Vektorkonzentrat wird anschließend zentrifugiert (9.000rpm, 4°C, 1 min; Tischzentrifuge, Heraeus), der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.5 Titration von retroviralen Vektoren

Zur Titerbestimmung werden für den entsprechenden Vektor susceptible Zellen ausgesät. In der vorliegenden Arbeit wurden HT1080-Zellen verwendet. Diese Zellen werden 24 h vor der Transduktion ausgesät (3×10^4 Zellen/Loch einer 24-Loch-Platte) und sollten zum Zeitpunkt der Transduktion sub-konfluent gewachsen sein. Das Medium wird abgenommen und je 250 μ l der Vektorlösung wird in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf die Zellen gegeben. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank werden die Zellen gewaschen und frisches Medium zugegeben. Nach 3 Tagen wird der prozentuale Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen mit dem FACS-Gerät bestimmt. Für die Ermittlung des Titers werden die FACS-Messungen mit einem Anteil von 3-30 % positiver Zellen eingesetzt. Die Berechnung des Titers erfolgt über folgende Formel:

$$\frac{\text{EGFP-exprimierende Zellen [\%]}}{100} \times \text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times 4 = \text{TU/ml}$$

Zellzahl: Zellzahl der ausgesäten HT1080 Zelllinie

TU/ml: transduzierende Einheiten pro ml

2.2.3.6 Präparation von humanem AB-Serum

Das humane AB-Serum (Sigma) wird aufgetaut und für 30 min bei 56°C inkubiert. Dabei wird das Komplementsystem Hitze-inaktiviert. Anschließend wird das Plasma zentrifugiert (4000 rpm, 30 min, 4°C; Minifuge T), der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert. Dann wird das Plasma mittels eines 450nm Filter sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.2.3.7 Isolierung und Kultivierung von primären Zellen

2.2.3.7.1 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) aus Blut

Die Isolierung der PBMCs beruht auf dem Prinzip der Dichtezentrifugation. Die Zellen des Blutes besitzen zum Teil unterschiedliche Dichten und können aufgrund dessen nach Zentrifugation in einer Polysaccharid-Lösung separiert werden.

Zur Gewinnung primärer humaner Zellen mittels Dichtezentrifugation werden aus frischem Citrat-Blut oder Buffy Coats PBMCs isoliert. Bei der Verwendung eines Buffy Coats wird das Blut 1:1 mit warmem PBS verdünnt. Anschließend werden 15 ml auf 37°C erwärmtes Ficoll Histopaque mit 30 ml Blut langsam überschichtet und zentrifugiert (30 min, 1300 rpm, 25°C,

ohne Bremse; Minifuge T, Heraeus). Die Erythrozyten sedimentieren bis zum Boden des Röhrchens. Über der Ficoll-Lösung reichern sich im sogenannten „Lymphozytenring“ Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen an. Der Lymphozytenring wird ebenfalls abgenommen, in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 37°C warmem PBS zweimal gewaschen (15 min; 1200 rpm; 25°C; Minifuge T, Heraeus). Falls noch Erythrozyten vorhanden sind, wird das Pellet in 10ml Ammoniumchlorid (0,86%) resuspendiert und bei 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal gewaschen.

2.2.3.7.2 Isolierung primärer humaner CD14⁺ Monozyten mittels MACS[®] ("magnetic cell sorting") (Positivisolierung)

Zur Isolierung von CD14⁺ Monozyten aus humanen PBMCs wird das Monocyte positive Isolation Kit verwendet. CD14⁺-Zellen werden hierbei durch eine Positivselektion isoliert, d. h., an alle Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 exprimieren, binden Antikörper, die mit magnetischen "Microbeads" markiert sind. Die Zellen werden so beim Durchfluss durch eine magnetische MACS-Säule in einem Magnetfeld zurückgehalten. Alle anderen Zellen werden nicht durch den Antikörper gebunden und können von der Säule herunter gewaschen werden.

Hierzu werden die Ficoll-präparierten PBMCs (2.2.3.7.1) nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 40 ml MACS-Puffer aufgenommen, gezählt und je 1×10^5 Zellen für eine FACS-Färbung abgenommen. Die restlichen Zellen werden pelletiert (10 min, 1200 rpm, 25°C; Minifuge T, Heraeus), pro 10^7 Zellen 80 µl MACS-Puffer, 20 µl CD14-Antibody-Cocktail hinzugegeben und bei 4°C für 15 min inkubiert. Anschließend werden pro 10^7 Zellen 1-2ml MACS-Puffer zugegeben und zentrifugiert (10 min, 1200 rpm, 4°C; Minifuge T, Heraeus). Bis zu 10^8 Zellen werden in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Eine LS/VS-MACS-Säule wird im Magneten befestigt und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension wird auf die Säule gegeben und mit dreimal 3 ml MACS-Puffer erfolgt die Elution der unmarkierten Zellen von der Säule. Anschließend wird die Säule aus dem Magneten genommen und die gebundenen CD14⁺-Zellen mit 5 ml MACS-Puffer und einem beigefügten Stempel von der Säule eluiert. Die Zellen werden erneut gezählt und für die FACS-Analyse 1×10^5 Zellen pro Färbung abgenommen. Die restlichen Zellen werden zentrifugiert (15 min; 1200 rpm; 4°C; Minifuge T, Heraeus) und in den entsprechenden Kulturmedien aufgenommen.

2.2.3.7.3 Isolierung primärer humaner B-Lymphozyten durch magnetische Zell-Separierung mit Dynabeads (Negativdepletion)

Die humanen B-Lymphozyten werden mittels einer Negativdepletion isoliert, das heißt, alle Zellen außer der B-Zellen werden an Antikörper gebunden. Ein zweiter Antikörper erkennt den Fc-Teil des ersten und ist mit magnetischen Beads gekoppelt. Die gebundenen Zellen werden so in einem magnetischen Feld zurückgehalten und die B-Zellen, welche sich im Überstand befinden, können so separiert werden.

Die Ficoll-präparierten PBMCs (2.2.3.7.1) werden nach dem letzten Zentrifugationsschritt pro 1×10^7 Zellen in 100 µl kaltem PBS mit 1% BSA aufgenommen. Pro 1×10^7 Zellen werden 20 µl Antikörper-Mix zugegeben, gemischt und für 20 min bei 2-8°C inkubiert. Anschließend werden pro 1×10^7 Zellen 2 ml PBS zugegeben und zentrifugiert (1200rpm, 10 min, 4°C; Minifuge T, Heraeus). In der Zwischenzeit werden pro 1×10^7 Zellen 200 µl Beads mit dem gleichen Volumen PBS gemischt, für 1-2 min an den Magneten gegeben, der Überstand abgenommen und im gleichen Volumen PBS wieder aufgenommen. Die Zellen werden pro 1×10^7 Zellen in 800 µl PBS mit 0,1% BSA resuspendiert, mit den gewaschenen Beads gemischt und für 15 min bei 2-8°C inkubiert. Anschließend wird das Zell-Beads-Gemisch vorsichtig resuspendiert und das Volumen pro 1×10^7 Zellen mit 1 ml PBS erhöht und für 2 min an den Magneten gegeben. Der Überstand wird abgenommen, in ein neues Tube transferiert und erneut an den Magneten geben. Nach 2 min wird der Überstand, welcher die unmarkierten B-Lymphozyten enthält, abgenommen, die Zellen gezählt, 1×10^5 Zellen pro FACS-Färbung abgenommen und zentrifugiert. Anschließend werden die isolierten B-Zellen in Kulturmedium aufgenommen und ausgesät.

2.2.3.7.4 Kultivierung humaner B-Lymphozyten

Humane B-Lymphozyten werden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 6-Lochplatten ausgesät. Die Zellen werden in RPMI 1640 mit 10% autologem Plasma und 10% FCS kultiviert. Zusätzlich wurden die Zytokine IL-2 [50ng/ml], IL-4 [50ng/ml], IL-10 [10 ng/ml] und CD40Ligand [300 ng/ml] zugegeben. Alle 2-3 Tage wird die Hälfte des Mediums gegen frisches ausgetauscht.

2.2.3.7.5 Isolierung primärer humaner CD8⁺-T-Lymphozyten durch magnetische Zell-Separierung mit Dynabeads (Negativdepletion)

Ficoll-präparierte PBMCs (2.2.3.7.1) werden nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 100 µl Puffer P1 pro 10⁷ Zellen aufgenommen. Des weiteren werden pro 10⁷ Zellen 20 µl FCS und 20 µl Antikörpercocktail dazugegeben und bei 4°C für 20 min inkubiert. Anschließend werden pro 10⁷ Zellen 2 ml P1-Puffer zugegeben und zentrifugiert. Dann wird das Pellet pro 10⁷ Zellen in 800 µl Puffer P1 resuspendiert und pro 10⁷ Zellen 200 µl in Puffer P1 gewaschene Beads zugegeben und bei 18-25 °C für 15 min während Rotation inkubiert. Anschließend wird pro 10⁷ Zellen 1 ml Puffer P1 zugegeben und das Tube für 2 min an den Magneten gehängt. Der Überstand wird in ein neues Tube überführt und erneut an den Magneten gehängt. Dann wird der Überstand, in welchem sich die unmarkierten CD8⁺-Zellen befinden, in ein neues Tube überführt, die Zellen gezählt und 1 x10⁵ Zellen pro FACS-Färbung abgenommen. Die restlichen Zellen werden mit PBS gewaschen und wie in Kapitel 2.2.3.10 beschrieben kultiviert.

2.2.3.7.6 Isolierung primärer simianer Monozyten mittels MACS (Positivisolierung)

Das Heparin-Blut wird zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT; Minifuge T, Heraeus). Anschließend wird das Plasma, welches sich über dem Blut befindet, abgenommen und bei 56°C für 30 min Hitze-inaktiviert. Im nächsten Schritt wird das Plasma zweimal bei 3500 rpm, für 15 min bei 4°C (Minifuge T, Heraeus) zentrifugiert, steril filtriert (450nm Filter) und bei 4°C gelagert. Das Blut wird in ein 50 ml Falcon überführt und 1:2 mit PBS verdünnt. 15 ml Ficoll wird mit 5% PBS verdünnt, mit dem Blut vorsichtig überschichtet und bei 2200 rpm, 30 min, RT, ohne Bremse zentrifugiert. Der Lymphozytenring wird abgenommen, in ein Falcontube überführt und mit PBS aufgefüllt und bei 1400 rpm für 10 min bei RT (Minifuge T, Heraeus) zentrifugiert. Sowohl der Überstand, als auch das resuspendierte Pellet wird nochmals zentrifugiert. Beide Pellets werden in je 5 ml Ammoniumchlorid (0,87%) resuspendiert, vereint und im Wasserbad bei 37°C für 10 min inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit PBS zweimal gewaschen, in MACS-Puffer aufgenommen und gezählt. Pro FACS-Färbung werden 1x10⁵ Zellen abgenommen, die restlichen Zellen werden zentrifugiert (1400 rpm, 10 min, 4°C; Minifuge T, Heraeus). Das Pellet wird pro 10⁷ Zellen in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert, mit 20 µl CD14 MicroBeads pro 10⁷ Zellen gemischt und für 15 min bei 4°C inkubiert. In der Zwischenzeit werden die MACS-Säulen in den Magneten gehängt und mit je 3 ml MACS-Puffer kalibriert. Die Zellen werden anschließend mit 1-2 ml pro 10⁷ Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C; Minifuge T, Heraeus).

Das Pellet wird dann in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und über einen Filter auf die Säulen gegeben. Die Säule wird mit 3 mal 3 ml Puffer gewaschen und anschließend aus dem Magneten genommen. Mit 5 ml werden die markierten CD14⁺-Zellen mit Hilfe eines Stempels von der Säule eluiert. Die Zellen werden dann gezählt, mit PBS gewaschen und 1x10⁵ Zellen für FACS-Färbungen abgenommen und die restlichen Zellen ausgesät.

2.2.3.7.7 Kultivierung von simianen Monozyten

Die Zellen werden in einer Dichte von 7-4x10⁵ Zellen pro 12-Lochplatte bzw. 1x10⁵ Zellen pro 24-Lochplatte ausgesät. Zu dem Medium RPMI 1640 wird 10% autologes Plasma (Komplement-inaktiviert), 200 mM Glutamin, 2000 U/ml GM-CSF und 50 ng/ml IL-4 gegeben.

2.2.3.7.8 Isolierung primärer muriner Monozyten (Negativdepletion)

Für die Isolierung von murinen Monozyten aus Knochenmark werden die Oberschenkelknochen (Femur) frei präpariert und das Knochenmark mit einer 25-gauge Nadel mit kaltem PBS herausgespült, bis der Knochen weiß erscheint. Die Zellen werden auf Eis gekühlt, bis die Zellen zentrifugiert werden. Dann werden die Zellen in 10 ml kaltem PBS mit 2% FCS resuspendiert und durch einen 70 µm Filter gegeben, um Zellklumpen zu entfernen. Anschließend werden die Knochenmarkszellen mehrerer Mäuse vereinigt. Um Erythrozyten zu lysieren, werden die Zellen in 5 ml M-Lyse Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen gezählt und pro FACS-Färbung 1x10⁵ Zellen abgenommen. Die restlichen Zellen werden in einer Konzentration von 10⁸ Zellen pro 400 µl aufgenommen und pro 400 µl 100 µl Antikörper-Cocktail (s. Tabelle 2.15) zugegeben und für 40 min auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen dreimal mit 3 ml kaltem PBS mit 2% FCS gewaschen und anschließend in 1ml resuspendiert. Im nächsten Schritt wird der Sekundärantikörper (Dynal) gewaschen, welcher an magnetische Beads gekoppelt ist. Dazu werden die Beads in einem Beads-Zell-Verhältnis von 2:1 abgenommen, gewaschen und in 200 µl resuspendiert. 100 µl der gewaschenen Beads werden mit den Zellen resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Volumen auf 3 ml aufgefüllt die Zellen für 25 min bei 2-8 °C während Rotation inkubiert. Das Tube wird dann für 2 Minuten an den Magneten gehängt, der Überstand in ein neues Tube überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C; Minifuge T, Heraeus). Die Zellen werden in 1 ml kaltem PBS mit 2% FCS resuspendiert, die restlichen 100 µl Beads dazugegeben und wie zuvor inkubiert. Das Tube wird wieder an den Magneten gehängt und nach 2 Minuten wird der Überstand

abgenommen, in ein neues Tube überführt. Die unmarkierten Monozyten im Überstand werden gezählt und 1×10^5 Zellen pro FACS-Färbung abgenommen und die restlichen Zellen werden gewaschen und in Kultur genommen.

Tabelle 2.15: Antikörper-Cocktail für Depletion muriner Monozyten.

Antikörper	Zugabe pro 1×10^8 Zellen [μ l]	Antikörper gegen folgende Zelltypen	Hersteller
Anti-B220	12,5	B-Lymphozyten (pro-, reife, aktivierte)	R&D
Anti-CD8 α	12,5	T-Lymphozyten, DC	R&D
Anti-CD4	12,5	T-Lymphozyten	R&D
Anti-CD3	12,5	Reife T-Lymphozyten	R&D
Anti-I-A/I-E	7	MHC-II	BD
Anti-CD24	4	Hämatopoetische Vorläufer von B-Zellen	BD

2.2.3.7.9 Kultivierung muriner Monozyten

Die Zellen werden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 12 Lochplatten ausgesät. Das Medium besteht aus RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/ml Penicilin/Streptomycin und 200 mM Glutamin.

2.2.3.7.10 Kultivierung von humanen hämatopoetischen Stammzellen

Die hämatopoetischen Stammzellen wurden von zwei verschiedenen Quellen bezogen. Ein Teil der Zellen wurde mittels GM-CSF aus dem Knochenmark gesunder Spender mobilisiert und wurde freundlicherweise von Frau Dr. Köhl von der Universitätsklinik Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt. Der andere Teil der Zellen stammt aus Nabelschnurblut und wurde von der Firma Cambrex Bio Science, Etterbeek, Belgien käuflich erworben. Die Zellen wurden bereits isoliert bezogen (CD34-Positivdepletion) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der hämatopoetischen Stammzellen werden die Zellen in einem Wasserbad (37°C) schnell aufgetaut. Die Zellen werden in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Anschließend wird langsam PBS hinzugegeben. Um einen osmotischen Schock zu verhindern, wird zunächst ein Tropfen PBS hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Dann erfolgt die Zugabe von zwei Tropfen, drei Tropfen usw. Die Zellen werden anschließend zentrifugiert (1.200 rpm, 10 min, 25 °C; Minifuge T, Heraeus) und in dem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen werden in StemSpan SFEM Medium, zu welchem die rekombinanten, humanen Zytokine Flt-3 Ligand [100 ng/ml], Stammzellfaktor [100 ng/ml],

Interleukin-3 [20ng/ml] und Interleukin-6 [20 ng/ml] gegeben werden, kultiviert. Zusätzlich enthält das Medium Glutamin [300 µg/ml], Streptomycin [100 µg/ml] und Penicillin [100 U/ml]. Die Zellen werden in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/6-Lochplatte bzw. 5×10^5 Zellen/24-Lochplatte kultiviert. Alle 2-3 Tage wird die Hälfte des Mediums abgenommen und frisches hinzugegeben.

2.2.3.8 Differenzierung von primären Zellen

2.2.3.8.1 Differenzierung von humanen unreifen und reifen dendritischen Zellen aus Monozyten

Die isolierten Monozyten (2.2.3.7.2) werden mit einer Dichte von $6-9 \times 10^5$ in einer 12-Loch-Platte in 500µl Medium für die Differenzierung zu unreifen DCs ausgesät (Tabelle 2.16). An Tag 6 nach Isolierung, wird das Medium abgenommen und durch Medium für die Differenzierung zu reifen DCs ersetzt (Tabelle 2.16). An Tag 9 nach Isolierung ist die Differenzierung abgeschlossen.

Werden die Zellen für eine Transduktion ausgesät, beträgt die Zellzahl $1-2 \times 10^5$ Zellen pro 24-Loch.

Tabelle 2.16: Medium für die Differenzierung von unreifen und reifen DCs aus Monozyten

Medium für unreife DCs	
DC CellGro	
Humanes AB Serum	1%
Glutamin	2 mM
IL-4	1000 U/ml
GM-CSF	800 U/ml
Medium für reife DCs	
DC CellGro	
Humanes AB Serum	1%
Glutamin	2 mM
IL-4	1000 U/ml
GM-CSF	800 U/ml
IL-6	1000 U/ml
TNF- α	10ng/ml
IL-1 β	10ng/ml
PGE ₂	1µg/ml

2.2.3.8.2 Differenzierung von Makrophagen aus Monozyten

Mittels Positivselektion isolierte Monozyten (2.2.3.7.2) werden in 1000U/ml M-CSF in RPMI1640 mit 5% AB Serum und 200 mM Glutamin für 5 Tage kultiviert. Dabei beträgt die Zellzahl 6×10^5 Zellen/12-Loch. Über Nacht werden die Zellen mit 100 ng/ml LPS und 5 µg/ml CD40L stimuliert.

2.2.3.9 Transduktion von primären Zellen

2.2.3.9.1 Multiplicity of Infection (MOI)

Die Transduktionsexperimente wurden mit einer bestimmten Anzahl an Vektoren pro Zelle durchgeführt. Die Anzahl der viralen Partikel pro Zelle wird durch die MOI ausgedrückt. Werden beispielsweise 10 Vektoren pro Zelle eingesetzt, entspricht das einer MOI von 10.

2.2.3.9.2 Transduktion von Monozyten und unreifen dendritischen Zellen

An Tag 1 nach Isolierung werden die Zellen mit den jeweiligen lentiviralen Vektoren mit unterschiedlichen MOIs transduziert. Dazu wird das Volumen des Zellüberstandes verringert, damit die Vektoren und die Zellen in räumliche Nähe gebracht werden können. Das Medium wird abgenommen und 220 µl werden zurück in das 24-Loch gegeben. Um die Zellen, welche sich noch im Überstand befinden nicht zu verlieren, wird der restliche Überstand zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, 25°C; Tischzentrifuge, Heraeus). Das Medium wird abgenommen und das Zellpellet in 50 µl Überstand aufgenommen und zu den Zellen zurückgegeben. Die benötigte Vektormenge wird aufgetaut, zentrifugiert (9000 rpm, 1 min, 4°C; Tischzentrifuge, Heraeus) und der Überstand zu den Zellen gegeben. Nach 5 Stunden werden die Vektoren entfernt. Dazu wird der Überstand abgenommen und zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, 25°C; Tischzentrifuge, Heraeus). Die Zellen, welche sich im Pellet befinden werden resuspendiert und zu den Zellen zurückgegeben. Der alte Überstand, der vor der Transduktion abgenommen wurde, wird zu den Zellen zurückgegeben, das Volumen wird mit frisch angesetztem Medium auf 500 µl aufgefüllt.

Von den Zellen, die an Tag 6 transduziert werden, wird der gesamte Überstand abgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 220 µl Medium resuspendiert und zu den Zellen zurückgegeben. Der Vektorüberstand wird wie oben beschrieben behandelt und zu den Zellen gegeben. Nach 5 Stunden wird der Überstand verworfen und 500 µl Medium

für die Differenzierung von reifen DCs zu den Zellen gegeben. 4 Tage später wird die Transgenexpression im FACS-Gerät analysiert (siehe 2.2.4).

2.2.3.9.3 Transduktion von B-Lymphozyten

Die Zellen werden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen in einer 24-Loch-Platte in 300 μ l ausgesät. Die entsprechende Vektormenge wird aufgetaut, zentrifugiert (9000 rpm, 1 min, 4°C; Tischzentrifuge, Heraeus) und zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden für 5 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert und das Zellpellet in 500 μ l frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach 5 Tagen erfolgt die Analyse der Transgenexpression im FACS-Gerät (siehe 2.2.4).

2.2.3.9.4 Transduktion von simianen Monozyten

Die frisch isolierten und in 24-Lochplatten ausgesäten Monozyten werden mit den entsprechenden Vektoren an Tag 1 nach Isolierung transduziert. Um die Vektoren und die Zellen in räumliche Nähe zu bringen, wird das Medium abgenommen und 150 μ l zurück zu den Zellen gegeben. Um die Zellen im restlichen Überstand nicht zu verlieren, wird der Überstand zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT; Tischzentrifuge Heraeus), das Zellpellet in 200 μ l Medium resuspendiert und in das gleiche Loch zurückgegeben. Das entsprechende Volumen an Vektorlösung wird nach Zentrifugation (9000 rpm, 1 min, 4°C; Tischzentrifuge, Heraeus) zu den Zellen gegeben und für 5 h im Brutschrank inkubiert. Um die Vektoren anschließend wieder von den Zellen zu entfernen, wird das Medium abgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet in 500 μ l frischem Medium resuspendiert und wieder zurück gegeben. Nach 5 Tagen erfolgt die Analyse der Transgenexpression im FACS-Gerät (siehe 2.2.4).

2.2.3.9.5 Transduktion von murinen Monozyten

Die Transduktion erfolgt wie für simiane Monozyten beschrieben (2.2.3.9.4).

2.2.3.9.6 Transduktion von humanen Makrophagen

Die Zellen werden am Tag 1 oder Tag 5 nach Isolierung mit den entsprechenden lentiviralen Vektoren transduziert. Um die Vektoren und die Zellen in räumliche Nähe zu bringen, wird das Medium abgenommen, 250µl zurück zu den Zellen gegeben und der restliche Überstand zentrifugiert (3.500 rpm, 5 min, 4°C; Heraeus Tischzentrifuge). Das Zellpellet wird in 50µl resuspendiert und zurück in das Well gegeben. Der Vektor wird zentrifugiert (9000 rpm, 1 min, 4°C; Tischzentrifuge, Heraeus) und mit der entsprechenden MOI für 5 Stunden mit den Zellen inkubiert. Anschließend wird das Medium gewechselt. Nach 5 Tagen erfolgt die Analyse der Transgenexpression im FACS-Gerät (siehe 2.2.4).

2.2.3.9.7 Transduktion von humanen hämatopoetischen Stammzellen

Die Stammzellen wurden an Tag 1 bzw. Tag 1 und 2 nach Auftauen mit den jeweiligen lentiviralen Vektoren transduziert. Dafür wurden die Zellen gezählt und in 24-Lochplatten in einem Volumen von 500µl mit den entsprechenden Vektoren für 5 Stunden inkubiert. Zuvor werden die Vektoren zentrifugiert (9000 rpm, 1 min, 4°C; Tischzentrifuge, Heraeus) und nur der Überstand für die Transduktion eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (3.500rpm, 5min, 25 C; Hereaus Tischzentrifuge) und in frischem Medium aufgenommen. Nach 5 Tagen erfolgt die Analyse der Transgenexpression im FACS-Gerät (siehe 2.2.4).

2.2.3.10 Generierung von Mart-spezifischen CD8⁺-T-Zellen

2.2.3.10.1 Stimulierung von CD8⁺-T-Zellen mit dendritischen Zellen

Um Mart-spezifische CD8⁺T-Zellen zu generieren, müssen zunächst PBMCs von HLA-A2-positiven Spendern isoliert werden. Dazu werden die PBMCs von verschiedenen Buffy-Coats isoliert (2.2.3.7.1) und auf die HLA-A2-Expression im FACS getestet. Exprimieren die PBMCs eines Donors diesen Marker, werden die Zellen wie in 2.2.3.2.2 beschrieben eingefroren.

An Tag 0 werden die PBMCs aufgetaut und Monozyten wie beschrieben isoliert (2.2.3.7.2). An Tag 1 und 6 nach Isolierung werden die Zellen mit dem [SIV_{4xko-Mart}Vpx(VSV)] mit jeweils einer MOI von 1 transduziert (2.2.3.9.2).

Priming: An Tag 9 werden CD8⁺-Zellen des gleichen Donors isoliert (2.2.3.7.5), mit den reifen DCs in einem Verhältnis von 1:10 gemischt und in einer 24-Lochplatte kultiviert, wobei

zwischen $1-2 \times 10^6$ T-Zellen eingesetzt werden. Im 1. Ansatz werden die T-Zellen mit den an Tag 1 transduzierten DCs stimuliert. Im 2. Ansatz werden die T-Zellen mit den an Tag 6 transduzierten DCs zusammen kultiviert. Das Kulturmedium besteht aus RPMI mit 5 U/ml IL-4 und 5% humanem AB-Serum.

5 Tage später wird IL-2 (25 U/ml) hinzugegeben und die Zellen ohne Medienwechsel für weitere 4-7 Tage inkubiert. In der Zwischenzeit werden neue Monozyten isoliert, am Tag 1 oder 6 transduziert und maturiert.

1. Restimulierung: Nach 9-12 Tage Co-Kultur werden die T-Zellen mit den neu generierten reifen DCs im Verhältnis 1:10 gemischt. Das Medium besteht aus RPMI mit 5% humanem AB-Serum, 5 U/ml IL-4 und 25 U/ml IL-2.

2. Restimulierung: Eine Woche nach der 1. Restimulierung werden die T-Zellen erneut mit frisch generierten, transduzierten DCs gemischt. Das Medium besteht aus RPMI mit 5% humanem AB-Serum und 25 U/ml IL-2.

Nach einer Woche werden die T-Zellen ohne DCs mit 80 U/ml IL-2 für weitere 5 –7 Tage kultiviert. Anschließend können die Zellen auf ihre Mart-Spezifität hin analysiert werden (2.2.4.5, 2.2.4.6, 2.2.4.8).

2.2.3.10.2 Stimulierung von CD8⁺-T-Zellen mit Makrophagen

Die Stimulierung von CD8⁺-T-Zellen mit Makrophagen wird wie in 2.2.3.10.1 beschrieben durchgeführt, jedoch mit folgenden Abweichungen: Die frisch isolierten Monozyten werden in Medium für die Differenzierung zu Makrophagen kultiviert (2.2.3.8.2). An Tag 1 nach Isolierung wurden die Zellen mit [SIV_{4xko-Mart}Vpx(VSV)] transduziert. An Tag 5 nach Isolierung werden die Makrophagen mit LPS und CD40Ligand aktiviert. Am nächsten Tag werden die frisch isolierten CD8⁺-T-Zellen im Verhältnis 10:1 mit den Makrophagen wie beschrieben kultiviert. Die zytotoxischen T-Zellen werden eine Woche nach der 1. Restimulierung analysiert (2.2.4.6).

2.2.3.11 Progenitorzellassay

Um das Differenzierungspotential von hämatopoetischen Stammzellen zu testen, kann ein Progenitorzellassay durchgeführt werden. Dabei werden die Stammzellen in MethoCult-Medium kultiviert, welches die Zytokine SCF [50 ng/ml], GM-CSF [510 ng/ml], IL-3 [10 ng/ml] und Epo [3 U/ml] enthält. Diese Zytokine bewirken die Differenzierung der Stammzellen zu

Erythrozyten-, Granulozyten- und Makrophagenkolonien. Dabei bildet eine Zellen eine Kolonie, welche aus mindestens 50 Zellen besteht.

Zu diesem Zweck werden 1500 Stammzellen in 300 µl StemSpan Medium (ohne Zytokine) aufgenommen und mit 3 ml MethoCult-Medium vermischt. Nach 5 Minuten wird je 1 ml des Medium mit Hilfe einer speziellen Spritze in 35 mm Petrischalen gefüllt, so dass jede Schale 500 Zellen enthält. Je 3 dieser Schalen werden in einer großen 15-cm Petrischale zusammen mit einer offenen 35 mm Petrischale, welche mit destilliertem Wasser gefüllt ist, im Brutschrank kultiviert. Nach ca. 14 Tagen erfolgt die Auswertung des Assays, wobei die entstandenen Kolonien unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

2.2.4 Analytische Methoden

2.2.4.1 Analytische Durchflusszytometrie "Fluorescence Activated Cell Sorting" (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen näher charakterisiert werden. Dabei werden die Zellen nacheinander an einem Laserstrahl vorbei gelenkt. Die Lichtstreuung und –beugung, sowie die Fluoreszenzintensität wird von Detektoren aufgenommen und in ein entsprechendes Signal umgewandelt. Im FACS-Gerät können so beispielsweise zwischen verschiedenen Zellpopulationen unterschieden werden, insofern sie unterschiedliche Größe und Granularität besitzen, da sie das Laserlicht unterschiedlich stark streuen. Es kann nur auf eine oder auf mehrere Zellpopulation *gated* werden, um diese genauer analysieren zu können.

Mit einem FACS-Gerät können auch Fluorophore oder fluoreszierende Farbstoffe detektiert werden. Es kann sich dabei auch um EGFP-exprimierende Zellen handeln oder um Zellen, die Fluoreszenz-markierte Antikörper gebunden haben. So können Oberflächenexpressionsmuster von Zellen analysiert werden und deren prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl ermittelt werden. Wenn die EGFP-Fluoreszenz gemessen werden soll, muss eine Negativkontrolle eingemessen werden, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu bestimmen. Wenn die Fluoreszenz eines gebundenen Antikörpers bestimmt werden soll, muss zu Beginn der Messungen eine Isotyp-Kontrolle eingesetzt werden, damit nur spezifische Antikörperbindungen detektiert werden.

2.2.4.2 EGFP-Nachweis

Für den Nachweis der EGFP-Expression in Zellen, werden die zu analysierenden Zellen in FACS-Röhrchen überführt und einmal mit FACS-Wash gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 200-400 µl FACS-Fix resuspendiert. Die Zellen können für eine Woche bei 4°C in Dunkelheit gelagert werden.

2.2.4.3 Nachweis des Mart-Proteins mittels einer intrazellulären FACS-Färbung

Zum Nachweis des Mart Proteins in transduzierten Zellen muss eine intrazelluläre FACS-Färbung durchgeführt werden. Hierzu werden die transduzierten und nicht transduzierten Zellen abgelöst und 15 Minuten fixiert (Fix-Lösung). Anschließend werden die Zellen zentrifugiert und zweimal in 500µl Perm-Lösung gewaschen. Dann werden 100µl einer 1:250-Verdünnung eines Mart-1-Antikörpers zu den Zellen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut zweimal in 500µl Perm-Lösung gewaschen, 100µl einer 1:300-Verdünnung des F(ab)₂-Antikörpers zu den Zellen geben und im Dunkeln bei RT für 45 Minuten inkubiert. Die Zellen werden erst mit Perm-Lösung und dann mit RPMI mit 2 % FCS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 300-800 µl FACS-Fix aufgenommen und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

Wird über die intrazelluläre FACS-Färbung der Titer von Mart-übertragenden Vektoren bestimmt, wird die Titration wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt.

2.2.4.4 Nachweis von Oberflächenmarkerproteinen auf PBMCs durch FACS

Um verschiedene Sub-Populationen und deren Differenzierungszustand nachzuweisen, kann die Expression von Oberflächenproteinen als Marker für die jeweilige Population und Differenzierungsstatus in der FACS-Analyse herangezogen werden. Es werden je Färbung ca. $1-2 \times 10^5$ Zellen abgenommen und mit 500µl FACS-Wash gewaschen (5 min; 3500 rpm; 4°C; Heraeus Tischzentrifuge). Der Überstand wird dekantiert und das Pellet im restlichen FACS-Wash resuspendiert. Pro 1×10^5 Zellen wird anschließend der entsprechende Fluoreszenz-markierte Antikörper zur Suspension zugegeben und bei 4°C für 30 min inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit je 500µl FACS-Wash gewaschen und anschließend in 200 µl FACS-Fix aufgenommen. Bis zur Messung können die Zellen bei 4°C im Dunkeln maximal eine Woche gelagert werden.

2.2.4.5 MHC-Dextramer-Färbung

Mit Hilfe der Dextramer-Färbung kann analysiert werden, ob zytotoxische T-Zellen spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind. Das MHC-Dextramer besteht aus MHC-Molekülen, welche spezifisch einen T-Zellrezeptor erkennen. Die MHC-Moleküle sind an eine Polymerkette (Dextran) gebunden, an welche FITC-Fluorophore gekoppelt sind. In dieser Arbeit wurden Mart-spezifische MHC-Dextramere verwendet, um zu analysieren, ob die generierten zytotoxischen T-Zellen spezifisch für das Antigen Mart-1 ist. Dazu wurden 1×10^5 geprimte T-Zellen mit PBS gewaschen und in 50 μl PBS + 5% FCS resuspendiert. 2 μl des Dextramers werden hinzugegeben und für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Sollen die Zellen zusätzlich auf die CD8-Expression untersucht werden, wird anschließend 1 μl eines CD8-Antikörpers hinzu pipetiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Dann werden die Zellen gewaschen und in FACS-Fix aufgenommen. Innerhalb von zwei Stunde muss die Analyse im FACS-Gerät erfolgen.

2.2.4.6 Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der lytischen Kapazität von zytotoxischen T-Zellen

Die Zytotoxizität der generierten CTLs wird mit dem Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche quantifiziert. Der Test basiert auf der Detektion der Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH), welche aus den geschädigten Zielzellen freigesetzt wird. Die Aktivität der LDH wird durch eine enzymatische Reaktion gemessen: Im ersten Schritt wird Lactat zu Pyruvat umgesetzt und dabei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Im zweiten Schritt transferiert der Katalyst (Diaphorase) H/H^+ von NADH/H^+ auf das Tetrazoliumsalz INT, welches dadurch zu Formazan reduziert wird. Dieser Farbstoff ist wasserlöslich und zeigt, im Gegensatz zu INT, ein breites Absorptionsmaximum bei 500 nm. Eine Erhöhung der Menge an toten oder Membran-geschädigten Zellen resultiert in einer Erhöhung der Enzymaktivität im Zellkulturüberstand. Diese Aktivitätserhöhung korreliert direkt mit der Bildung des Farbstoffs Formazan, welche mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen werden.

2.2.4.6.1 Bestimmung der optimalen Zielzellendichte für den Zytotoxizitätsassay

Die optimale Zelldichte der entsprechenden Zielzellen muss für jede Zelllinie zunächst bestimmt werden. Dazu werden die Zellen in verschiedenen Konzentrationen in 96-Lochplatten ausgesät. Nach 2-3 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel mit 200 μl Assay-

Medium (RPMI + 1% humanes AB-Serum, 200mM Glutamin) (LowControl). Für die Bestimmung der „High Control“ werden die Zellen mit 1% Triton X-100 inkubiert. Als „Background Control“ wird nur 200 µl Assay-Medium in die 96 Lochplatten gefüllt. Alles erfolgt in Triplikaten. Nach 16 h Inkubation im Brutschrank wird die 96-Lochplatte bei 250g für 10 min zentrifugiert (Minifuge T; Hereaus) und 100 µl des Überstandes in eine plane 96 Lochplatte überführt. Anschließend wird die Lösung der Flasche 1 mit der Lösung der Flasche 2 des Kits im Verhältnis 22,5:1 vermischt und sofort 100µl pro Loch zu dem Zellkulturüberstand gegeben. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln für 20-30 min. Dann wird die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge beträgt 620 nm. Die Differenz der Werte dieser beiden Wellenlängen werden zur Auswertung des Versuches eingesetzt. Es wird die Zelldichte eingesetzt, bei welcher die Differenz zwischen „High control“ und „Low control“ am größten ist.

2.2.4.6.2 Bestimmung der lytischen Kapazität von zytotoxischen T-Zellen

Werden adhärenente Zelllinien als Zielzellen eingesetzt, werden diese vor Beginn des Assays in 96-Lochplatten in der vorher bestimmten Dichte ausgesät. Nachdem die Zellen sich abgesetzt haben, erfolgt ein Mediumwechsel. Pro 96-Loch werden 100 µl Assay-Medium hinzugegeben (RPMI + 1% humanes AB-Serum, 200mM Glutamin). Folgende Kontrollen werden eingesetzt (s. Tabelle 2.17):

Hintergrundkontrolle: Assay-Medium

Low control: Zielzellen in Assay-Medium (spontane LDH-Freisetzung)

High control: Zielzellen in 1% Triton X-100-Lösung (max. LDH-Freisetzung)

Substance control: Effektorzellen in Assay-Medium

Experimental Setup: Effektorzellen mit Zielzellen.

Die CTLs (Effektorzellen) werden geerntet, gewaschen und in Assay-Medium aufgenommen. Jeweils 100µl der Zellen werden zu den Zielzellen gegeben. Insgesamt werden pro Loch 200 µl Medium gefüllt.

Tabelle 2.17: Ansätze für Zytotox-Assay.

Inhalt	Hintergrund-kontrolle	Low control	High control	Substance control	experimental Setup
Assay-Medium	200 µl	100 µl	-	100 µl	-
Zielzellen	-	100 µl	100 µl	-	100 µl
Triton X-100 Lösung (2% in Assay-Medium)	-	-	100 µl	-	-
Effektorzellen	-	-	-	100 µl	100 µl

Nach 16h erfolgt die Analyse des Zellüberstandes wie in 2.2.4.6 beschrieben. Die Zytotoxizität der verwendeten CTLs werden über folgende Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität} = \frac{(\text{Experimental Setup} - \text{substance control}) - \text{low control}}{\text{High control} - \text{low control}} \times 100$$

2.2.4.7 Bestimmung der Zytokinproduktion von dendritischen Zellen mittels eines Zytokin-Arrays

Mit Hilfe des hier verwendeten Zytokin-Arrays (RayBio) können mehrere Zytokine im Überstand gleichzeitig und mit hoher Sensitivität detektiert werden. Bei diesem Assay sind Antikörper gegen verschiedene Zytokine auf einer Membran immobilisiert. Die zu analysierende Probe wird auf die Membran gegeben. Nach mehrmaligem Waschen werden Antikörper hinzugegeben, welche ebenfalls an die Zytokine binden und mit Biotin markiert sind. Erneut wird gut gewaschen und anschließend Streptavidin, welches mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist hinzugegeben. Das Streptavidin binden an die biotinylierten Antikörper. Nach Zugabe eines Reagenz, welches von der Peroxidase umgesetzt wird, erfolgt die Detektion mit Hilfe eines Röntgenfilms oder mit einem Chemilumineszenz Imagingsystem. Die Membranen können bei -20°C oder -80°C gelagert werden.

Mit Hilfe des Zytokin-Arrays wurden die Zytokine im Überstand von reifen dendritischen Zellen analysiert. Dazu wurden Monozyten wie in 2.2.3.9.2 beschrieben mit dem Vektor [SIV_{4xko-Mart}Vpx(VSV)] mit einer MOI von 1 transduziert und zu mDCs maturiert. Dann wurden die transduzierten und untransduzierten Zellen gewaschen und mit RPMI mit 1% humanem AB-Serum und 200 nM Glutamin über Nacht inkubiert. Das Medium wurde am nächsten Tag abgenommen, zentrifugiert (3.500 rpm, 5 min, 4°C; Heraeus Tischzentrifuge) und nach Angaben des Herstellers im Zytokin-Array analysiert.

2.2.4.8 Bestimmung der Zytokinproduktion mittels eines IFN- γ -, TNF- α - und GM-CSF-ELISAs (Enzyme linked immunosorbent assay)

Die hier verwendeten ELISAs sind sogenannte Sandwich-ELISAs. Dabei werden zwei Antikörper verwendet, welche beide das jeweilige Antigen erkennen. Der erste Antikörper ist an eine feste Phase gebunden, meistens eine spezielle 96-Lochplatte. Der zu testende

Überstand wird in die Löcher gegeben und das enthaltende Antigen bindet an den Antikörper. Nachdem mehrmals gewaschen wurde, wird der zweite Antikörper dazugegeben. Er erkennt ein anderes Epitop des Antigens, dadurch entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, daher stammt der Name Sandwich-ELISA. Der zweite Antikörper ist an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nachdem mehrmaligen Waschen wird eine chromogene Lösung hinzugegeben. Das darin enthaltene Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), wird von der Peroxidase in einen blauen Farbstoff umgesetzt. Die entstehende Menge ist direkt proportional zu der Antigenmenge und kann in einem ELISA-Reader bestimmt werden.

Die ELISAs wurden hier zu Bestimmung von IFN- γ , TNF- α und GM-CSF im Überstand von geprimten CD8⁺T-Zellen eingesetzt. Dazu wurden die generierten CTLs (2.2.3.10.1) 1:1 mit 1×10^4 Melanomzellen (Tabelle 2.11), welche 3 Stunden zuvor in 96-Lochplatten ausgesät wurden, gemischt. Die Zellen wurden in 300 μ l RPMI mit 1% humanem AB-Serum und 200 mM Glutamin inkubiert. Nach 16 Stunden wurde die 96-Lochplatte zentrifugiert (1.200 rpm, 10 min, 25°C; Hereaus Minifuge T), der Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert, bis die ELISA-Analyse durchgeführt wurde.

2.2.4.9 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Mit Hilfe dieser Färbemethode können bestimmte Zellstrukturen farblich sichtbar gemacht werden. Dadurch können verschiedene Zelltypen anhand ihrer charakteristischen Morphologie identifiziert werden. Die Zellkerne erscheinen purpurrot, das Zytoplasma wird meist bläulich bis violett dargestellt. Da die Farbgebung pH-abhängig ist, eignet sich die Methode besonders gut, um granuläre Strukturen anzufärben. Basophile Granula erscheinen blau bis violett, saure Granula rot und neutrale Granula nehmen eine leichte rötliche Färbung an.

Um die adhärennten Zellen zu färben, werden sie zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie mit der May-Grünwald-Lösung bedeckt. Nach 5 min Inkubation wird die Lösung abgenommen, gründlich mit H₂O gewaschen und getrocknet. Im 2. Schritt erfolgt die Färbung mit der Giemsa-Lösung. Die Lösung wird 1:20 mit H₂O verdünnt und für 20 min mit den Zellen inkubiert. Erneut wird das Zellpräparat gründlich gewaschen und getrocknet. Die gefärbten Zellen können nun im Mikroskop betrachtet werden.

3. Ergebnisse

In der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu HIV-1-abgeleiteten Vektoren der SIV_{smm}PBj-abgeleitete Vektor sehr effizient in der G₀-Phase des Zellzyklus arretierte humane Fibroblasten, sowie primäre, ruhende Monozyten transduzieren kann. Es wurden auch bereits die Transduktionseigenschaften der beiden lentiviralen Vektoren auf humanen CD4⁺-T-Lymphozyten getestet. Hier konnte jedoch kein Vorteil des SIV_{smm}PBj-Vektors beobachtet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Transduktionseigenschaften des SIV_{smm}PBj-Vektors auf weiteren primären ruhenden Zellen zu testen, welche für gentherapeutische Anwendungen interessante Ziele darstellen und welche mit den bisherigen lentiviralen Vektoren nur unzureichend oder erst nach Stimulierung transduzierbar sind. Für den Einsatz in therapeutischen Anwendungen ist es jedoch wünschenswert, eine Veränderung des Aktivierungszustandes der Zielzellen zu vermeiden.

Für die Analyse der Transduktionseigenschaften des SIV_{smm}PBj-Vektors wurden zunächst hämatopoetische Stammzellen, primäre humane B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen getestet. Besonders hämatopoetische Stammzellen sind ein attraktives Ziel, da sie die Vorläufer aller Zellen des Blutes sind. Auch dendritische Zellen (DCs) sind interessante Zielzellen für die Gentherapie, da sie die zentrale Rolle im Immunsystem einnehmen. Schließlich wurde die Transduktionseffizienz des SIV_{smm}PBj-Vektors auf murinen und simianen Monozyten analysiert, da sich daraus wichtige Tiermodelle entwickeln lassen könnten.

Die Genomstruktur der in dieser Arbeit eingesetzten lentiviralen Vektoren sind in Abb. 3.1 schematisch dargestellt. Die Plasmide pPBj- Δ env-EGFP7 und pPBj- Δ env-4xko-EGFP sind abgeleitet von SIV_{smm}PBj, pNL₄₋₃ Δ env-EGFP von HIV-1 NL4-3 und pRod- Δ env-EGFP von HIV-2 RodA. In allen Vektorplasmiden war das *env*-Gen deletiert, in den Plasmiden pPBj- Δ env-EGFP7, pPBj- Δ env-4xko-EGFP und pNL₄₋₃ Δ env-EGFP war eine CMV-*egfp*-Expressionskassette in den deletierten *env*-Leserahmen inseriert. Im Plasmid pRod- Δ env-EGFP war ein *egfp*-Gen in den deletierten *nef*-Leserahmen inseriert, dessen Expression über die virale LTR gesteuert wurde. Das Plasmid pPBj- Δ env-4xko-EGFP besaß zusätzlich Mutationen in den Start-ATGs der akzessorischen Gene *vif*, *vpx*, *vpr* und *nef*, wodurch sie nicht mehr exprimiert wurden.

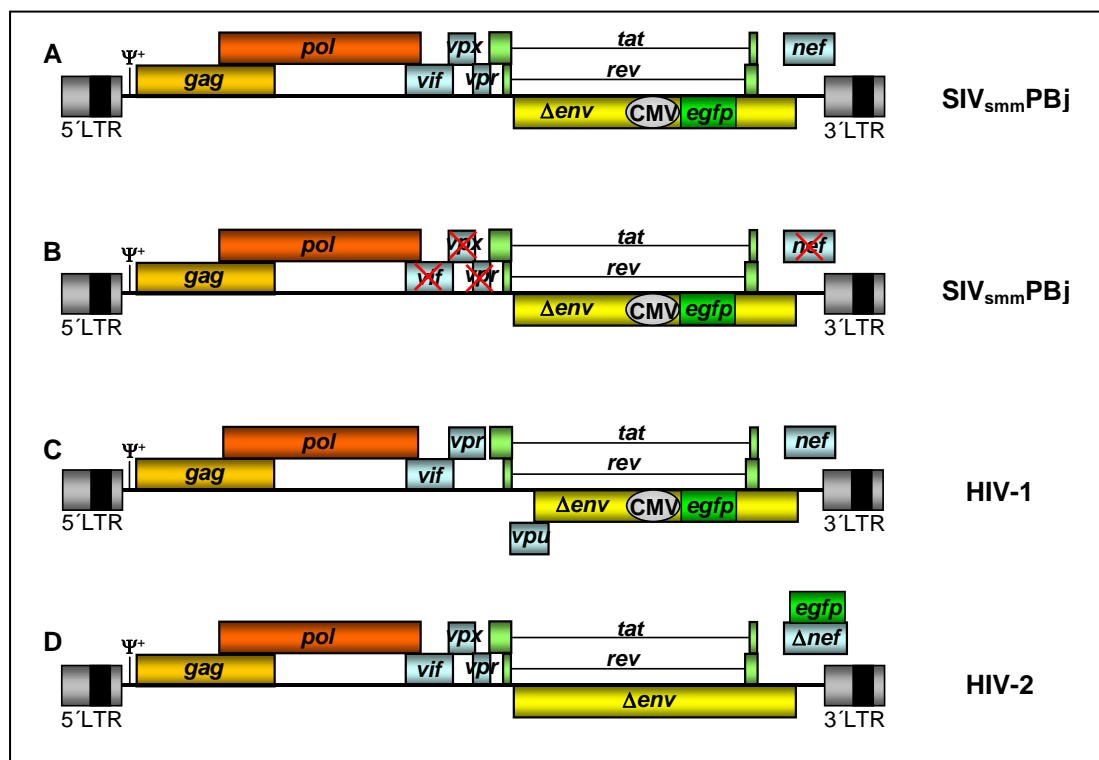


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Genomstruktur der verwendeten lentiviralen Vektoren. A: pPBj- Δ env-EGFP7 – abgeleitet von SIV_{smm}PBj; B: pPBj- Δ env-4xko-EGFP – abgeleitet von SIV_{smm}PBj; C: pNL₄₋₃ Δ env-EGFP – abgeleitet von HIV-1; D: pRod- Δ env-EGFP – abgeleitet von HIV-2.

Die Vektoren wurden durch co-Transfektion in 293T-Zellen mit den jeweiligen Plasmiden und dem Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) generiert. Die mit den Plasmiden aus Abb. 3.1 generierten Vektoren erhielten folgende Bezeichnungen: [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)] (A); [SIV_{4xko-EGFP}(VSV)] (B); [HIV-1_{EGFP}(VSV)] (C); [HIV-2_{EGFP}(VSV)] (D). Wurde zusätzlich zu dem Plasmid pPBj- Δ env-4xko-EGFP und VSV-G ein Vpx-Expressionsplasmid transfiziert, wurde der resultierende Vektor mit [SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)] bezeichnet.

In Tabelle 3.1 sind die durchschnittlich erzielten Titer der einzelnen Vektoren nach Konzentrierung durch Ultrazentrifugation aufgeführt.

Tabelle 3.1: Durchschnittliche Titer der verwendeten Vektoren.

[SIV _{PBj-EGFP} (VSV)]	[SIV _{4xko-EGFP} (VSV)]	[SIV _{4xko-EGFP} Vpx(VSV)]	[HIV-1 _{EGFP} (VSV)]	[HIV-2 _{EGFP} (VSV)]
3,2x10 ⁷ TU/ml	5,3x10 ⁷ TU/ml	4,3x10 ⁷ TU/ml	4x10 ⁷ TU/ml	9x10 ⁷ TU/ml

3.1 Eignung von SIV_{smm}PBJ-Vektoren zur Transduktion humaner hämatopoetischer Stammzellen

3.1.1 Transduktion von humanen hämatopoetischen Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen sind ein sehr attraktives Ziel für die Gentherapie. Aus ihnen differenzieren die verschiedenen Zellen des Blutes, wie z.B. Lymphozyten, Neutrophile, dendritische Zellen oder Erythrozyten. Wird direkt in diese differenzierten Zellen ein therapeutisches Gen eingebracht, so hängt die Wirkungskdauer des Gens von der begrenzten und mitunter kurzen Lebensdauer dieser Zellen ab. Hämatopoetische Stammzellen besitzen jedoch die Eigenschaft der Selbsterneuerung. Die Zellen können sich teilen, um neue Blutzellen zu bilden, kehren jedoch wieder in einen ruhenden Zustand zurück und können über Jahre im Körper erhalten bleiben. Somit ist nach Transduktion eine kontinuierliche Expression des therapeutischen Gens möglich.

Zunächst sollten die Transduktionseigenschaften der lentiviralen Vektoren auf humanen hämatopoetischen Stammzellen untersucht werden. Anschließend sollte analysiert werden, ob die mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduzierten Zellen *in vitro* und *in vivo* unterschiedliche Differenzierungseigenschaften besitzen. Dazu sollte *in vitro* ein Progenitorassay durchgeführt werden, in welchem die Fähigkeit der Stammzellen zur Bildung von verschiedenen Vorläuferkolonien der einzelnen Blutzelltypen untersucht werden kann. *In vivo* sollte das Knochenmark von NOD/SCID-Mäusen mit den transduzierten Stammzellen repopuliert werden.

Diese Analysen wurden mit Stammzellen aus Nabelschnurblut durchgeführt (CB-HSC). Da diese Zellen jedoch sehr teuer waren, wurden die Transduktionsprotokolle zunächst mit Stammzellen, welche mit M-CSF aus Knochenmark gesunder Spender mobilisiert wurden (mobHSC) durchgeführt. Diese Zellen wurden freundlicher Weise von Frau Dr. Köhl von der Kinderklinik Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Sowohl die Nabelschnurstammzellen als auch die mobilisierten Stammzellen wurden jeweils über den Marker CD34 mittels einer Positivisolierung separiert. Die CD34⁺-Zellen wurden bereits isoliert bezogen und bis zum Versuchsbeginn in flüssigem Stickstoff gelagert. Zusätzlich zu den lentiviralen Vektoren [SIV_{PBJ}-EGFP(VSV)] und [HIV-1_{EGFP}(VSV)] wurden auch die Transduktionseigenschaften des Vektors [HIV-2_{EGFP}(VSV)] getestet.

3.1.1.1 Zeitlicher Verlauf der CD34-Expression der hämatopoetischen Stammzellen während der Kultivierung

Die Stammzellen wurden in Iscove's MDM Medium mit den Zytokinen Flt-3 Ligand, Stammzellfaktor, IL-3 und IL-6 kultiviert. Unter diesen Kulturbedingungen konnten die Zellen über wenige Tage expandiert werden, ohne dass eine Differenzierung der Zellen in einen bestimmten Zelltyp induziert wurde. Solange die Differenzierung noch nicht begonnen hat, exprimieren die Stammzellen den Marker CD34. Da die Transduktion der lentiviralen Vektoren auf Stammzellen untersucht werden sollte, wurde nach dem Auftauen der Zellen für den jeweiligen Versuch, zunächst die Expression des Stammzellmarkers CD34 im FACS-Gerät analysiert. In Abb. 3.2 ist der zeitliche Verlauf der CD34-Expression der CB-HSC direkt nach Auftauen und im Verlauf der Kultivierung gezeigt.

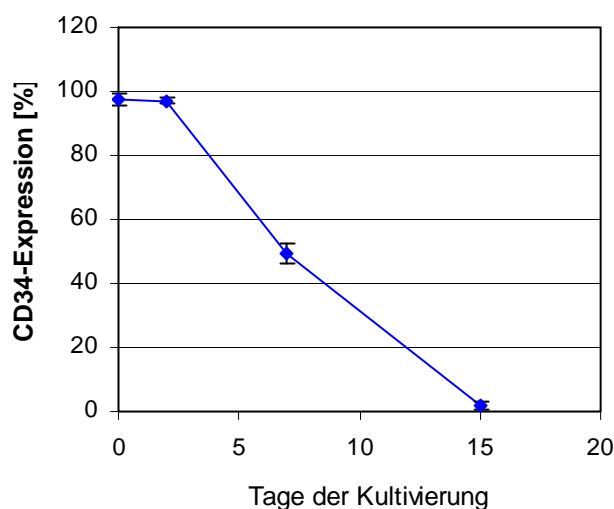


Abb. 3.2: Zeitlicher Verlauf der CD34-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut. Die Expression wurde direkt nach dem Auftauen der Zellen (Tag 0) und im Verlauf der Kultivierung (Tag 2, 7, 15) gemessen. Die CD34-Expression wurde im FACS-Gerät gemessen. Mittelwerte von 2-5 Donoren.

Direkt nach dem Auftauen der Zellen exprimierten nahezu alle Zellen den Stammzellmarker CD34. Nach zwei Tagen in Kultur nahm die Expression langsam ab, an Tag 7 betrug sie knapp 40%. An Tag 15 besaßen nur noch 5% der Zellen den Stammzellmarker. Die restlichen Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt offensichtlich begonnen zu differenzieren. Die CD34-Expression der mobHSC wurde direkt nach dem Auftauen und nach zwei Tagen Kultivierung analysiert. An beiden Tagen konnten auf nahezu allen Zellen der

Stammzellmarker detektiert werden (98% bzw. 97%). Somit exprimierten mehr als 98% der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion (Tag 0) den Stammzellmarker CD34.

3.1.1.2 Transduktionseigenschaften von SIV_{smmPBj} , HIV-2- und HIV-1-Vektoren auf humanen hämatopoetischen Stammzellen

Da die Transduktionseffizienz der lentiviralen Vektoren auf unstimulierten Stammzellen untersucht werden sollte, wurden die Zellen direkt nach dem Auftauen ohne Zytokinzugabe mit einer MOI von 10 mit den jeweiligen Vektoren transduziert. Da auch hier kein Unterschied zwischen mobHSC und CB-HSC festgestellt werden konnte, wurden die mit beiden Zelltypen erzielten Ergebnisse in Abb. 3.3 zusammengefasst.

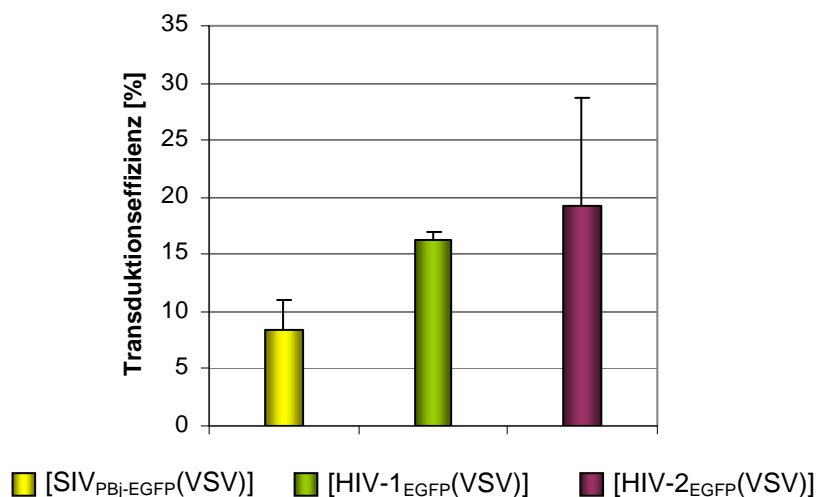


Abb. 3.3: Transduktionseffizienz der verschiedenen Vektoren auf unstimulierten hämatopoetischen Stammzellen. Die Zellen wurden mit den oben genannten Vektoren mit einer MOI von 10 direkt nach dem Auftauen ohne vorherige Zytokinstimulierung transduziert. 7 Tagen später erfolgte die Analyse im FACS-Gerät. Mittelwerte von 4 verschiedenen Donoren.

Der SIV_{smmPBj} -Vektor erreichte auf den Stammzellen eine Transduktionseffizienz von 8,4%, die Vektoren [HIV-2_{EGFP}(VSV)] und [HIV-1_{EGFP}(VSV)] erzielten eine doppelt so hohe Effizienz. Ein signifikanter Vorteil für einen der lentiviralen Vektoren wurde nicht deutlich.

3.1.2 Differenzierungspotenzial von transduzierten hämatopoetischen Stammzellen *in vitro* und *in vivo*

Im zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob die Transduktion der Stammzellen mit den viralen Vektoren das *in vitro*- und *in vivo*-Differenzierungspotenzial beeinflusst. *In vitro* wurde ein Progenitorzellassay durchgeführt, *in vivo* wurde das Knochenmark von NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-}-Mäusen repopuliert. Dafür wurden CB-HSC eingesetzt, da mobHSC *in vivo* eine schlechtere Engraftmentrate besitzen (Ng *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2001). Dazu wurden die Zellen mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduziert und die gleichen Zellen jeweils für die *in vitro*- und *in vivo*-Analyse eingesetzt.

Da die Stammzellen am Paul-Ehrlich-Institut transduziert wurden, der Repopulierungsversuch jedoch am Max-Delbrück-Zentrum in Berlin statt fand, mussten die Zellen zunächst aufgetaut und transduziert werden, um anschließend für den Transport wieder eingefroren zu werden. Dadurch sollte eine Differenzierung der Zellen durch zu langes Kultivieren verhindert werden. Ein kleiner Teil der Zellen wurde für die *in vitro*-Analysen weiterkultiviert und das Differenzierungspotenzial im Progenitorzellassay getestet. Der Großteil der Zellen wurde für den Repopulierungsversuch eingefroren.

Da für einen erfolgreichen EGFP-Nachweis der transplantierten Zellen in den Mäusen eine Transduktionseffizienz von mindestens 10% erzielt werden sollte, musste zunächst das Transduktionsprotokoll optimiert werden, da mit dem bisherigen Protokoll der SIV_{smm}PBj-Vektor eine Effizienz von ca. 8% erzielte.

3.1.2.1 Optimierung des Transduktionsprotokolls zur Erhöhung der Transduktionseffizienz von lentiviralen Vektoren auf hämatopoetischen Stammzellen

Bisher wurden die Zellen direkt nach dem Auftauen einmalig mit einer MOI von 10 transduziert, dabei lag die Transduktionseffizienz des SIV_{smm}PBj-Vektors jedoch unter 10%. Um die Effizienz zu erhöhen, wurden im folgenden mobHSC zweimal an Tag 0 und 1 nach Auftauen mit den drei lentiviralen Vektoren jeweils mit einer MOI von 10 transduziert und 5 Tage später im FACS-Gerät analysiert. Mit dem optimierten Transduktionsprotokoll konnte für den SIV_{smm}PBj-Vektor eine Effizienz von 12% erzielt werden. Für die Vektoren [HIV-1_{EGFP}(VSV)] und [HIV-2_{EGFP}(VSV)] konnte keine Erhöhung erreicht werden. Die Transduktionseffizienzen aller Vektoren lagen nun über 10%.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob das erneute Einfrieren der transduzierten Zellen eine Auswirkung auf die CD34- und EGFP-Expression hatte. Da nur eine begrenzte Menge an CB-HSC zur Verfügung stand, wurde die Analyse nur mit dem HIV-2-Vektor durchgeführt. Dazu wurden CB-Zellen aufgetaut und nach dem optimierten Protokoll mit dem HIV-2-Vektor transduziert. Der größte Teil der Zellen wurde nach dem Einfrierprotokoll (siehe 2.2.3.2.3) behandelt und für 11 Wochen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die CD34- und EGFP-Expression vor dem Einfrieren zu bestimmen, wurden die restlichen nicht eingefrorenen Zellen im FACS-Gerät analysiert. 98,5% der Zellen exprimierten am Einfriertag den Stammzellmarker CD34, nach dem erneuten Auftauen der Zellen 11 Wochen später exprimierten 98% der Zellen diesen Marker. Vor dem Einfrieren betrug die EGFP-Expression der Zellen 15,9%, nach dem erneuten Auftauen 16,3%. Die Viabilität der transduzierten als auch der untransduzierten Zellen betrug nach dem Auftauen noch 60%. Durch das erneute Einfrieren und Auftauen der Zellen ergab sich ein Zellverlust von ca. 40%. Es zeigte sich jedoch weder ein Einfluss auf die CD34-Expression der Stammzellen, noch auf das EGFP-Expressionsniveau der transduzierten Zellen.

3.1.2.2 Einfluss der Transduktion mit lentiviralen Vektoren auf das Differenzierungspotenzial hämatopoetischer Stammzellen *in vitro*

Die Transduktion der CB-HSC mit den lentiviralen Vektoren für die Analyse des Differenzierungspotenzials erfolgte in zwei Experimenten, um die großen Ansätze besser handhaben zu können. Im ersten Experiment wurden Zellen mit dem HIV-2-Vektor transduziert, im zweiten erfolgte die Transduktion mit dem SIV_{smm}PBj- und HIV-1-Vektor. Die Negativkontrolle für den HIV-2-Vektor wurde mit Negativkontrolle I und die für die Vektoren SIV_{smm}PBj und HIV-1 mit Negativkontrolle II gekennzeichnet. Es wurden für jeden Vektor, sowie für die Negativkontrolle jeweils 3×10^6 CB-Zellen eingesetzt. In Abb. 3.4 ist der Ablauf der Transduktionsexperimente graphisch dargestellt.

Der größte Teil der Zellen wurden wie beschrieben transduziert und eingefroren. Ein kleinerer Teil der Zellen wurde für die Bestimmung der CD34- und CD38-Expression direkt nach dem Auftauen und nach zwei Tagen Kultivierung verwendet. Am Tag 2 wurden pro Ansatz 500 Zellen für den Progenitorzellassay eingesetzt. Die restlichen Zellen wurden für 5 weitere Tage kultiviert, um die Transduktionseffizienz bestimmen zu können.

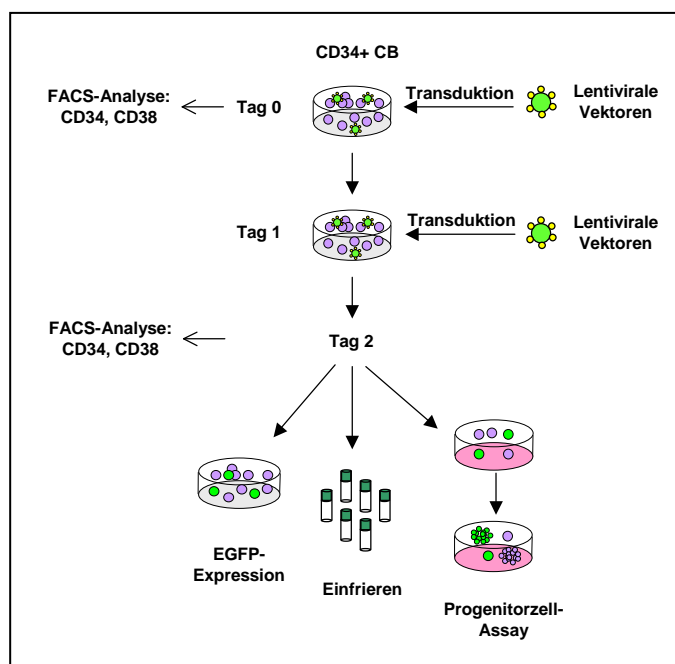


Abb. 3.4: Graphische Übersicht der Transduktionsexperimente. An Tag 0 und 1 nach dem Auftauen wurden die CB-HSC mit je einer MOI von 10 mit den lentiviralen Vektoren transduziert. An den Tagen 0 und 2 erfolgte die Analyse der CD34- und CD38-Expression im FACS-Gerät. An Tag 2 wurde der Großteil der Zellen eingefroren, die restlichen Zellen wurden im Progenitorzellassay eingesetzt bzw. für die EGFP-Analyse für 5 Tage weiter kultiviert.

3.1.2.2.1 Einfluss der Transduktion auf die Oberflächenmarkerexpression von hämatopoetischen Stammzellen

Sowohl direkt nach dem Auftauen (Tag 0), als auch am Einfriertag (Tag 2) wurden die Marker CD34 und CD38 im FACS-Gerät analysiert. Die Daten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: CD34- und CD38-Expression der CB-Stammzellen vor und nach Transduktion.

Marker	CD34 ⁺ [%]		CD38 ⁺ [%]		CD34 ⁺ CD38 ⁺ [%]	
	Tag 0	Tag 2	Tag 0	Tag 2	Tag 0	Tag 2
Probe						
Negativkontrolle I	98,7	98	97,2	92,9	95,7	98,9
[HIV-2 _{EGFP} (VSV)]	97,8	97,8	98,2	98,2	95,9	95,9
Negativkontrolle II	95,6	96,7	98,3	95,6	96,2	91
[SIV _{PBJ-EGFP} (VSV)]	98,9	98	98,8	96,6	97,5	94,4
[HIV-1 _{EGFP} (VSV)]	97,8	95,7	98,1	96,9	97,6	93,9

Die FACS-Analysen der Oberflächenmarker unterscheiden sich kaum zwischen den beiden Tagen. Auch durch die Transduktion mit den lentiviralen Vektoren konnte kein Unterschied in der CD34- bzw. CD38-Expression in den verschiedenen Ansätzen gemessen werden.

Sowohl an Tag 0 als auch an Tag 2 nach dem Auftauen zeigten zwischen 99% und 96% aller Zellen eine Expression des Stammzellmarkers CD34. Die Expression des Markers CD38 war ebenso nahezu unverändert und lag zwischen 99 und 93% an Tag 0 bzw. 2.

Dies zeigt, dass nach zwei Tagen Kultivierung und Transduktion die Stammzellmarker noch exprimiert wurden und die Transduktion mit den lentiviralen Vektoren keinen Einfluss auf die Expression hatte.

3.1.2.2.2 Transduktionseffizienz der verschiedenen Vektoren auf Stammzellen aus Nabelschnurblut

Um die Transduktionseffizienz der Vektoren auf Stammzellen, welche für die Repopulierung der Mäuse eingesetzt werden sollten, zu analysieren, wurde ein kleiner Teil der transduzierten Zellen für weitere 5 Tage kultiviert und anschließend im FACS-Gerät analysiert. Die Transduktionseffizienzen sind in Abb. 3.5 dargestellt.

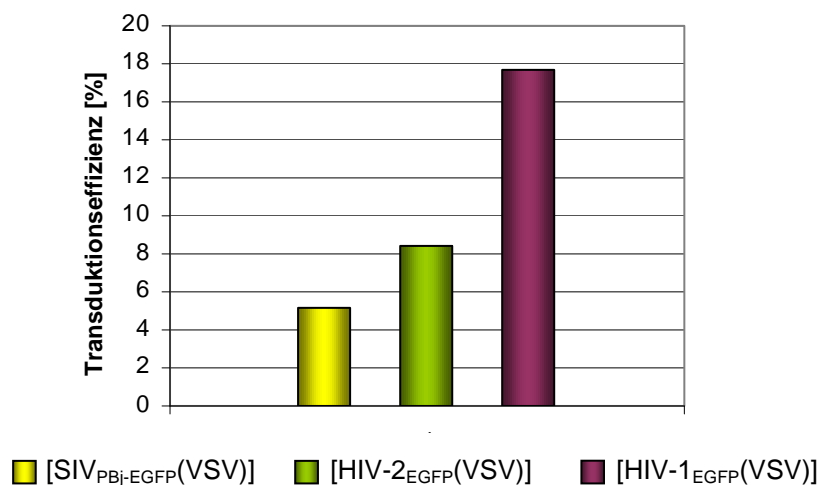


Abb. 3.5: Transduktionseffizienz der lentiviralen Vektoren auf Stammzellen aus Nabelschnurblut. Die Transduktion mit den genannten Vektoren erfolgte zweimal an Tag 0 und 1 nach dem Auftauen mit je einer MOI von 10. 5 Tage nach Transduktion wurden die EGFP-Expression der Zellen im FACS-Gerät analysiert.

Die mit den SIV_{smm}PBj- und HIV-1-Vektoren transduzierten Stammzellen lagen unter den geforderten 10%. Die Zellen wurden trotzdem für die Repopulierung der Mäuse und im Progenitorzellassay eingesetzt, da nur eine beschränkte Anzahl der teuren Stammzellen zur Verfügung stand.

3.1.2.2.3 *In vitro*-Analyse des Differenzierungspotenzials von transduzierten Stammzellen im Progenitorzellassay

In einem Progenitorzellassay kann das Differenzierungspotenzial von Stammzellen *in vitro* untersucht werden. In diesem Assay wird die Fähigkeit der Stammzellen analysiert, in die verschiedenen Vorläuferzellen der Zellen des Blutes differenzieren zu können. Das Assay-Medium enthielt Zytokine für die Differenzierung in Makrophagen-, Granulozyten- und Erythrozytenvorläufer. Die lymphoide Linie kann in diesem Assay jedoch nicht beobachtet werden, da die Zellen bevorzugt zu den anderen Zelltypen differenzieren. Eine Stammzelle bildet eine sogenannte Kolonie, welche aus mehr als 50 Zellen besteht. Nur diejenigen Stammzellen besitzen die Fähigkeit Kolonien zu bilden, welche sich noch teilen können. Sie haben die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und sind noch pluripotent.

Die Stammzellen wurden nach zwei Tagen Kultivierung in dem Progenitorssay eingesetzt. Die aus den Nabelschnurstammzellen differenzierten verschiedenen Kolonietypen sind in Abb. 3.6 gezeigt.

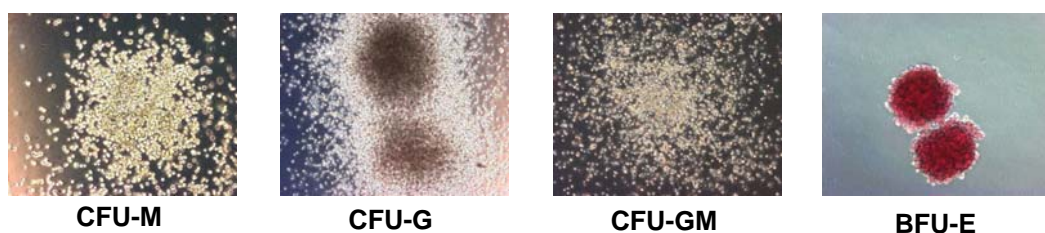


Abb. 3.6: Differenzierungspotenzial von CB-HSC im Progenitorzellassay. CB-HSC wurden 2 Tage in Stammzellmedium kultiviert und dann ca. 14 Tage in Assay-Medium kultiviert. Anschließend wurden die verschiedenen Kolonietypen gezählt und ausgewertet. CFU-M: Colony forming unit-macrophage; CFU-G: Colony forming unit-granulocyte; CFU-GM: Colony forming unit-granulocyte, macrophage; BFU-E: Blast forming unit-erythroid. 50-fache Vergrößerung.

Im Progenitorzellassay konnte die Differenzierung der Stammzellen in alle Kolonietypen beobachtet werden: Makrophagen- (CFU-M), Granulozyten- (CFU-G), Erythrozytenkolonien (BFU-E) und eine Mischform der Makrophagen- und Granulozytenvorläufer, die gemischten myeloiden Kolonien (CFU-GM). Die Kolonietypen können anhand ihrer charakteristischen Morphologie unterschieden werden. Wie in Abb. 3.6 deutlich zu erkennen ist, bestehen die Makrophagenkolonien im Gegensatz zu den Granulozytenkolonien aus viel größeren Zellen. Die erythroiden Kolonien sind eindeutig durch ihren roten Farbstoff (Hämoglobin) zu identifizieren.

Um das Differenzierungspotenzial der mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduzierten Stammzellen zu analysieren, wurden am Einfriertag je Ansatz 500 Zellen in einem Progenitorzellassay eingesetzt. Pro Ansatz wurden je 3 Platten ausgesät und nach 14 Tagen durch Auszählen der verschiedenen Kolonietypen ausgewertet.

In Tabelle 3.3 ist die gesamte Kolonienanzahl der mit den verschiedenen Vektoren transduzierten Zellen zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Anzahl verschiedenen Kolonietypen der transduzierten Stammzellen im Progenitorzellassay.

Probe	Kolonietyp				
	BFU-E	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	gesamt
Negativkontr. I	129	3	29	0,7	162
[HIV-2 _{EGFP} (VSV)]	123	6	17	2,3	149
Negativkontr. II	125	5	95	0,7	226
[SIV _{PBJ-EGFP} (VSV)]	147	15	104	2	266
[HIV-1 _{EGFP} (VSV)]	104	3	30	0,3	137

In Abb. 3.7 ist die relative Kolonienverteilung dargestellt. Die Kolonienzahl der jeweiligen Negativkontrolle wurde auf eins gesetzt und die der transduzierten Zellen in Relation dazu.

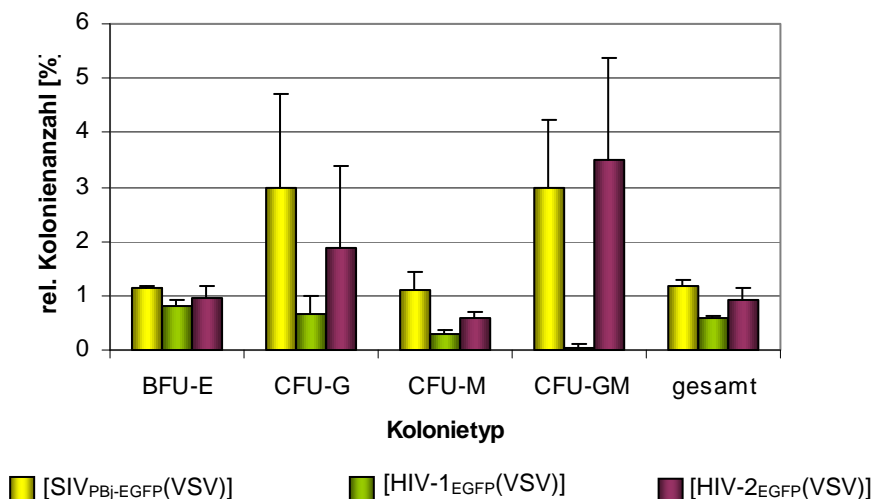


Abb. 3.7: Rel. Kolonienzahl nach Differenzierung von transduzierten Stammzellen. CB-HSC wurden mit den genannten Vektoren transduziert und in Progenitorzellassay für 2 Wochen kultiviert. Die verschiedenen Kolonietypen wurden gezählt, die Kolonienzahl der jeweiligen Negativkontrollen auf eins gesetzt und die Kolonienzahl der transduzierten Zellen in Relation dazu. Mittelwerten aus drei Ansätzen.

Es zeigte sich, dass die mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduzierten Stammzellen im Progenitorzellassay unterschiedliche Differenzierungseigenschaften besaßen. Im Vergleich zur Negativkontrolle bildeten mit dem SIV_{smm}PBj-Vektor transduzierte Stammzellen im Progenitorzellassay mehr Kolonien. Besonders deutlich wird dies für die Anzahl der granulozytären Vorläuferkolonien (CFU-G) und für die gemischten myeloiden Kolonien (CFU-GM).

Mit dem HIV-1-Vektor transduzierte Zellen zeigten das gegenteilige Verhalten. Im Vergleich zur Negativkontrolle wurden weniger Kolonien gebildet (40%). Zellen, welche mit dem HIV-2-Vektor transduziert wurden, differenzierten bevorzugt zu Granulozytenvorläufern (CFU-G) und in die myeloiden Mischkolonie aus (CFU-GM). Aufgrund einer sehr geringen Anzahl dieses Kolonietyps ist die Aussagekraft der Auswertung jedoch niedrig. Die Differenzierung der Stammzellen in die erythroide Vorläuferkolonie (BFU-E) schien durch die Transduktion nicht beeinflusst zu sein.

In Abb. 3.8 ist die EGFP-Expression der Kolonien im gleichen Progenitorassay gezeigt. Auffällig ist, dass die Kolonien die höchste Transgenexpression aufweisen, die aus mit HIV-1-Vektoren transduzierten Zellen differenzierten. Besonders erythroide Kolonien exprimierten das EGFP Protein. Im Gegensatz dazu exprimierten kaum Kolonien dieses Typs EGFP, welche aus mit dem HIV-2-Vektor transduzierte Zellen differenzierten. Hingegen exprimierten nur die granulozytären Kolonien (CFU-G) EGFP, welche aus den mit HIV-2-Vektoren

behandelten Zellen differenzierten. Insgesamt exprimierten 2% der Kolonien EGFP nach Transduktion der Zellen mit dem HIV-2-Vektor.

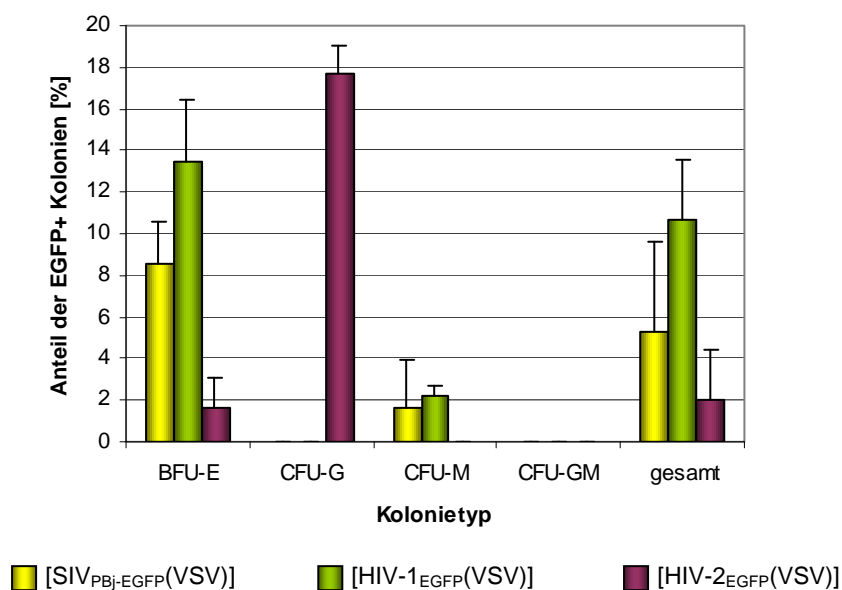


Abb. 3.8: Anteil der EGFP⁺-Kolonien im Progenitorzellassay. CB-HSC wurden mit den genannten Vektoren transduziert und im Assaymedium für zwei Wochen kultiviert. Die verschiedenen Kolonietypen wurden gezählt und die EGFP-Expression analysiert. Mittelwerten aus drei verschiedenen Ansätzen.

Nach Transduktion mit dem SIV_{smm}PBJ-Vektor exprimierten ca. 5% der Gesamtkolonien das EGFP Protein. Keine grün-fluoreszierenden Zellen konnten für die myeloiden Mischkolonien (CFU-GM) gezählt werden.

Mit Hilfe des Progenitorzellassays wurde *in vitro* also ein unterschiedliches Differenzierungspotenzial der mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduzierten hämatopoetischen Stammzellen gezeigt.

Im nächsten Schritt wurden das Differenzierungspotenzial und EGFP-Expression der Stammzellen *in vivo* untersucht.

Die in den folgenden Kapiteln 3.1.3 - 3.1.3.3 beschriebenen Versuche und Analysen wurden am Max-Delbrück-Zentrum von Herrn Dr. Eckert und Frau Keil durchgeführt.

3.1.3 Analyse der transduzierten Stammzellen nach Repopulierung von NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-}-Mäuse

An Tag 0 des Repopulierungsversuches wurden NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-}-Mäuse mit 1,6Gy bestrahlt. Anschließend erfolgte die intravenöse Zelltransplantation der CB-HSC. Pro Versuchstier wurden $4-6 \times 10^5$ Zellen appliziert, pro Gruppe wurden 5 Mäuse eingesetzt. Damit eine ausreichende Zellzahl zur Verfügung stand, wurden die beiden Negativkontrollen I und II in einer Gruppe zusammengefasst. In Tabelle 3.4 ist die Verteilung der Gruppen aufgeführt.

Tabelle 3.4: Gruppenverteilung der Mäuse im Repopulierungsexperiment.

Gruppe	Behandlung	Zelldosis/Maus
A	PBS	-
B	[HIV-2 _{EGFP} (VSV)] ¹	6×10^5
C	[HIV-1 _{EGFP} (VSV)] ¹	4×10^5
D	[SIV _{PBJ-EGFP} (VSV)] ¹	5×10^5
E	Negativkontrolle ²	6×10^5

¹ CB-HSC wurden mit entsprechenden Vektor transduziert.

² untransduzierte CB-HSC

An Tag 46 wurden zwei Tiere pro Gruppe und an Tag 87 drei Tiere pro Gruppe getötet und Proben des Knochenmarks, Blut, Leber und Milz entnommen. Bei allen Auswertungen wurde zuerst der Blindwert der Gruppe A abgezogen. Falls bei der Kontrollgruppe E noch positive Werte bezüglich EGFP gemessen wurden, so wurde der Mittelwert gebildet und von den Werten der Gruppen B, C und D abgezogen.

3.1.3.1 Engraftment und EGFP-Expression der transplantierten Stammzellen

Das Engraftment wurde mit der Analyse der humanen Marker CD45 und HLA-I nachgewiesen, da alle applizierten Zellen diese Marker exprimieren. Die Daten des Engraftments im Knochenmark sind in Abb. 3.9 graphisch dargestellt. An Tag 46 lag die Expression beider Marker in den Gruppen C ([HIV-1_{EGFP}(VSV)]) und E (Negativkontrolle) um ca. 20% niedriger als die der anderen Gruppen. Am zweiten Messtag stieg die Expression aller Gruppen an (über 50%), wobei in der Gruppe D ([SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)]) mit 66% der höchste Wert gemessen wurde.

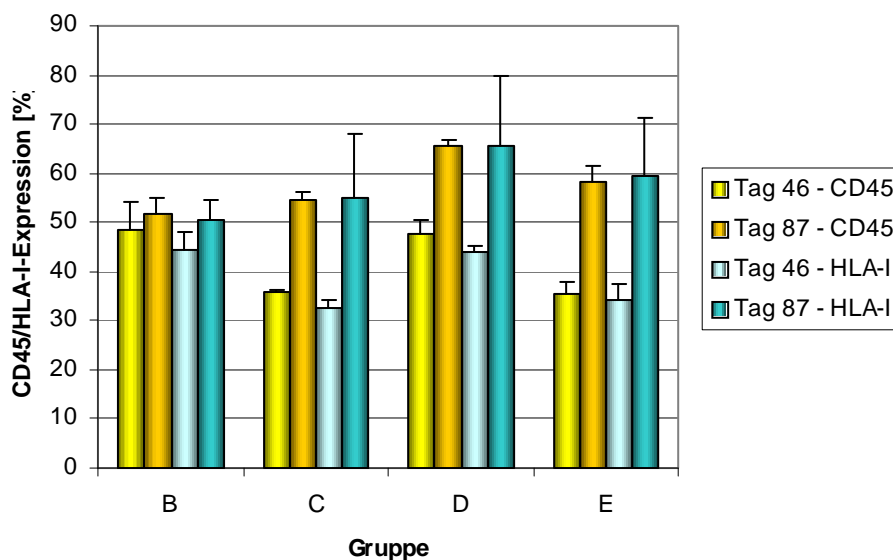


Abb. 3.9: Engraftment der transplantierten Stammzellen im Knochenmark. Gemessen wurden die humanen Marker CD45 und HLA-I an den Tagen 46 und 87 im FACS-Gerät. B: [HIV-2_{EGFP}(VSV)]; C: [HIV-1_{EGFP}(VSV)]; D: [SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)]; E: Negativkontrolle.

An den Tagen 46 und 87 erfolgte auch die Analyse der EGFP-Expression im Knochenmark. In Tabelle 3.5 ist die EGFP-Expression der transplantierten Zellen zusammengefasst. Eine EGFP-Expression war nur im Knochenmark am Tag 46 auf sehr wenigen Zellen der Gruppen B ([HIV-2_{EGFP}(VSV)]), C ([HIV-1_{EGFP}(VSV)]) und D ([SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)]) messbar. An Tag 87 konnten nur bei Gruppe B ([HIV-2_{EGFP}(VSV)]) GFP-exprimierende Zellen detektiert werden.

Tabelle 3.5: EGFP-Expression der transduzierten und transplantierten Stammzellen im Knochenmark. Gemessen wurden in den jeweiligen Gruppen die doppeltpositiven Zellen, welche neben den Markern CD45 oder HLA-I auch EGFP exprimierten. Die Analyse erfolgte im FACS-Gerät and den Tagen 46 und 87.

Gruppe	B		C		D		E	
	46	87	46	87	46	87	46	87
GFP/HLA-I	0,21	0,11	0,16	0	0,14	0	0	0
GFP/CD45	0	0,16	0,15	0	0	0	0	0

B: [HIV-2_{EGFP}(VSV)]; C: [HIV-1_{EGFP}(VSV)]; D: [SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)]; E: Negativkontrolle

Insgesamt zeigte zu beiden Messpunkten nur ein kleiner Anteil der CD45- und HLA-I-positiven Zellen auch eine EGFP-Expression.

3.1.3.2 CD34-Stammzellmarkerexpression in NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-}-Mäusen

Da die Expression von CD34 mit Stammzeleigenschaften, wie die Fähigkeit zur Bildung von Zellen des Blutes verbunden ist, wurde die Expression auf den applizierten Zellen an den Tagen 46 und 87 im FACS-Gerät analysiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob die CD34⁺-Zellen auch EGFP exprimierten. An Tag 46 wurde nur ein Tier pro Gruppe analysiert. Der CD34-Marker wurde nur im Knochenmark untersucht, da hier die höchsten Engraftmentraten gemessen wurden. Die Daten sind in Abb. 3.10 gezeigt.

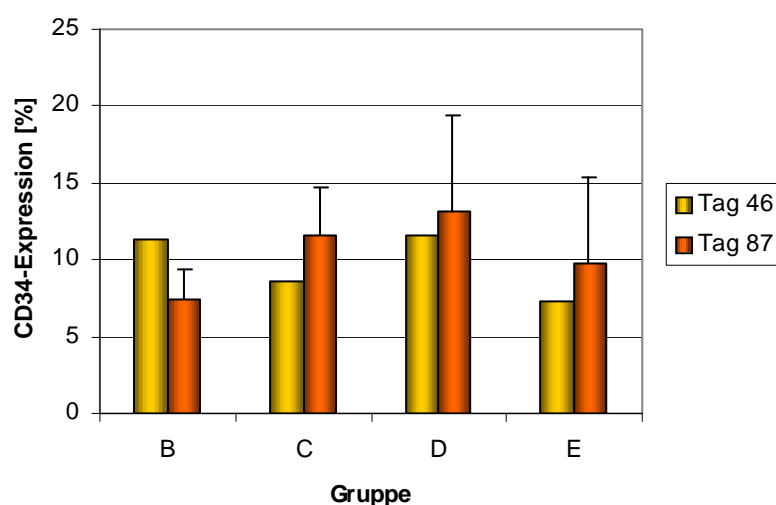


Abb. 3.10: CD34-Expression von transduzierten Stammzellen nach Transplantation. An den Tagen 46 und 87 wurde die CD34-Expression der Knochenmarkzellen der verschiedenen Gruppen (B-E) im FACS-Gerät analysiert. B: [HIV-2_{EGFP}(VSV)]; C: [HIV-1_{EGFP}(VSV)]; D: [SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)]; E: Negativkontrolle.

Die Expression des Markers CD34 war an Tag 46 in der Gruppe E (Negativkontrolle) mit 7% am geringsten, Gruppe D ([SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)]) zeigte mit 13% die höchste Expression. Die Expression der Gruppen C, D und E nahm am 2. Messpunkt um ca. 4% zu, die Expression der Gruppe B sank auf 7%. Zu beiden Messzeitpunkten zeigte die Gruppe D ([SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)]) die höchste Expression des Stammzellmarkers. Der Stammzellmarker CD34 war in allen Gruppen detektierbar, die CD34⁺-Zellen zeigten jedoch zu keinem Zeitpunkt eine EGFP-Expression.

3.1.3.3 *In vivo*-Differenzierungspotenzial von transduzierten und transplantierten CD34⁺-Zellen in der NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-}-Maus

Um das Differenzierungspotenzial der transplantierten Stammzellen *in vivo* zu analysieren, wurden die folgenden humanspezifischen Oberflächenmarker im FACS-Gerät gemessen: CD45 (Leukozyten), CD14 (Monozyten) und CD4 (T-Zellen). Die Markerexpression wurde nur im Mausknorpelmark untersucht, da hier die höchste Engraftmentraten gemessen wurden. Der Einfluss der Vektorsysteme auf die *in vivo* Differenzierung der transplantierten CD34⁺-Stammzellen im Mausknorpelmark ist in Abb. 3.11 dargestellt.

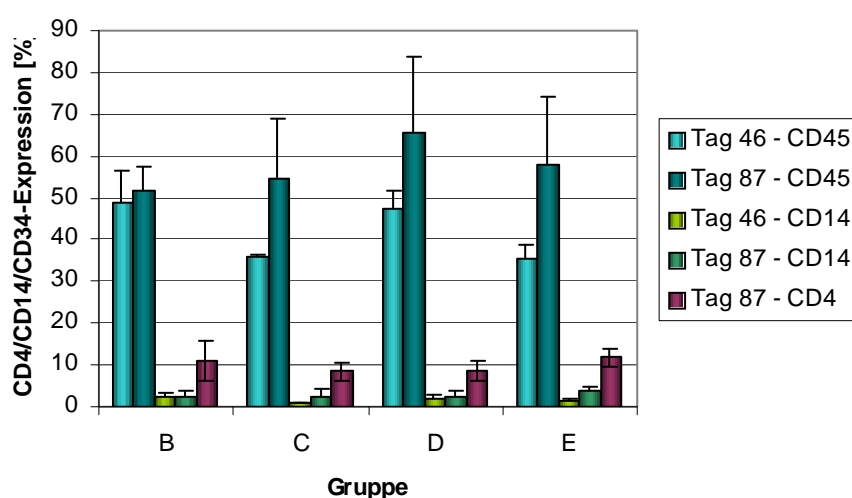


Abb. 3.11: Differenzierungspotenzial der transduzierten Stammzellen nach Transplantation.

Gemessen wurden die humanen Marker CD14 und CD45 auf Zellen im Knochenmark an den Tagen 46 und 87. Die Expression von CD4 wurde nur an Tag 87 untersucht. B: [HIV-2_{EGFP}(VSV)]; C: [HIV-1_{EGFP}(VSV)]; D: [SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)]; E: Negativkontrolle.

Im Vergleich zur Negativkontrolle konnten am Tag 46 in den Gruppen B und D mehr CD45⁺-Zellen detektiert werden, das Expressionsniveau an Tag 87 der verschiedenen Gruppen – bis auf Gruppe B ([HIV-2_{EGFP}(VSV)]) - erhöhte sich jeweils um ca. 20%. Der Anteil an CD45⁺-Zellen in Gruppe B unterschied sich an beiden Messpunkten kaum. Der Monozytenmarker CD14 konnte bei allen Gruppen nur auf wenigen Zellen detektiert werden (1% - 4%). Der Lymphozytenmarker CD4 wurde nur an Tag 87 gemessen und wurde von den Zellen aller Gruppen gleich stark exprimiert (ca. 10%).

Die Zellen der Gruppe D zeigten zu den verschiedenen Messpunkten meist die höchste Expression der verschiedenen Marker.

Insgesamt wurde kein signifikanter Unterschied in dem *in vivo* -Differenzierungspotenzial der mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduzierten Stammzellen festgestellt. Eine

präferentielle Eignung eines der Vektoren bezüglich des Engraftments und der Zelldifferenzierung ist nicht eindeutig nachweisbar. Es kann allerdings gesagt werden, dass sich die Stammzellen, welche mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduziert wurden, für die Transplantation als geeignet erwiesen.

3.2 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Transduktion humaner B-Lymphozyten

Ruhende humane B-Lymphozyten konnten bisher nur mit einer geringen Effizienz mit lentiviralen Vektoren transduziert werden. Nun sollte getestet werden, ob der SIV_{smm}PBj-Vektor Transduktionsvorteile gegenüber einem HIV-1-abgeleiteten Vektor für B-Zellen besitzt.

3.2.1 Isolierung und Kultivierung von humanen B-Lymphozyten

B-Zellen wurden mit dem Dynal Negativisolierungs-Kit aus PBMCs gesunder Spender isoliert. Der prozentuale Anteil vor und nach Isolierung wurde per FACS-Analyse mit einem Antikörper gegen den B-Zellmarker CD19 überprüft. Eine repräsentative FACS-Analyse der CD19⁺-Zellen vor und nach Depletion ist in Abb. 3.12 gezeigt.

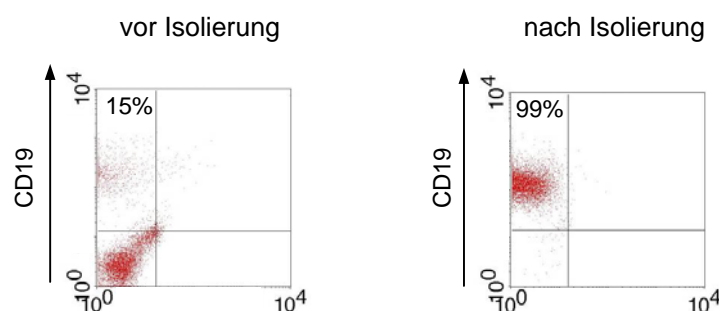


Abb. 3.12: Reinheit von B-Zellen vor und nach Negativdepletion. Die Zellen wurden vor und nach Isolierung mit einem Fluoreszenz-markierten CD19-Antikörper gefärbt und im FACS-Gerät analysiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Donor.

Die durchschnittliche Reinheit der isolierten B-Zellen betrug 98%. Aus 60 ml Citratblut gesunder Spender konnten im Mittel 4×10^6 Zellen gewonnen werden. Die isolierten B-Zellen wurden mit den Zytokinen IL-2, -4, -10 und CD40L, sowie mit 10% humanem autologem Plasma und 10% FCS kultiviert.

Da die Transduktionseffizienz auf unstimulierten als auch auf stimulierten B-Zellen bestimmt werden sollte, wurde der Aktivierungsstatus der Zellen bestimmt. Dazu wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des B-Zellmarkers CD19 im FACS-Gerät analysiert. An Tag 0 betrug der Anteil der doppeltpositiven Zellen (CD19⁺CD69⁺) durchschnittlich 1,15%, an Tag 1 92,3% und an Tag 11 42,8% (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Aktivierung von B-Lymphozyten.

Tag nach Isolierung	CD19 ⁺ [%] ¹	CD69 ⁺ [%] ¹	CD19 ⁺ CD69 ⁺ [%] ¹
0	97,1	0,83	1,15
1	96,9	92,7	92,3
11	80,1	49,8	42,8

¹ Mittelwert von 3-5 Donoren.

An Tag 11 nahm die Expression sowohl des B-Zellmarkers CD19 als auch des Aktivierungsmarkers CD69 ab, nur noch 43 % der Zellen waren doppeltpositiv. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass beide Marker nach längerer Kultivierung herunterreguliert werden.

3.2.2 Transduktionseigenschaften von SIV_{smm}PBj- und HIV-1-Vektoren auf humanen B-Lymphozyten

Die isolierten B-Zellen wurden an Tag 0, 1 und 11 nach Isolierung mit den Vektoren [SIV_{PBj}-EGFP(VSV)] und [HIV-1_{EGFP}(VSV)] mit einer MOI von 10 transduziert. Die Zellen wurden direkt nach Isolierung (Tag 0) ohne Zugabe von Zytokinen transduziert, um eine Stimulierung zu verhindern. Die Zellen an Tag 1 bzw. 11 wurden vor der Transduktion mit den Zytokinen kultiviert. Eine Woche später wurde die EGFP-Expression der Zellen im FACS-Gerät analysiert. Die Mittelwerte der Daten sind in Abb. 3.13 graphisch dargestellt.

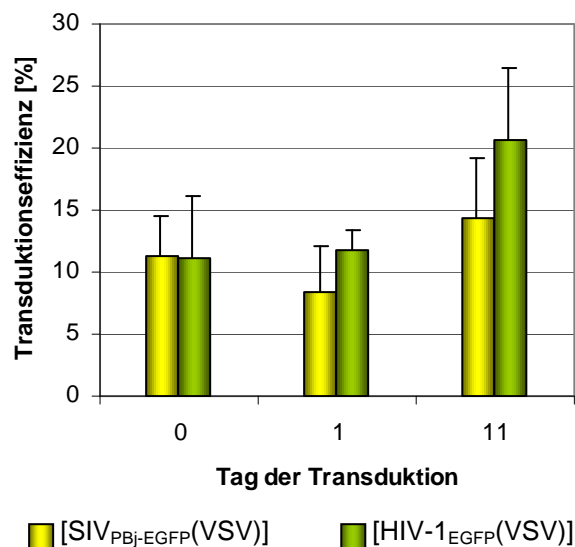


Abb. 3.13: Transduktionseffizienzen von [SIV_{PBj}-EGFP(VSV)] und [HIV-1_{EGFP}(VSV)] auf ruhenden und stimulierten B-Zellen. Die Zellen von mindestens drei Donoren wurden an Tag 0, 1 und 11 nach Isolierung mit einer MOI von 10 mit den genannten Vektoren transduziert. Die Analyse erfolgte eine Woche später im FACS-Gerät. Mittelwerte von 3-5 Donoren

Unstimulierte B-Zellen (Tag 0) konnten mit beiden Vektoren mit vergleichbarer Effizienz transduziert werden (ca. 11%). Trotz Stimulierung wurde an Tag 1 keine höhere Effizienz gemessen. An Tag 11 nach Isolierung nahm die Anzahl von EGFP-exprimierenden Zellen nach Transduktion mit dem SIV_{smm}PBj-Vektor auf 14,4% und mit dem HIV-1-Vektor 20,6% zu.

Somit kann der SIV_{smm}PBj -Vektor ruhende B-Lymphozyten mit vergleichbarer Effizienz wie der HIV-1-Vektor transduzieren und besitzt daher keinen Transduktionsvorteil auf diesen Zellen.

3.3 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Transduktion humaner Makrophagen

3.3.1 Isolierung humaner Monozyten

Um die Transduktionseigenschaften des SIV_{smm}PBj-Vektors auf Makrophagen zu analysieren, musste zunächst das Protokoll für die Differenzierung von Makrophagen aus Monozyten etabliert werden. Die Monozyten wurden aus humanem Blut gesunder Spender gewonnen. Dazu wurden PBMCs über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und die Monozyten durch eine Positivisolierung mittels magnetischer Zellsortierung isoliert. Auf eine Negativdepletion, bei welcher eine Aktivierung der Zellen vermieden wird, konnte hier verzichtet werden, da die isolierten Monozyten mit Zytokinen zu Makrophagen differenziert wurden. Eine Positivisolierung hat den Vorteil, dass die Reinheit und Ausbeute der Zielzellen im Vergleich zu einer Negativdepletion erhöht sind.

Um die Reinheit der isolierten Monozyten zu überprüfen, wurde die Expression des Monozyten-spezifischen Markers CD14 vor und nach Isolierung im FACS-Gerät analysiert. Die Aufreinigungseffizienz lag durchschnittlich zwischen 95-98%.

3.3.2 Differenzierung und Charakterisierung von humanen Monozyten und Makrophagen

3.3.2.1 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Makrophagen können mit verschiedenen Protokollen aus Monozyten differenziert werden. In dieser Arbeit wurden die Zellen für 5 Tage mit M-CSF kultiviert, um Makrophagen zu erhalten. Zur Aktivierung wurde über Nacht LPS und CD40L zum Medium gegeben. In Abb. 3.14 ist der Differenzierungsweg graphisch dargestellt.

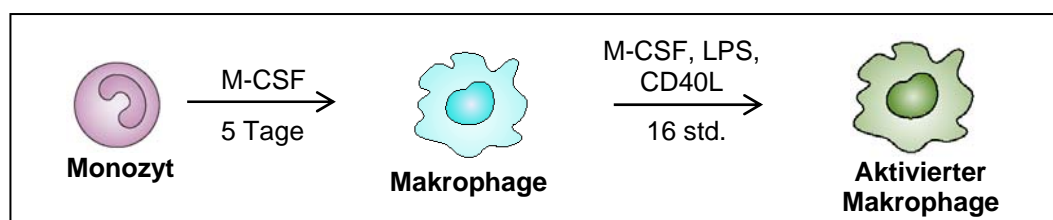


Abb. 3.14: Schematischer Differenzierungsweg von Monozyten zu Makrophagen und deren Aktivierung. Die Kultivierung erfolgte mit den angegebenen Zytokinen.

3.3.2.2 Nachweis der Differenzierung zu Makrophagen

Um die erfolgreiche Differenzierung der Makrophagen zu überprüfen, wurden die Zellen an den Tagen 0, 1, 5 und 6 nach Isolierung im FACS-Gerät mit Hilfe von spezifischen Oberflächenmarkern analysiert (Abb. 3.15).

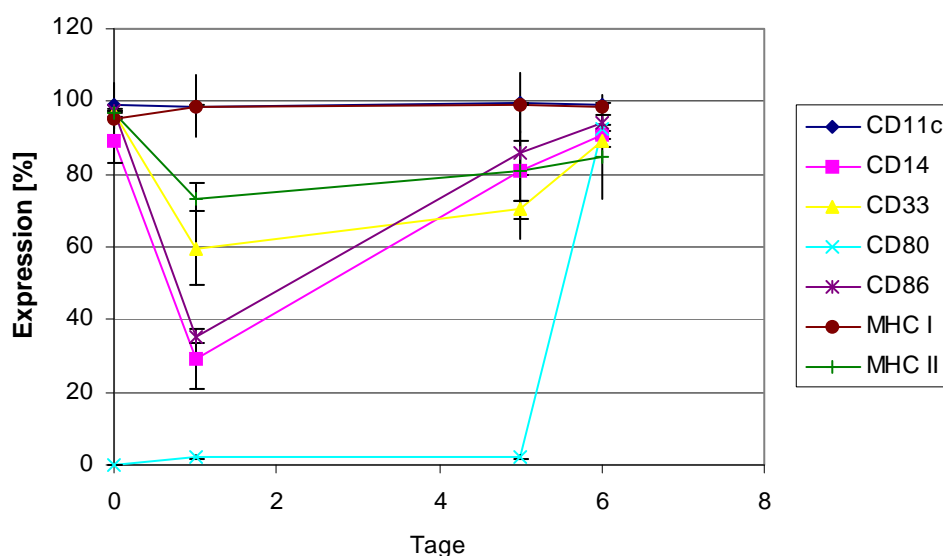


Abb. 3.15: Nachweis der Differenzierung zu Makrophagen. FACS-Analyse von Zelltyp-spezifischen Oberflächenmarkern. An den Tagen 0, 1, 5 und 6 wurden die genannten Marker mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern im FACS-Gerät gemessen. Die Zellen an Tag 6 wurden zuvor über Nacht mit LPS und CD40L aktiviert. 3-6 Donoren wurden analysiert.

Der Marker CD14 und der Aktivierungsmarker CD86 wird sowohl auf Monozyten als auch auf Makrophagen exprimiert. Die Marker für myeloide Zellen sind CD11c und CD33. Beide Marker werden während der Differenzierung unverändert hoch exprimiert, ebenso die MHC I Moleküle. MHC II wird auf Makrophagen auf einem geringen Niveau exprimiert als auf Monozyten. Die Zellen an Tag 6 wurden zuvor über Nacht durch die Zugabe von LPS aktiviert. Die Marker CD14, CD33, CD86, MHC II wurden auf den aktivierten Makrophagen verstärkt exprimiert. Ebenso der Marker CD80, der erst nach Aktivierung der Makrophagen exprimiert wurde.

3.3.2.3 Zellmorphologie während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Makrophagen besitzen eine sehr charakteristische Morphologie. Im Vergleich zu Monozyten sind sie adhärent und haben die rundliche Form verloren. Im Verlauf der Differenzierung nimmt das Zytoplasma stark an Größe zu. Makrophagen bilden charakteristische Plasmaausstülpungen, sogenannte Pseudopodien. Mit diesen Scheinfüßchen können sich die Zellen fortbewegen, da sie Myosin- und Aktinfilamente enthalten. Aufnahmen der Zellmorphologie während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen sind in Abb. 3.16 gezeigt.

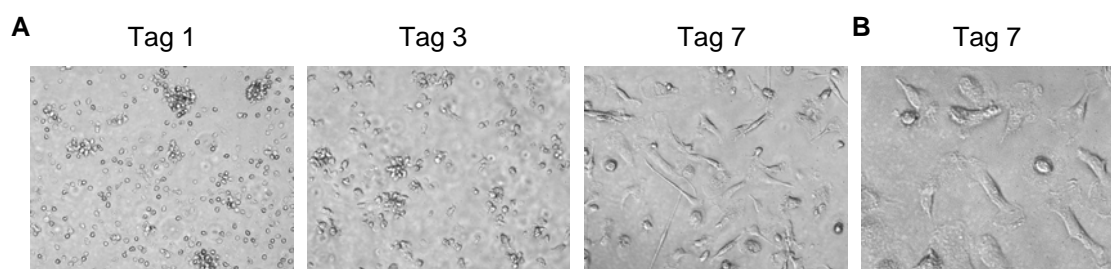


Abb. 3.16: Zellmorphologie während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. A: Aufnahmen an den Tagen 1, 3 und 7 nach Isolierung (100-fache Vergrößerung). B: Aufnahmen an Tag 7 (200-fache Vergrößerung). Ein repräsentativer Donor.

3.3.3 Transduktionseigenschaften der lentiviralen Vektoren auf Monozyten und Makrophagen

Es wurden sowohl Monozyten (Tag 1) als auch Makrophagen (Tag 5) mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren mit je einer MOI von 5 transduziert. Dabei wurden die Zellen bis zum Zeitpunkt der Analyse mit M-CSF kultiviert. Die FACS-Analyse erfolgte 5 Tage nach Transduktion. Da bei einer Transduktion mit dem SIV_{smm}PBj -Vektor auf humanen Monozyten das Vpx Protein essentiell ist, wurde auch auf Makrophagen getestet, ob das virale Protein in den Partikeln für eine effiziente Transduktion vorhanden sein muss. Aufgrund dessen wurden neben den Vektoren [HIV-1_{EGFP}(VSV)] und [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)] auch die SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektoren [SIV_{4xko-EGFP}(VSV)], bei welchem alle akzessorischen Gene ausgeknockt sind und [SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)], bei welchem das Protein Vpx mit in die Partikel verpackt worden ist, getestet. In Abb. 3.17 sind die repräsentativen Aufnahmen von transduzierten Monozyten (Tag 1) bzw. Makrophagen (Tag 5) eines Donors gezeigt, in Abb. 3.18 sind die Mittelwerte der Transduktionseffizienzen dargestellt.

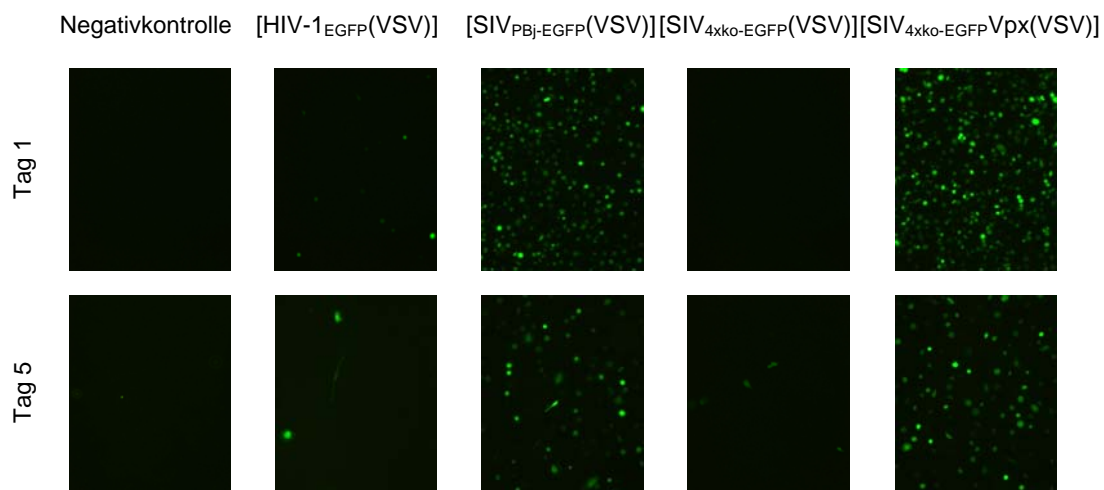


Abb. 3.17: Transduktion humaner Monozyten und Makrophagen mit lentiviralen Vektoren. Die Monozyten (Tag 1) bzw. Makrophagen (Tag 5) wurden mit einer MOI von 5 mit den oben genannten Vektoren transduziert. Die Monozyten wurden anschließend zu Makrophagen differenziert. Die Analyse der EGFP-Expression erfolgte 5 Tage nach Transduktion im FACS-Gerät. Gezeigt sind die repräsentativen Aufnahmen eines Donors. (100-fache Vergrößerung)

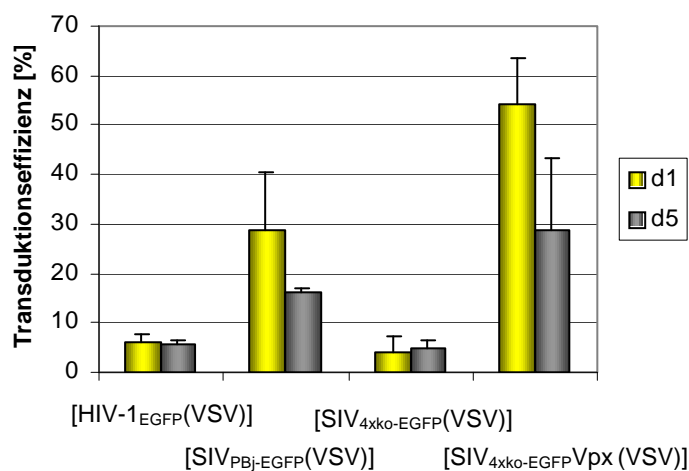


Abb. 3.18: Transduktionseffizienzen der lentiviralen Vektoren auf Monozyten und Makrophagen. Die Zellen wurden an Tag 1 (Monozyten) bzw. 5 (Makrophagen) mit den genannten Vektoren mit einer MOI von 5 transduziert und nach 5 Tagen im FACS-Gerät analysiert. Die transduzierten Monozyten wurden zu Makrophagen differenziert und dann analysiert. Mittelwerte von drei Donoren.

Der HIV-1-Vektor konnte Monozyten und Makrophagen nur mit geringer Effizienz transduzieren, im Gegenteil zum SIV_{smm}PBj-Vektor [SIV_{PBj}-EGFP(VSV)], welcher beide Zelltypen effizient transduzieren konnte. Wie auf Monozyten ist die Anwesenheit des Vpx Proteins in den viralen Partikeln auf Makrophagen essentiell. Nur 4% der Makrophagen

konnten mit dem [SIV_{4xko-EGFP}(VSV)]-Vektor transduziert werden. Wurde Vpx jedoch mit in die Partikel verpackt, stieg die Transduktionseffizienz deutlich an. Vergleicht man beide Zelltypen, so scheint die Transduktionseffizienz des SIV_{smm}PBj-Vektors auf Makrophagen geringer zu sein. Sowohl der Vektor [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)] als auch [SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)] erzielten auf diesen Zellen eine um 12% bzw. 25% geringere Transduktionseffizienz.

Der SIV_{smm}PBj-Vektor besitzt einen eindeutigen Vorteil gegenüber dem HIV-1-Vektor in der Transduktion von humanen Makrophagen. Auch konnte gezeigt werden, dass das akzessorische Protein Vpx essentiell für die Transduktion ist.

3.4 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Transduktion humaner dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind die Schaltzentralen des Immunsystems. Sie können mit allen Immunzellen interagieren und kontrollieren sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunantwort. Aufgrund dessen sind sie interessante Zielzellen für die Gentherapie.

In dieser Arbeit sollte nun die Eignung des SIV_{smm}PBj-Vektors im Vergleich zu einem HIV-1-Vektor zur Transduktion von dendritischen Zellen analysiert werden.

3.4.1 Differenzierung und Charakterisierung von humanen Monozyten und myeloiden dendritischen Zellen

3.4.1.1 Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen

Monozyten wurden zunächst aus dem Blut gesunder Spender mittels Positivisolierung wie in 3.3.1 beschrieben isoliert. Monozyten können *in vitro* mit verschiedenen Zytokin-Cocktails zu dendritischen Zellen differenziert werden. In dieser Arbeit wurden der von Jonuleit *et al.* (1997) beschriebene Zytokincocktail benutzt. Dabei wurden unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF innerhalb von 6 Tagen aus Monozyten unreife dendritische Zellen (imDCs) differenziert. Durch die weitere Zugabe von IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ wurde die Reifung der Zellen induziert. Nach drei Tagen sind die Zellen zu reifen dendritischen Zellen (mDCs) differenziert. In Abb. 3.19 ist der Differenzierungsweg graphisch dargestellt.

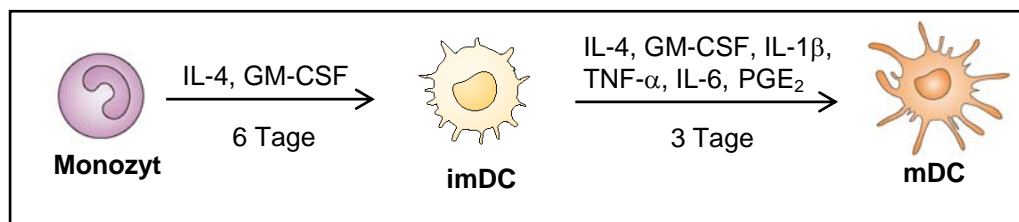


Abb. 3.19: Schematische Darstellung des Differenzierungswegs von dendritischen Zellen.

Die Kultivierung erfolgte mit den angegebenen Zytokinen.

3.4.1.2 Nachweis der Differenzierung zu dendritischen Zellen

Um die erfolgreiche Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen nachzuweisen, wurden spezifische Oberflächenmarker für Monozyten, unreife und reife dendritische Zellen im FACS-Gerät analysiert (Abb. 3.20, 3.21). Die verwendeten Zelltyp-spezifischen Marker sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle. 3.7: Verwendete Oberflächenmarker für die Charakterisierung von dendritischen

Marker	Zelltyp
CD11c	Myeloide Zellen
CD14	Monozyten, Makrophagen
CD33	Monozyten, Makrophagen
CD80	Reife DCs, aktivierte Makrophagen
CD83	Reife DCs
CD86	Monozyten, DCs, Makrophagen
CD209 (DC-SIGN)	Myeloide DCs
HLA-DR (MHC II)	Antigenpräsentierende Zellen
HLA-ABC (MHC I)	Alle Zellen

Zur besseren Übersicht wurden die Marker in Abb. 3.20 auf zwei Graphen aufgeteilt. Die Monozyten-spezifischen Marker CD14 und CD33 wurden während der Differenzierung zu reifen DCs herunterreguliert. Der Marker für reife DCs, CD83, wurde auf maturierten DCs exprimiert (79%), konnte jedoch auch an Tag 1 detektiert werden (35%). Ebenso wurde der Marker CD80 während der Differenzierung zu reifen DCs (82%) von 0% auf Monozyten über 24% auf unreifen DCs hochreguliert. Mit IL-4 differenzierte DCs exprimieren den spezifischen Marker CD209 (DC-SIGN). Er konnte auf unreifen DCs (88%) detektiert werden, die Expression sank jedoch auf reifen DCs auf 30%. CD86 wurde sowohl auf Monozyten, imDCs und mDCs exprimiert (>90%). Es konnte jedoch beobachtet werden,

dass die Expression während der Differenzierung von Monozyten zu imDCs auf bis zu 40% herabsank. Die anderen Marker (CD11c, HLA-ABC, HLA-DR) wurden konstant von allen Zellen exprimiert.

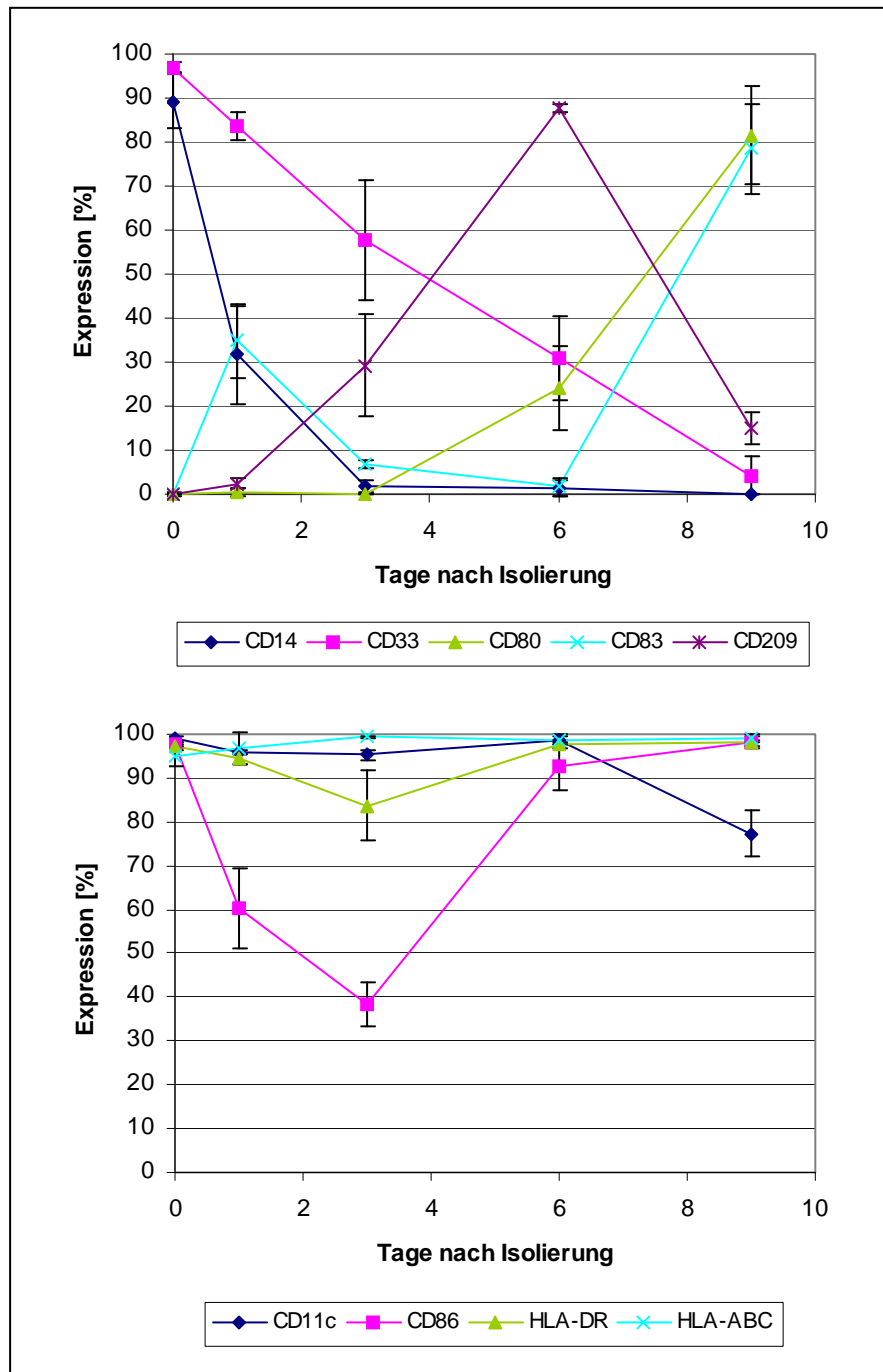


Abb. 3.20: Differenzierungsnachweis von Monozyten zu dendritischen Zellen. FACS-Analyse von Zelltyp-spezifischen Oberflächemarkern. An den Tagen 0, 1, 3, 6 und 9 wurden die angegebenen Marker mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern im FACS-Gerät gemessen. 3-6 Donoren wurden analysiert.

Während der Differenzierung von Monozyten zu DCs werden einige Marker zwar stabil, jedoch unterschiedlich stark exprimiert. Auch diese Veränderung ist charakteristisch für die Differenzierung von Monozyten zu DCs. Aufgrund dessen wurde in Abb. 3.21 die Expressionsstärke der Marker von Monozyten, unreifen und reifen DCs in einem Histogramm verglichen.

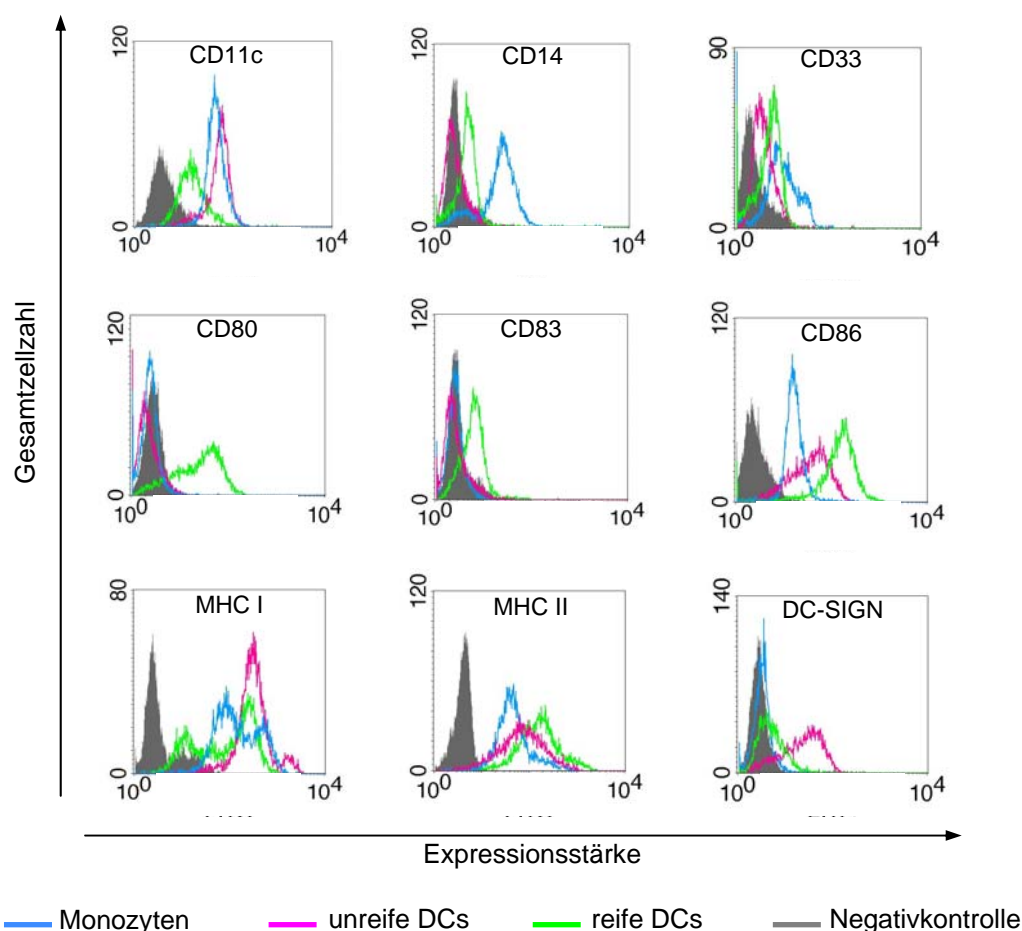


Abb. 3.21: Nachweis der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen. Vergleich von Oberflächenmarkern von Monozyten, unreifen und reifen DCs. Gezeigt ist die Expressionsstärke von verschiedenen Oberflächenmarkern gegen die Gesamtzellzahl. Ein repräsentativer Donor.

Der Marker CD11c wurde auf allen untersuchten Zelltypen exprimiert, die Abb. 3.21 zeigt jedoch, dass dieser Marker auf Monozyten und unreifen DCs stärker exprimiert wurde, als auf reifen Zellen. CD86 wurde im Laufe der Differenzierung verstärkt exprimiert, ebenso MHC II. Die Expressionsstärke von MHC I nahm sowohl auf unreifen, als auch auf reifen DCs zu. Die anderen Marker CD14, CD33, CD80, CD83 und CD209 zeigten das gleiche Expressionsmuster wie in der Abb. 3.20.

Anhand der Expression der verschiedenen Oberflächenmarker wurde somit die erfolgreiche Differenzierung von unreifen und reifen dendritischen Zellen aus Monozyten nachgewiesen.

3.4.1.3 Zellmorphologie während der Differenzierung von Monozyten zu DCs

Neben der Änderung der Expression der Oberflächenmarkern ist auch eine Änderung in der Zellmorphologie während der Differenzierung zu beobachten. In Abb. 3.22 ist die Änderung der Morphologie gezeigt. An Tag 1 waren die Zellen noch relativ rund und zum Teil noch nicht adhären. Während der Differenzierung zu unreifen DCs an Tag 6 veränderte sich die Morphologie der Zellen.

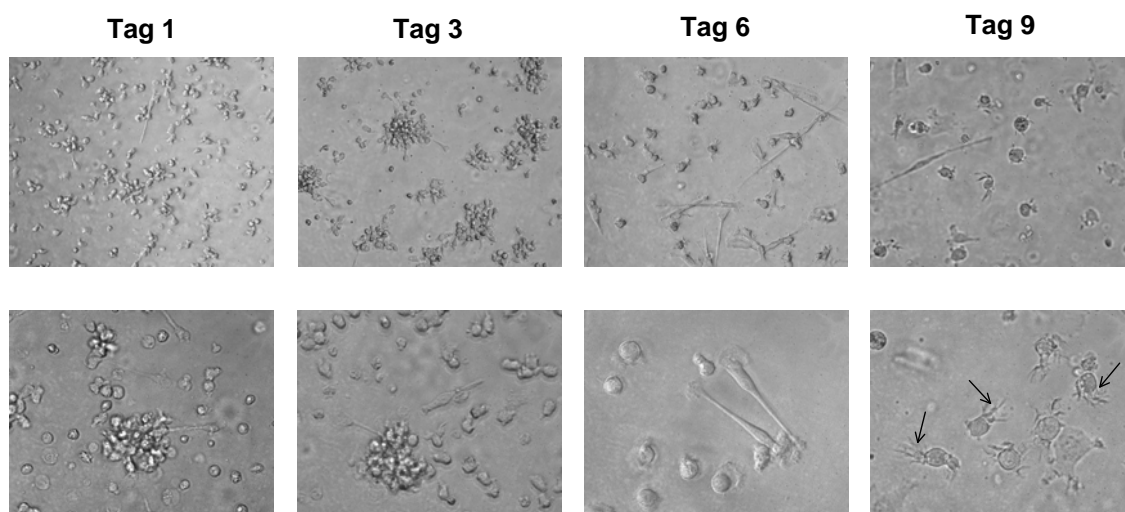


Abb. 3.22: Zellmorphologie während der Differenzierung von Monozyten zu DCs. Die Zellen wurden an den Tagen 1, 3, 6 und 9 nach Isolierung fotografiert. Pfeil: Dendriten. (Oben: 200-fache und unten: 400-fache Vergrößerung).

Der größte Teil der Zellen war nun adhären und bildeten lange Fortsätze (Filopodien). An Tag 9 waren die Zellen zu reifen DCs differenziert und zeigten eine sehr veränderte Morphologie. Die Zellen waren nicht mehr adhären, zeigten eine runde Form und hatten kleine Fortsätze, sogenannte Dendriten (markiert durch Pfeile in Abb. 3.22), ausgebildet. Dadurch wird die Zelloberfläche vergrößert, um verstärkt MHC- und co-stimulatorische Moleküle präsentieren zu können.

Sowohl die aus Monozyten differenzierten imDCs als auch mDCs zeigten die typische Morphologie.

3.4.2 Transduktionseigenschaften der lentiviralen Vektoren auf Monozyten und unreifen dendritischen Zellen

Um die Transduktionseffizienz der $SIV_{smm}PBj$ - und HIV-1-Vektoren zu analysieren, wurden Monozyten isoliert und an den Tagen 1 (Monozyten) und 6 (imDC) mit den Vektoren [HIV-1_{EGFP}(VSV)] und [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)] mit einer MOI von 5 transduziert. Zusätzlich wurden die Transduktionseigenschaften der Vektoren [SIV_{4xko-EGFP}(VSV)], welcher keine akzessorischen Proteine verpackt hat und [SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)], welcher das virale Protein Vpx enthält, untersucht. Auf Monozyten und Makrophagen konnte bereits gezeigt werden, dass das akzessorische Protein essentiell für eine effiziente Transduktion ist. Die mit den verschiedenen Vektoren transduzierten Zellen wurden zu reifen DCs maturiert und dann im FACS-Gerät analysiert (Abb. 3.23).

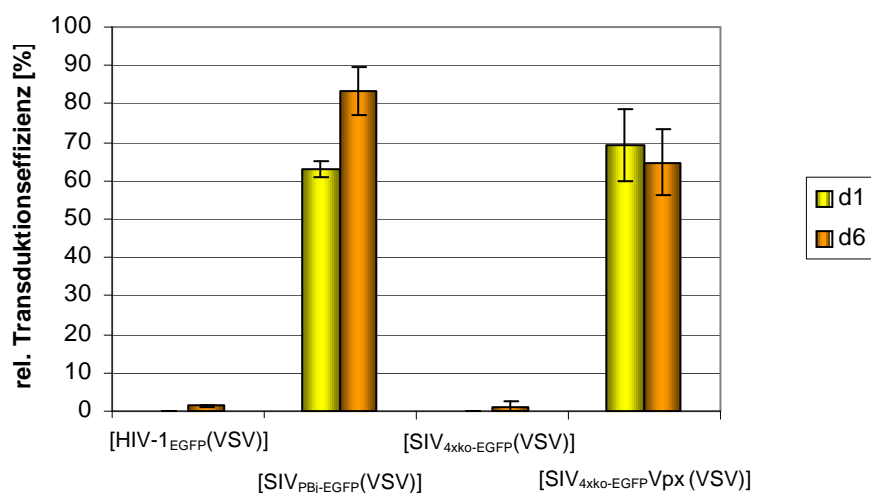


Abb. 3.23: Transduktionseffizienzen der lentiviralen Vektoren auf Monozyten und unreifen DCs. Die Zellen wurden an Tag 1 (Monozyten) und 6 (imDCs) mit den genannten Vektoren mit einer MOI von 5 transduziert, maturiert und im FACS-Gerät analysiert. Mittelwerte von drei Donoren.

Der HIV-1-Vektor konnte weder Monozyten noch imDCs transduzieren, wohingegen der $SIV_{smm}PBj$ -Vektor beide Zelltypen sehr effizient transduzieren konnte. Wurden Monozyten transduziert erzielte der Vektor eine Effizienz von 63%, wurden imDCs transduziert erzielte der Vektor 84%. Wurden die Zellen mit einem $SIV_{smm}PBj$ -Vektor transduziert, bei welchem alle vier akzessorischen Gene ausgeknockt worden sind [SIV_{4xko-EGFP}(VSV)], fand keine Transduktion statt. Wurde jedoch das akzessorische Protein Vpx mit in die Partikel verpackt ([SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)]), so wurde eine ähnlich Effizienz erzielt wie mit dem [SIV_{PBj-}

EGFP(VSV)]-Vektor. 70% der mDCs, transduziert als Monozyten und 65% der mDCs, transduziert als imDCs, exprimierten nach Transduktion das EGFP-Protein.

Es konnte gezeigt werden, dass der SIV_{smm}PBj-Vektor sehr effizient sowohl Monozyten als auch imDCs transduzieren kann, wobei das Vpx Protein essentiell ist. Der HIV-1-Vektor besitzt diese Eigenschaften nicht.

3.5 Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Generierung von zytotoxischen T-Zellen

In mehreren Studien werden unreife DCs mit HIV-1-abgeleiteten Vektoren transduziert, um ein Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) einzubringen, welches in den Zellen exprimiert und prozessiert wird. *In vivo* werden diese Tumorantigene nur von Tumorzellen exprimiert. Die DCs werden nach Transduktion maturiert und die Epitope des TAA auf den MHC I und II Molekülen präsentiert. Mit diesen Zellen können CD8⁺-T-Zellen stimuliert werden, dieser Vorgang wird Priming genannt. Die aktivierten zytotoxischen T-Zellen (CTLs) können nun die Tumorzellen, welche das TAA exprimieren, erkennen und lysieren.

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass der SIV_{smm}PBj-Vektor sowohl Monozyten als auch unreife DCs sehr effizient transduzieren kann. Im Folgenden wurde nun die Kapazität von reifen DCs, die bereits als Monozyten transduziert wurden, untersucht, CD8⁺-T-Zellen gegen das TAA Mart-1 zu „primen“. Als Kontrolle wurden reife dendritische Zellen, die als unreife dendritische Zellen transduziert wurden, ebenfalls zum Generieren von zytotoxischen T-Zellen eingesetzt.

3.5.1 Transduktion von humanen Monozyten und unreifen DCs

Um eine ähnliche Kapazität der mDCs, die als Monozyten oder unreife DCs transduziert wurden, für das T-Zellpriming zu erreichen, sollte auf beiden Zelltypen die gleiche Transduktionseffizienz erzielt werden. Dazu wurden die Zellen entweder an Tag 1 oder 6 nach Isolierung mit verschiedenen MOIs mit dem [SIV_{4xko}-EGFPVpx(VSV)] transduziert. Die Zellen wurden zu reifen DCs differenziert und im FACS-Gerät die EGFP-Expression analysiert (Abb. 3.24).

Die an Tag 1 und 6 mit einer MOI von 1 transduzierten Zellen exprimierten je zu ca. 20% das EGFP Protein. Die Expression stieg mit zunehmender MOI weiter an und lag bei einer MOI von 10 jeweils um ca. 72%. Der Zeitpunkt der Transduktion hat keinen Einfluss auf die

Transduktionseffizienz des SIV_{smm} PBj-Vektors. Somit können beide Zelltypen mit der gleichen MOI transduziert werden.

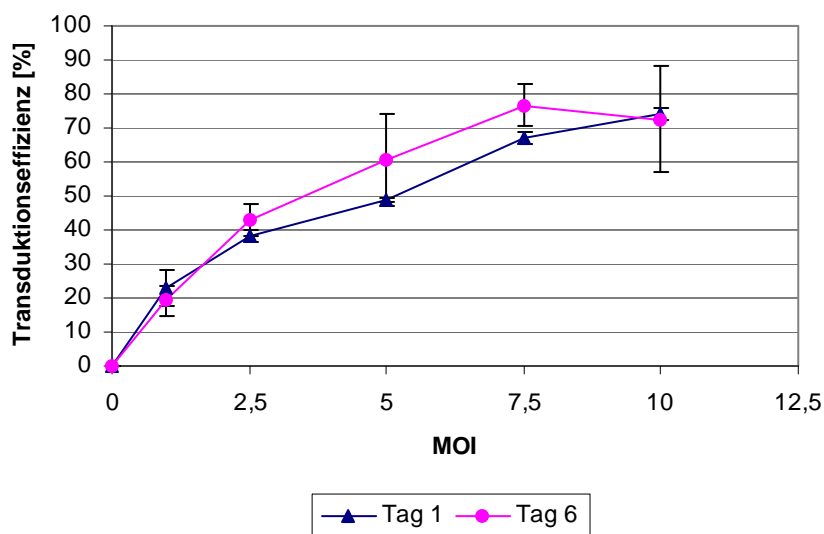


Abb. 3.24: Transduktionseffizienz des $[SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)]$ -Vektors auf Monozyten und unreifen DCs. Die Zellen wurden an Tag 1 (Monozyten) bzw. 6 (imDC) nach Isolierung mit verschiedenen MOIs mit dem $[SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)]$ -Vektor transduziert und zu reifen DCs differenziert. Im FACS-Gerät wurde die EGFP-Expression analysiert. Mittelwerte von drei Donoren.

3.5.2 Einfluss der Transduktion mit SIV_{smm} PBj-Vektoren auf die Oberflächenmarker dendritischer Zellen

Um zu testen, ob die Transduktion mit dem SIV_{smm} PBj-Vektor die Expression der Oberflächenmarker beeinflusst, wurden im nächsten Schritt die Zellen an Tag 1 oder 6 nach Isolierung mit dem $[SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)]$ mit einer MOI von 1 transduziert und zu reifen DCs differenziert. Anschließend wurde die Expressionsstärke verschiedener Oberflächenmarker auf transduzierten und nicht transduzierten reifen DCs im FACS-Gerät analysiert.

Die Histogrammüberlagerung in Abb. 3.25 zeigt die Expressionsstärken der verschiedenen Oberflächenmarker. Pro Marker wurden jeweils nicht transduzierte, sowie an Tag 1 oder Tag 6 transduzierte Zellen verglichen.

Reife DCs, welche als Monozyten oder als unreife DCs transduziert wurden, zeigten für alle analysierten Oberflächenmarker eine leicht erhöhte Expressionsstärke im Vergleich zur Negativkontrolle. Besonders wurden die Marker CD80, CD86 und MHC II verstärkt exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde die Expressionsstärke des Markers CD83 kaum beeinflusst.

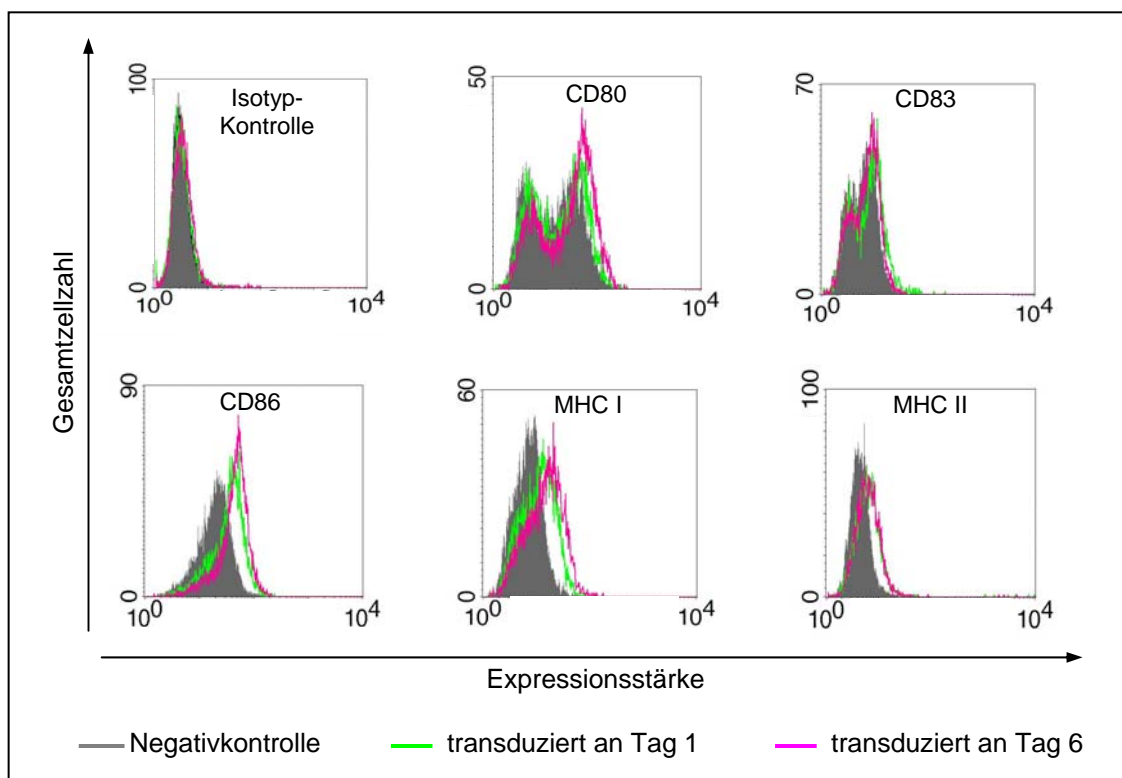


Abb. 3.25: Einfluss der Transduktion mit SIV_{smm} PBj-Vektoren auf die Expressionsstärke von Oberflächenmarkern auf mDCs. Monozyten bzw. unreife DCs wurden mit einer MOI von 1 transduziert und zu reifen DCs differenziert. Die Oberflächenmarker CD14, CD80, CD83, CD86, MHC I und MHC II wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern im FACS-Gerät analysiert. Ein repräsentativer Donor.

3.5.3 Einfluss der Transduktion mit SIV_{smm} PBj-Vektoren auf die Zytokinserzenierung von reifen DCs

Da die Zytokinserzenierung von dendritischen Zellen bei der Aktivierung von T-Zellen eine bedeutende Rolle spielt, wurde untersucht, ob diese durch die Transduktion mit dem lentiviralen SIV_{smm} PBj-Vektor verändert wird. Dazu wurden Zellen an Tag 1 mit dem [$SIV_{4xko-EGFPVpx(VSV)}$]-Vektor mit einer MOI von 1 transduziert und zu reifen DCs differenziert.

An Tag 9 wurden die Zellen gewaschen und in frischem Medium kultiviert. Nach zwei Tagen wurde dieses Medium abgenommen und mittels eines Zytokin-Arrays auf verschiedene Zytokine getestet. Dabei wurde nur das Medium, Medium von untransduzierten und transduzierten reifen DCs untersucht. Die Zytokin-Arrays sind in Abb. 3.26 gezeigt. Die Signalstärke der verschiedenen Zytokine wurde densitrometrisch ausgewertet und miteinander verglichen.

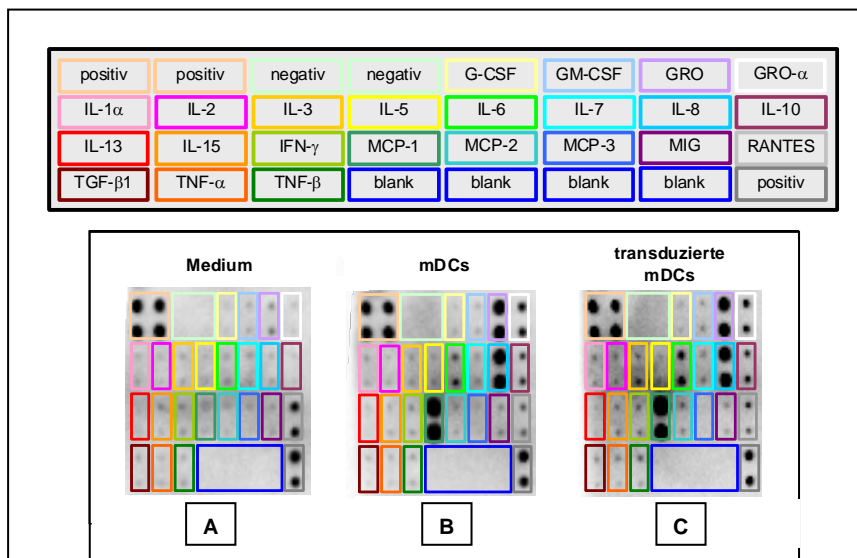


Abb. 3.26: Einfluss der Transduktion mit $SIV_{smm}PBj$ -Vektoren auf die Zytokinsekretion von mDCs. Monozyten wurden mit dem [$SIV_{4xko-EGFP}Vpx(VSV)$] mit einer MOI von 1 transduziert und zu mDCs maturiert. Der Medienüberstand wurde von untransduzierten (B), sowie von transduzierten mDCs (C) nach zwei Tagen abgenommen. Als Negativkontrolle diente nur Medium alleine (A). Die im jeweiligen Überstand enthaltenden Zytokine wurden auf einer Membran in einem Zytokin-Array detektiert.

Die Auswertung des Zytokinassays zeigte, dass bereits im Medium das Zytokin RANTES detektiert werden konnte (Abb. 3.26 A). Sowohl untransduzierte (Abb. 3.26 B) als auch transduzierte mDCs (Abb. 3.26C) sezernierten die Zytokine GRO, GRO- α , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 und MCP-2.

Es konnte kein Unterschied in der Zytokinproduktion der Zellen nach der Transduktion im Vergleich zu unbehandelten DCs detektiert werden. Somit hat die Transduktion mit dem $SIV_{smm}PBj$ -Vektor auf Monozyten keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion von reifen DCs.

3.5.4 Generierung eines *mart-1*-übertragenden Vektors

Um die Fähigkeit zur Generierung von zytotoxischen T-Zellen durch transduzierte reife DCs zu analysieren, wurde als Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) Mart-1 eingesetzt, welches von Melanomzellen exprimiert wird. Dazu musste zunächst das *mart-1*-Gen in den $SIV_{smm}PBj$ -Vektor kloniert werden.

3.5.4.1 Klonierung des *mart-1* Gens in den Transfervektor pPBj-4xko

Für die Konstruktion von *mart*-übertragenden Vektoren wurde das Plasmid pPBj-4xko verwendet, bei welchem alle vier akzessorischen Gene, sowie das *env*-Gen bereits deletiert waren. Im ersten Schritt der Klonierung wurde das *mart*-Gen aus dem Plasmid pIRAU-MLANA #1 herausgeschnitten. Um das Gen in eine CMV-Expressionskassette zu inserieren, wurde das *mart*-Gen in das Plasmid pEGFP-N1 ligiert. Um die CMV-Expressionskassette in den pPBj-4xko-Vektor zu klonieren, wurde das Plasmid pPBj-4xko im deletierten *env*-Leserahmen geöffnet und das *mart*-Gen mit dem CMV-Promotor in den Vektor ligiert. Das Plasmid wurde mit pPBj-4xko-Mart-1 bezeichnet. Die schematische Darstellung des pPBj-4xko-Mart-1-Transfervektors ist in Abb. 3.27 wiedergegeben.

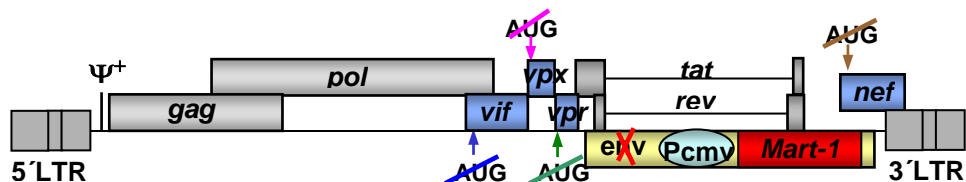


Abb. 3.27: Schematische Darstellung des pPBj-4xko-Mart-Transfervektors. Die Startcodons der akzessorischen Gene *vif*, *vpx*, *vpr* und *nef* sind deletiert. In das deletierte *env*-Gen wurde das *mart*-Gen in einer CMV-Expressionskassette inseriert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Titeroptimierung des neu konstruierten Vektors, indem unterschiedliche Verhältnisse des Transfervektors zu dem Hüllexpressionsplasmid pMD.G2, welches für das Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus codiert, bei einer Transfektion von 293T-Zellen in 6-Lochplatten eingesetzt wurden. Da für die Transduktion von Monozyten mit dem SIV_{smm}PBj-Vektor auch das Vpx Protein in den viralen Partikeln verpackt sein muss, wurde zusätzlich ein Vpx-Expressionsplasmid (pcVpx) transfiziert. Die für die Transfektion eingesetzten unterschiedlichen Plasmidmengen und der Titer des resultierenden [SIV_{4xko-Mart}Vpx(VSV)]-Vektors sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.8: Titeroptimierung des [SIV_{4xko-Mart}(VSV)Vpx]-Vektors.

pMD.G2 [μg]	pcVpx [μg]	pPBj-4xko-Mart [μg]	Titer $\times 10^3$ [TU/ml]
1	1	2	15,4
		2,5	14,8
		3	19,4
		3,5	7,3
		4	20,7
1,5	1	2	3,5
		2,5	6,7
		3	4,8
		3,5	13,5
		4	16
1	1,5	2	7,3
		2,5	7
		3	4,8
		3,5	7,4
		4	28,7
1,5	1,5	2	6,5
		2,5	11,1
		3	22,5
		3,5	31,2
		4	17,8
2	1	2	2,2
		2,5	10,6
		3	11,5
		3,5	14,5
		4	14,6
1	2	2	14,5
		2,5	5,7
		3	11,8
		3,5	11,8
		4	13

Der höchste Titer (in Tabelle 3.8 fett markiert) konnte mit den Plasmidmengen pMD.G2 1,5 μg , pcVpx 1,5 μg und pPBj-4xko-Mart 3,5 μg erzielt werden. Wurden diese Plasmidverhältnisse für die Transfektion von 24 T175 Kulturflaschen eingesetzt, wurde nach Ultrazentrifugation ein Titer von $3 \cdot 10^7$ TU/ml erzielt.

3.5.5 Transduktion von Monozyten und unreifen dendritischen Zellen mit [SIV_{4xko-Mart}(VSV)+Vpx]-Vektoren

Um die Transduktionseigenschaften des [SIV_{4xko-Mart}(VSV)+Vpx]-Vektors auf Monozyten und unreifen DCs zu testen, wurden Monozyten isoliert und an Tag 1 oder 6 nach Isolierung mit einer MOI von 2 transduziert. Die Zellen wurden jeweils zu reifen DCs differenziert und die Mart-Expression mittels einer intrazellulären FACS-Färbung nachgewiesen. Bei dieser Methode wurde das Mart Protein intrazellulär mit einem monoklonalen Antikörper gebunden. Ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper erkannte den Primärantikörper, so dass das Signal im FACS-Gerät detektiert werden konnte (Abb. 3.28).

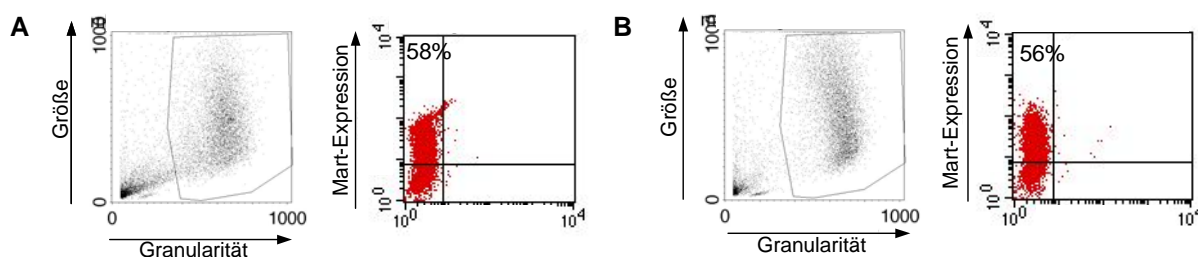


Abb.: 3.28: Expression des Mart Proteins in mDCs nach Transduktion mit *mart*-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektoren. Die Zellen wurden an Tag 1 (A) bzw. 6 (B) mit dem [SIV_{4xko-Mart}(VSV)+Vpx]-Vektor mit einer MOI von 2 transduziert und zu mDCs differenziert. Die Mart-Expression wurde in mDCs 5 Tage nach Transduktion per intrazellulärer Färbung im FACS-Gerät analysiert.

Die FACS-Analyse zeigt, dass nach Transduktion von Monozyten und unreifen dendritischen Zellen mit dem *mart*-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektor die Expression des Mart Proteins nach Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen nachgewiesen wurde.

3.5.6 Generierung von Mart-spezifischen zytotoxischen T-Zellen mit transduzierten dendritischen Zellen

Im nächsten Schritt wurde die Eignung von transduzierten und zu reifen dendritischen Zellen maturierten Monozyten untersucht, Antigen-spezifische T-Zellen zu generieren. Da bekannt ist, dass reife dendritische Zellen, die als unreife dendritische Zellen transduziert wurden, zur Stimulierung von Antigen-spezifischen T-Zellen eingesetzt werden können, wurden diese Zellen im Folgenden als Kontrolle eingesetzt. Für die Generierung der zytotoxischen T-Zellen wurden zunächst in je einem Ansatz Monozyten oder imDCs mit dem *mart*-übertragenden

SIV_{smm}PBJ-Vektor transduziert und maturiert. Die reifen DCs wurden mit frisch isolierten CD8⁺-Zellen des gleichen Donors in einem Verhältnis von 1:10 co-kultiviert. Das erste Zusammentreffen der T-Zellen mit den antigenpräsentierenden Zellen wird als Priming bezeichnet. Nach 9-12 Tagen werden die T-Zellen mit frisch generierten reifen DCs für eine weitere Woche co-kultiviert (1. Restimulierung). Anschließend erfolgte auf die gleiche Weise eine zweite Restimulierung. Für jede neue Stimulierungsrunde mussten Monozyten isoliert, an den unterschiedlichen Tagen transduziert und maturiert werden. Die T-Zellen wurden immer mit den reifen DCs kultiviert, die entweder als Monozyten (an Tag 1) oder als unreife DCs (an Tag 6) transduziert wurden. Die T-Zellen wurden dementsprechend als CTL-d1 oder CTL-d6 bezeichnet. 5 Tage nach der letzten Restimulierung erfolgte die Analyse der Funktionalität der zytotoxischen T-Zellen. In Abbildung 3.29 ist die Übersicht des T-Zellpriming schematisch dargestellt.

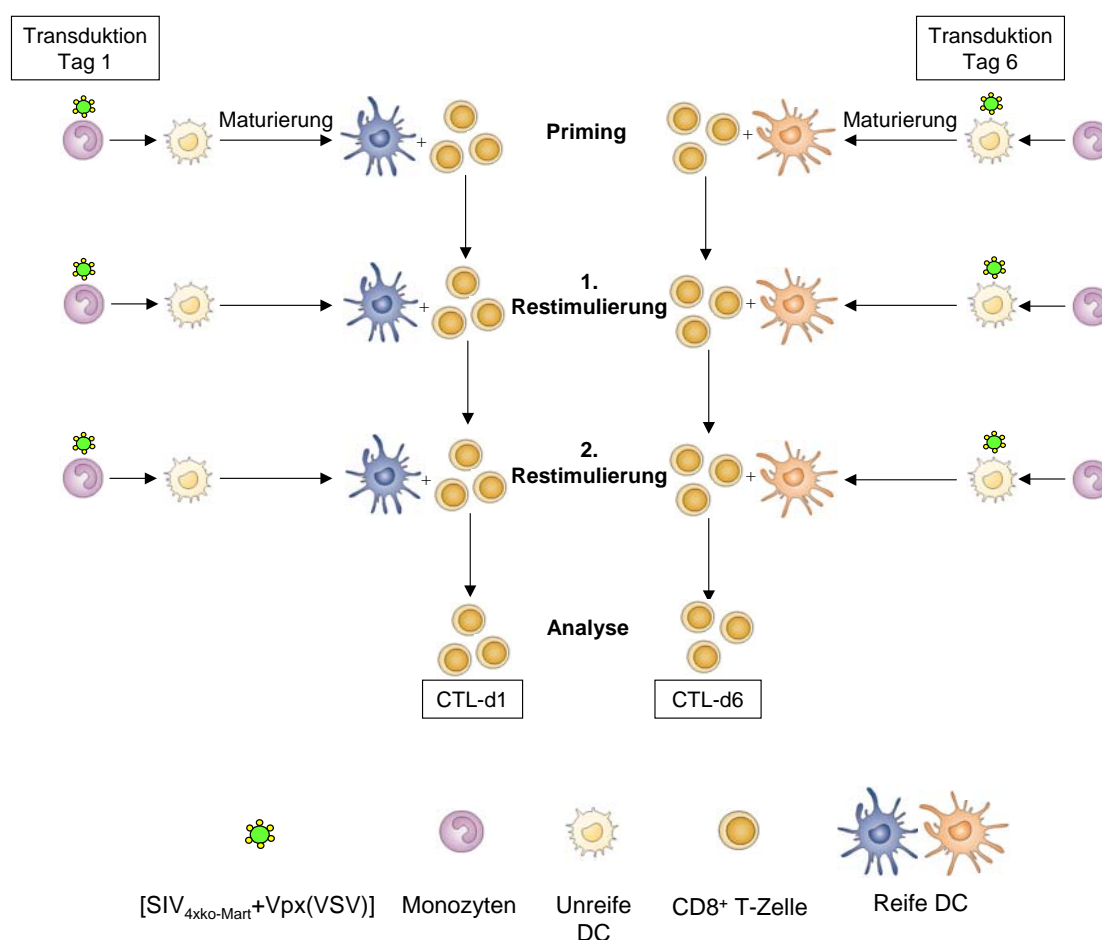


Abb.3.29: Schematische Übersicht des T-Zellprimings. Für das Priming, sowie für die Restimulierungen wurden jedes mal neue Monozyten isoliert und am Tag 1 oder 6 nach Isolierung transduziert und zu reifen DCs maturiert. Die CD8⁺-T-Zellen wurden nur zu Beginn einmalig isoliert. Diejenigen T-Zellen, welche mit den an Tag 1 oder Tag 6 transduzierten mDCs stimuliert wurden, wurden mit CTL-d1 oder CTL-d6 bezeichnet.

Die Funktion der generierten zytotoxischen T-Zellen wird im Folgenden anhand ihrer Zytokinproduktion und der Fähigkeit zur Zellyse von Mart-exprimierenden Zielzellen analysiert.

3.5.6.1 Analyse der Mart-Spezifität der generierten T-Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob antigenpräsentierenden Zellen nach Transduktion von Monozyten mit *mart*-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektoren Mart-spezifische zytotoxische T-Zellen generieren können. Diese Analyse wurde mit einem Donor durchgeführt und nur mit mDCs, die als Monozyten transduziert wurden. 5 Tage nach der letzten Restimulierung der T-Zellen, wurden die Zellen per Dextramer-Färbung im FACS-Gerät auf die Mart-Spezifität analysiert (Abb.3.30). Das Dextramer besteht aus MHC-Molekülen, die an eine Polymer-Kette gebunden sind, welche mit Fluorophoren markiert sind. Die MHC-Moleküle erkennen und binden an T-Zellrezeptoren, welche spezifisch das Mart-Antigen erkennen.

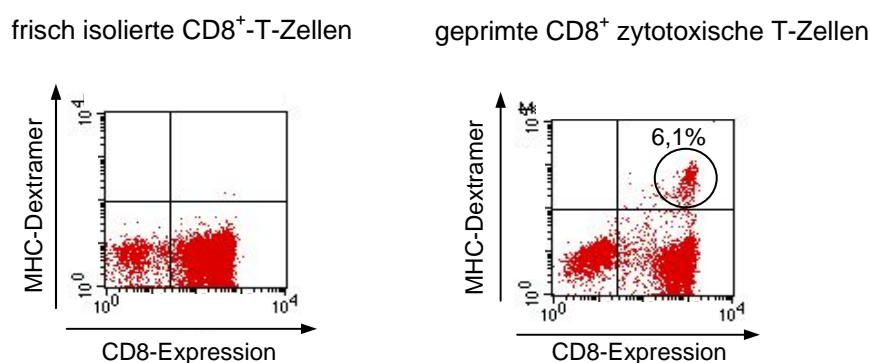


Abb. 3.30: Mart-Spezifität von T-Zellreptoren frisch isolierter und geprimter T-Zellen. Nach zwei Restimulierungen wurden die CTLs eines Donors per MHC Dextramer-Färbung im FACS-Gerät auf die Mart-Spezifität analysiert. Als Negativkontrolle wurden CD8⁺-T-Zellen des gleichen Donors direkt nach Isolierung ebenfalls analysiert.

6,1% der geprimten T-Zellen waren nach der 2. Restimulierung doppelpositiv für den Marker CD8 und für das MHC-Dextramer. Dies bedeutet, dass ca. 6% der zytotoxischen T-Zellen einen Mart-spezifischen T-Zellrezeptor besaßen. Um auszuschließen, dass die T-Zellen des analysierten Donors bereits vor Beginn des Primings Mart-spezifisch waren, wurden frisch isolierte CD8⁺-T-Zellen des selben Donors ebenfalls im FACS-Gerät auf die T-Zellrezeptorspezifität hin analysiert. Wie aus Abb. 3.30 ersichtlich wird, besaß der Donor keine Mart-spezifischen T-Zellen vor dem Priming.

Somit konnte gezeigt werden, dass reife dendritische Zellen, nachdem sie als Monozyten mit einem *mart*-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektor transduziert wurden, zur Generierung von Mart-spezifischen zytotoxischen T-Zellen geeignet sind.

3.5.6.2 Funktionalität der Mart-spezifischen zytotoxischen T-Zellen

Um die Funktionalität der Mart-spezifischen zytotoxischen T-Zellen zu testen, werden Zielzellen benötigt, welche das Mart Protein exprimieren. Erkennen die T-Zellen diese Zielzellen, exprimieren sie Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF und können die Zellen lysieren. Auch müssen diese Zellen HLA-A2⁺ sein, da die Epitope des Mart Proteins insbesondere über diesen HLA-Typ präsentiert werden. Als Zielzellen wurden verschiedene Melanomzelllinien eingesetzt, die von Prof. Schadendorf vom DKFZ Heidelberg freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

3.5.6.2.1 Charakterisierung der Melanomzelllinien

Als Zielzellen wurden die Melanomzelllinien UKRV-Mel 15a, UKRV-Mel 21a, Ma-Mel 59a und Ma-Mel 91a eingesetzt. Zunächst wurde die Mart- und HLA-A2-Expression dieser Zelllinien im FACS-Gerät analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 gezeigt.

Tabelle 3.9: Mart- und HLA-A2-Expression von Melanomzelllinien.

Zelllinie	Mart-Expression [%]	HLA-A2-Expression [%]
UKRV-Mel 15a	99,2	82,7
UKRV-Mel 21a	90,9	96,2
Ma-Mel 59a	0,5	99,8
Ma-Mel 91a	93,9	9,4

Die Zelllinien UKRV-Mel 15a und UKRV-Mel 21 exprimierten sowohl Mart als auch HLA-A2. Wie erwartet wardie Zelllinie Ma-Mel 59a HLA-A2⁺, exprimierte aber kein Mart. Im Gegensatz dazu exprimierte Ma-Mel 91a zu ca. 94% das Mart-Protein, war jedoch nur zu geringem Anteil HLA-A2⁺.

3.5.6.3 Zytokinsezernierung von zytotoxischen T-Zellen

Um die Fähigkeit der T-Zellen zur Zytokinsekretion zu testen, wurden wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben Monozyten oder unreife DCs mit dem *mart*-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektor transduziert, maturiert und für die Stimulierung von T-Zellen eingesetzt. Da die Effizienz der Stimulierung von der Anzahl der Mart-präsentierenden DCs abhängen kann, wurde zu jedem Stimulierungszeitpunkt die Transduktionseffizienz der DCs analysiert. Die Daten sind in Tabelle 3.10 wiedergegeben.

Tabelle 3.10: Transduktionseffizienzen der für die T-Zellstimulierung eingesetzten DCs.

Donor	7		14		15		20	
Tag der Transduktion ¹	1	6	1	6	1	6	1	6
Zeitpunkt der Analyse	Transduktionseffizienz [%]							
Priming	10,4	38,2	14,6	25	16,3	49,2	21,7	16,1
1. Restimulierung	11,9	28	14,4	19,3	38,3	34,8	11,2	10,5
2. Restimulierung	20,1	18,5	16,2	28,8	28,8	15,2	29,5	26,4

¹: Die Zellen wurden an Tag 1 oder 6 nach Isolierung mit dem [SIV_{4xko-Mart}Vpx(VSV)] transduziert und anschließend maturiert.

Die Analyse der Mart-Expression der reifen dendritischen Zellen zeigt teilweise deutliche Unterschiede zwischen den an Tag 1 und Tag 6 transduzierten Zellen. Dies könnte bedeuten, dass die T-Zellen aus beiden Ansätzen unterschiedlich effizient stimuliert wurden. Da die jedoch die Funktionalität der T-Zellen beider Ansätze nicht direkt miteinander verglichen werden sollten, sind identische Transduktionseffizienzen keine Voraussetzung.

Im nächsten Schritt wurde die Zytokinproduktion der stimulierten zytotoxischen T-Zellen analysiert. Die Zellen wurden über Nacht mit den in Kapitel 3.5.6.2.1 charakterisierten Melanomzelllinien UKRV-Mel 15 a, -21a, Ma-Mel 59a und - 91a in einem Verhältnis von 1:1 co-kultiviert. 16 Stunden später wurden die Überstände in einem ELISA auf die Anwesenheit der Zytokine IFN- γ , TNF- α und GM-CSF analysiert. Ein geringer Zytokingehalt wurde bereits im Überstand der verschiedenen Melanomzelllinien detektiert, welche ohne zytotoxische T-Zellen kultiviert wurden. Diese Werte wurden von denjenigen Zytokinkonzentrationen abgezogen, welche in den Überständen der co-Kultivierungen aus Melanomzellen und zytotoxischen T-Zellen ermittelt wurden. Die in Abb. 3.31 dargestellten Konzentrationen zeigen also nur die Zytokinproduktion der zytotoxischen T-Zellen. Die zytotoxischen T-Zellen, welche mit DCs stimuliert wurden, die an Tag 1 nach Isolierung transduziert wurden, wurden mit der jeweiligen Spendernummer und d1 bezeichnet (z.B. D7d1). Die T-Zellen, welche mit

DCs stimuliert wurden, die an Tag 6 transduziert wurden, wurden mit der jeweiligen Spendernummer und d6 benannt (z.B. D7d6). Die T-Zellen der Spender D7 und D15 wurden nur auf den Zelllinien UKRV-Mel 21a und Ma-Mel 59 a untersucht.

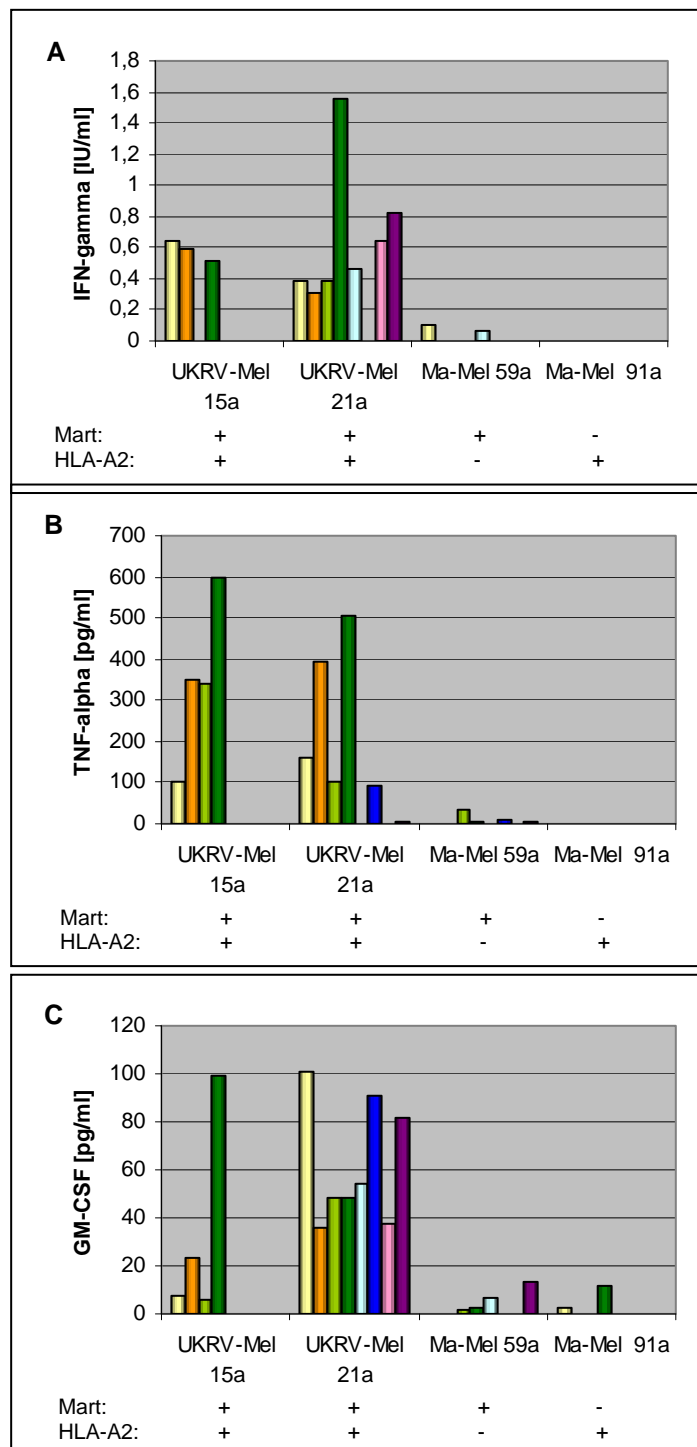


Abb. 3.31: Zytokinsekretion von zytotoxischen T-Zellen nach Stimulierung mit Mart-exprimierenden dendritischen Zellen. Die generierten CTLs verschiedener Donoren wurden im Verhältnis 1:1 mit den angegebenen Melanomzelllinien co-kultiviert. Die Expression der Proteine Mart und HLA-A2 sind für die jeweilige Zelllinie angegeben (+: Expression; -: Keine Expression). Nach 16h Inkubation wurden die Überstände im ELISA auf die Anwesenheit von IFN- γ (A), TNF- α (B) und GM-CSF (C) analysiert. Die Konzentrationen der Überstände der alleine kultivierten Melanomzelllinien wurden von den Konzentrationen aus den co-Kultivierungen abgezogen. Die Donoren D7 und D15 wurden nur auf den Zelllinien UKRV-Mel 21a und Ma-Mel 59a getestet. Die Messung erfolgte in Duplikaten.

Im Überstand aus co-Kultivierungen mit Mart⁻- oder HLA-A2⁻-Melanomzellen konnten wie erwartet keine oder nur eine geringe Zytokinkonzentration detektiert werden. Durch die co-Kultur mit den beiden Mart⁺- und HLA-A2⁺-Zelllinien wurde eine Zytokinproduktion der T-Zellen aus beiden Ansätzen induziert. Die Zytokinkonzentration scheint abhängig von der eingesetzten Zelllinie zu sein. So konnte für D14d1 auf der Zelllinie UKRV-Mel 15a nur ca. 10 pg/ml GM-CSF gemessen werden, auf der Zelllinie UKRV-Mel 21a erzielte der gleiche Donor die 10-fache Konzentration. Des weiteren scheint die Zytokinkonzentration auch Donor-spezifisch zu sein. Eine Korrelation zwischen Transduktionseffizienz der für die Stimulierungen eingesetzten dendritischen Zellen und der Zytokinproduktion der T-Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Der SIV_{smm}PBJ-Vektor ist aber geeignet, um mit transduzierten und zu reifen dendritischen Zellen maturierten Monozyten Mart-spezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren, welche nach Zusammentreffen mit dem Antigen Mart auf Melanomzelllinien die Zytokine IFN- γ , TNF- α und GM-CSF produzieren und sezernieren. Diese Fähigkeit der T-Zellen ist für die Bildung einer Immunantwort *in vivo* sehr wichtig, da diese Zytokine weitere Immunzellen anlocken und aktivieren können.

3.5.6.4 Zytotoxische Aktivität der generierten zytotoxischen T-Zellen

Die lytische Aktivität der zytotoxischen T-Zellen konnte für die Donoren 14 und 20 bereits mikroskopisch beobachtet werden. Die T-Zellen wurden für die Zytokinanalyse (Kapitel 3.5.6.3) mit der Mart⁺-Melanomzelllinie UKRV-Mel 21a und mit der Mart⁻-Melanomzelllinie Ma-Mel 91a über Nacht co-kultiviert. Dabei lysierten die T-Zellen beider Ansätze die Zellen der Mart⁺-Melanomzelllinie, wohingegen die Zellen der Mart⁻-Melanomzelllinie nicht erkannt

wurden. In Abb. 3.32 sind die Aufnahmen der verschiedenen Zelllinien mit und ohne Zugabe der zytotoxischen T-Zellen des Donors 20 gezeigt.

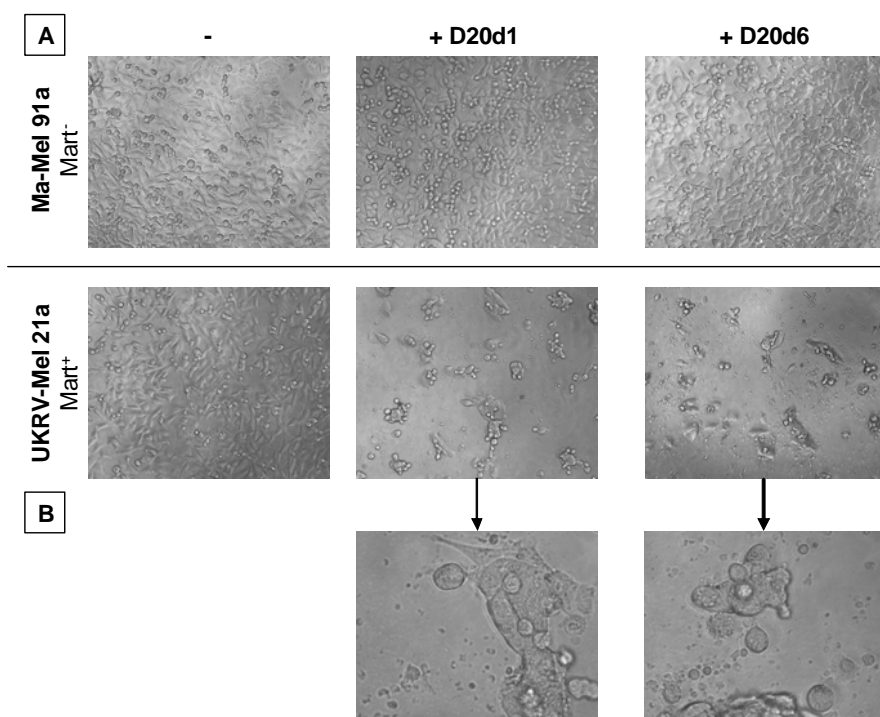


Abb. 3.32: Generierte zytotoxische T-Zellen erkennen und lysieren Mart⁺-Melanomzellen. Die generierten CTLs des Spenders 20 wurden im Verhältnis 1:1 mit den Melanomzelllinien Ma-Mel 91a und UKRV-Mel 21a co-kultiviert. Nach 16h Inkubation wurden die Zelllinien fotografiert. A: 10-fache Vergrößerung. B: 400-fache Vergrößerung.

Durch die mikroskopische Auswertung konnte kein Unterschied zwischen den T-Zellen, welche mit den an unterschiedlichen Tagen transduzierten dendritischen Zellen stimuliert wurden, beobachtet werden. Dies zeigt, dass Mart-spezifische zytotoxische T-Zellen mit DCs generiert werden konnten, die als Monozyten oder unreife DCs mit dem SIV_{smm}PBj-Vektor transduziert wurden. Die zytotoxischen T-Zellen besaßen noch die Eigenschaft, Mart-exprimierende Melanomzellen zu lysieren.

3.5.6.4.1 Quantitative Analyse der lytischen Kapazität der zytotoxischen T-Zellen

Um die zytotoxische Aktivität der T-Zellen, die bereits in Kapitel 3.5.6.4 mikroskopisch beobachtet werden konnte, quantifizieren zu können, wurde ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Messung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH). Lysierte Zellen setzen dieses Enzym in den Überstand frei. Über eine enzymatische

Reaktion wird ein Substrat in einen Farbstoff umgesetzt, dessen Absorption im ELISA-Gerät detektiert werden kann.

3.5.6.4.1.1 Bestimmung der optimalen Zelldichte der Zielzellen für den Zytotoxizitätsassay

Als Zielzellen für die zytotoxischen Zellen wurden die Melanomzelllinien UKRV-Mel 21a und Ma-Mel 91a eingesetzt. Bevor der Zytotoxizitätsassay durchgeführt werden konnte, musste zunächst die geeignete Zellzahl für jede Zelllinie bestimmt werden, da jede Zelllinie unterschiedliche Mengen an LDH freisetzt. Die Zellen wurden dazu in unterschiedlichen Verdünnungen in 96-Lochplatten ausgesät. Die Hälfte der Zellen wurde in Assay-Medium kultiviert. Diese Zellen setzten die geringste LDH-Menge frei (low control, LC). Die andere Hälfte wurde in Assay-Medium mit 1% Triton X-100 kultiviert. Dieses Detergenz zerstört die Zellmembranen, so dass in diesem Ansatz die maximale LDH-Menge freigesetzt wurde (high control, HC). Für den Zytotox-Assay wurde diejenige Zellzahl eingesetzt, bei welcher nach 16 h Inkubation die größte Differenz zwischen minimaler und maximaler LDH-Freisetzung gemessen wurde konnte (Abb. 3.33).

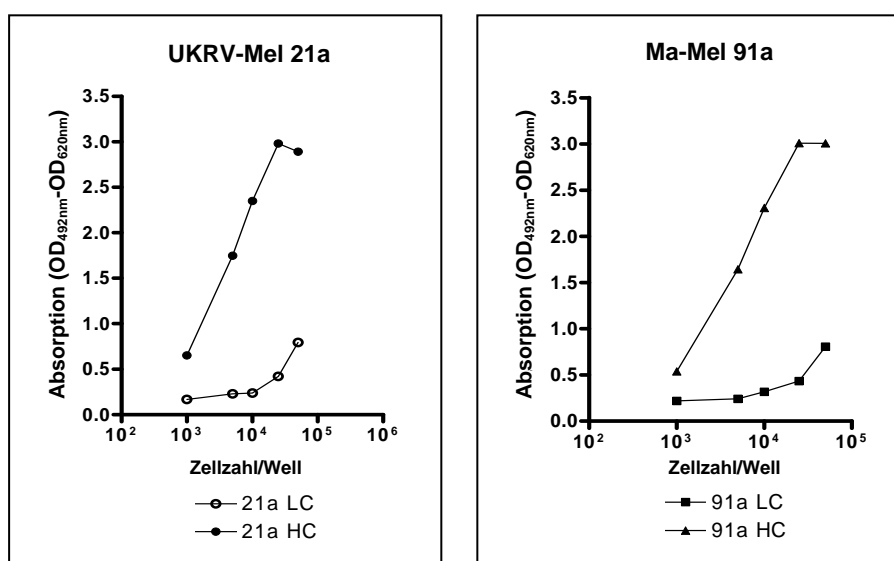


Abb. 3.33: Bestimmung der optimalen Zelldichte der Melanomzelllinien für den Zytotoxizitätsassay. Die Melanomzelllinien UKRV-Mel 21a und Ma-Mel 91a wurden in verschiedenen Verdünnungen ausgesät. Die Zellen wurden nur in Medium (min. LDH-Gehalt) oder in Medium + 1% Triton X-100 (max. LDH-Gehalt) für 16 h kultiviert. Im ELISA-Reader wurde der LDH-Gehalt indirekt über die Absorption eines Farbstoffs, welcher durch die LDH gebildet wurde, bestimmt. Die Zellzahl, bei welcher der Unterschied zwischen min. und max. LDH-Gehalt am größten war, wurde für die weiteren Versuche eingesetzt. Die Messung erfolgte in Triplikaten.

Die optimale Zelldichte der Zelllinie UKRV-Mel 21a betrug 8×10^3 Zellen/96-Loch und für die Zelllinie Ma-Mel 91a 9×10^3 Zellen/96-Loch.

3.5.6.4.1.2 Bestimmung der lytischen Kapazität der zytotoxischen T-Zellen

Mit Hilfe des Zytotoxizitätsassay sollte die lytische Kapazität der T-Zellen quantifiziert werden. Um die lytische Kapazität der zytotoxischen T-Zellen bestimmen zu können, wurden wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben $CD8^+$ -T-Zellen mit Mart-exprimierenden dendritischen Zellen stimuliert. In Tabelle 3.11 sind die Transduktionseffizienzen der für die Stimulierung eingesetzten DCs des Donors 14 aufgeführt.

Tabelle 3.11: Transduktionseffizienzen der zum T-Zell-Priming eingesetzten DCs des Donors 14.

Zeitpunkt der Analyse	Transduktionseffizienz DCd1 ¹	Transduktionseffizienz DCd6 ²
Priming	61,1 %	45 %
1. Restimulierung	37,2 %	53,3 %
2. Restimulierung	31,9 %	68,8 %

¹ DCs wurden am Tag 1 nach Isolierung transduziert.

² DCs wurden am Tag 6 nach Isolierung transduziert.

Die mit diesen DCs generierten zytotoxischen T-Zellen wurden eine Woche nach der 2. Restimulierung im Zytotoxizitätsassay eingesetzt.

Optimalerweise werden in derartigen Assays verschiedene Verhältnisse von zytotoxischen T-Zellen zu Zielzellen eingesetzt. Aufgrund der geringen Anzahl an T-Zellen war dies hier jedoch nicht möglich. Daher wurde das höchste Verhältnis von T-Zellen zu Zielzellen eingesetzt, welches aufgrund der niedrigen Zellzahlen möglich war. Für die CTL-d1 konnte aufgrund der geringen Zellzahlen ein Verhältnis von 25:1 und für die CTL-d6 ein Verhältnis von 12:1 eingesetzt werden. Nach 16 h Stunden wurde der Überstand im ELISA-Reader analysiert. Die Bestimmung des prozentualen Anteils an lysierten Zellen wurde wie in Kapitel 2.2.4.6 beschrieben durchgeführt. In Abb. 3.35 ist der prozentuale Anteil der lysierten Zellen der Mart⁺-Melanomzelllinie UKRV-Mel 21a und der Mart⁻-Zelllinie Ma-Mel 91a graphisch dargestellt.

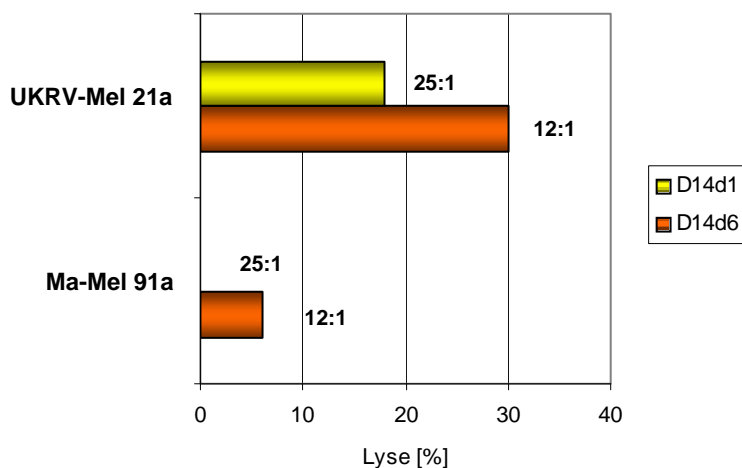


Abb. 3.35: Lytische Kapazität der generierten zytotoxischen T-Zellen. Die CTL D14d1 des Donors 14 wurden im Verhältnis 25:1 und die CTL D14d6 wurden im Verhältnis 12:1 mit den Melanomzellen UKRV-Mel 21a und Ma-Mel 91a co-kultiviert. Nach 16 h wurde der prozentuale Anteil der lysierten Zellen im ELISA-Reader ermittelt. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt.

Die zytotoxischen T-Zellen aus den verschiedenen Ansätzen konnten jeweils die Mart-exprimierende Zelllinie erkennen und lysieren. Dabei lysierten die CTL D14d1 18% der Mart⁺-Melanomzelllinie. Für die CTLs D14d6 konnten sowohl lysierte Zellen der Mart⁺-Melanomzelllinie (29%), als auch für die Mart⁻-Zelllinie (6%) detektiert werden.

Der Zytotoxizitätsassay wurde mit T-Zellen weiterer Spender wiederholt durchgeführt, es konnte jedoch keine Lyse der Zielzellen detektiert werden.

Somit konnte nur prinzipiell gezeigt werden, dass auch reife dendritische Zellen, welche bereits als Monozyten transduziert werden, CD8⁺-T-Zellen gegen ein spezifisches Tumorantigen primen können. Die so generierten zytotoxischen T-Zellen können Tumorzellen, die dieses Antigen exprimieren, erkennen und lysieren.

3.5.7 Eignung von Makrophagen zum T-Zellpriming nach Transduktion mit SIV_{smm}PBj-Vektoren

Mit SIV_{smm}PBj-Vektoren transduzierte Monozyten konnten sowohl in dendritische Zellen, als auch zu Makrophagen differenziert werden (Kapitel 3.3 und 3.4). Beide maturierten Zelltypen sind wichtige Zellen des Immunsystems und besitzen unterschiedliche Funktionen. Durch die

Transduktion von Monozyten könnten beide Zelltypen für eine Anwendung in der Immuntherapie eingesetzt werden. Nachdem gezeigt werden konnte, dass als Monozyten transduzierte reife dendritische Zellen noch die Funktion besitzen zytotoxische T-Zellen zu generieren, wurde dies auch mit Makrophagen untersucht. Dazu wurden Monozyten mit dem [SIV_{4xko-Mart}(VSV)Vpx]-Vektor mit einer MOI von 1 transduziert und zu Makrophagen differenziert. Durchschnittlich exprimierten ca. 38% der transduzierten Makrophagen das Mart-Protein.

Die mit Mart-übertragenden PBj-Vektoren transduzierten Makrophagen wurden anschließend auf ihre Fähigkeit getestet, Mart-spezifische zytotoxische T-Zellen generieren zu können. Die Mart-Spezifität der T-Zellen wurde in einem Zytotoxizitätsassay analysiert.

Zur Generierung der zytotoxischen T-Zellen wurden mit dem [SIV_{4xko-Mart}(VSV)Vpx]-Vektor transduzierte Monozyten zu Makrophagen differenziert und diese Zellen nach Aktivierung mit LPS und CD40 Ligand mit CD8⁺-Zellen des gleichen Donors inkubiert. Nach ca. 9-12 Tagen wurden frisch generierte transduzierte Makrophagen mit den gleichen T-Zellen gemischt. Nach einer Woche erfolgte die Analyse der Mart-Spezifität der T-Zellen in einem Zytotoxizitätsassay. Als Zielzellen der generierten zytotoxischen T-Zellen wurden die Mart⁺-Melanomzelllinie UKRV-Mel 21a und die Mart⁻-Melanomzelllinie Ma-Mel 91a eingesetzt. Die T-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:10 zu den Zielzellen gegeben. Die Analyse der lysierten Zellen erfolgte 16 h später in einem ELISA-Reader. Für einen Spender (Donor 19) konnte eine Zelllyse nachgewiesen werden (Abb. 3.36).

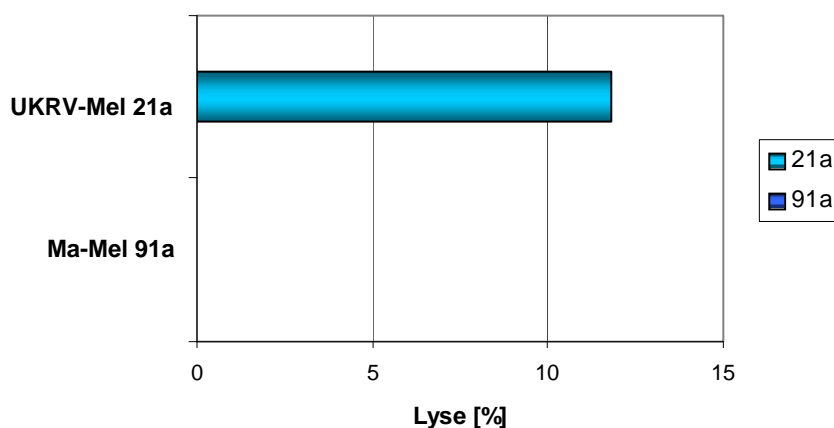


Abb. 3.36: Zytotoxische Aktivität von T-Zellen nach Stimulierung mit Makrophagen. Die zytotoxische T-Zellen des Donors 19 wurden im Verhältnis 10:1 mit den Melanomzellen UKRV-Mel 21a und Ma-Mel 91a co-kultiviert. Nach 16 h wurde der prozentuale Anteil der lysierten Zellen im ELISA-Reader ermittelt. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt.

Die Auswertung des Zytotoxizitätsassays zeigte, dass ca. 12% der Mart⁺-Melanomzelllinie UKRV-Mel 21a durch die CTLs des Donors 19 lysiert wurden. Es wurden keine lysierten Zellen der Mart⁻-Zelllinie Ma-Mel 91a detektiert.

Obwohl der Zytotoxizitätsassay nur mit einem Spender erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde prinzipiell gezeigt, dass mit dem SIV_{smm}PBj-Vektor transduzierte Monozyten auch zu Makrophagen differenziert werden können, welche noch die Funktion besitzen, Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen generieren zu können.

3.6 Mögliche Tiermodelle für Anwendungen des SIV_{smm}PBj-Vektoren

Um mögliche Anwendungen des SIV_{smm}PBj-Vektors in einem Tiermodell testen zu können, wurden im Folgenden die Transduktionseigenschaften des Vektors auf murinen und simianen Monozyten untersucht.

3.6.1 Transduktion von murinen Monozyten

3.6.1.1 Isolierung und Kultivierung muriner Monozyten

Um die Transduktionseigenschaften der viralen Vektoren auf murinen Monozyten zu analysieren, wurden die Zellen aus dem Knochenmark gewonnen, da bei Mäusen aus diesem Organ mehr Monozyten gewonnen werden können als aus Blut. Dazu wurde das Knochenmark aus beiden Femurknochen von B6CBAF^{*}C57BL76-Mäusen gespült, vereint und die Leukozyten mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten separiert. Um eine Aktivierung der Monozyten durch die Isolierung zu vermeiden, wurde eine Negativdepletion durchgeführt, bei welcher alle Knochenmarkzellen außer Monozyten an Antikörper gebunden werden. Diese Primärantikörper wurden wie von León *et al.* (2004) beschrieben, gegen Oberflächenmarker folgender Zelltypen ausgewählt: B- und T-Lymphozyten, dendritische Zellen, MHC-II-exprimierende Zellen und hämatopoetische Vorläuferzellen (s. Tabelle 2.15). Mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, welcher an den Fc-Teil der Primärantikörper bindet und an magnetischen Beads gekoppelt war, konnten die mit Antikörpern markierten Zellen an einem Magneten zurückgehalten werden, während sich die nicht gebundenen Monozyten im Überstand befanden. Der Anteil der Monozyten wurde vor und nach Isolierung im FACS-Gerät mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker Ly-6C und CD11b nachgewiesen. Eine exemplarische FACS-Analyse ist in Abb. 3.37 gezeigt.

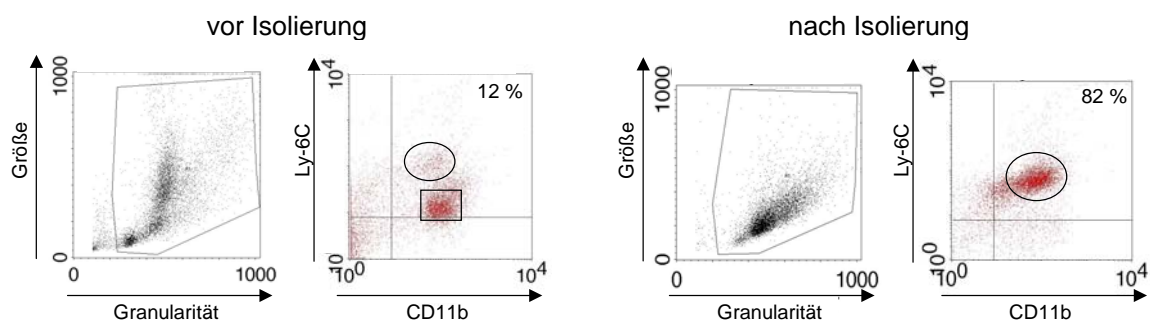


Abb. 3.37: Anteil von Monozyten vor und nach Isolierung aus murinem Knochenmark. Das Knochenmark aus 8 Mäusen wurde vereint und der Monozytenanteil vor und nach Depletion der Zellen im FACS-Gerät analysiert. Die Monozyten wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker Ly-6C und CD11b nachgewiesen. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf den Monozytenanteil. (Kreis: Monozyten; Rechteck: Neutrophile).

Wie zu erkennen ist, exprimieren neben Monozyten (im Kreis in Abb. 3.37) auch Neutrophile (im Rechteck in Abb. 3.37) die Oberflächenmarker Ly-6C und CD11b. Monozyten exprimieren jedoch stärker den Marker Ly-6C und können somit eindeutig identifiziert werden. In Tabelle 3.12 ist die Zellzahl pro Maus, der Anteil an Monozyten aus murinem Knochenmark vor und nach Depletion, sowie der Mittelwert aus vier Experimenten zusammengefasst.

Tabelle 3.12: Monozytenausbeute aus murinem Knochenmark.

Nr.	Mäuseanzahl ¹	vor Depletion		nach Depletion	
		Zellzahl/ Maus	Monozytenanteil [%]	Zellzahl/ Maus	Monozytenanteil [%]
1	5	9×10^6	16	$3,4 \times 10^5$	80
2	10	$5,63 \times 10^6$	13,6	$1,37 \times 10^5$	66,5
3	8	$9,43 \times 10^6$	12,3	$2,6 \times 10^5$	82
4	5	$8,16 \times 10^6$	10	$5,4 \times 10^5$	79
∅	28	$8,06 \times 10^6$	13	$3,2 \times 10^5$	76,9

¹ Das Knochenmark wurde jeweils vereinigt.

Nach der Depletion von Monozyten aus Knochenmark konnte eine durchschnittliche Reinheit von 77% erzielt werden, die Zellzahl betrug im Schnitt $3,2 \times 10^5$ Zellen pro Maus. Die isolierten Monozyten wurden in RPMI mit 10% FCS kultiviert. Aufnahmen der kultivierten Zellen an verschiedenen Tagen sind in Abb. 3.38 dargestellt. Um zu analysieren, zu welchen Zellen

die Monozyten im Laufe der Kultivierung differenzierten, wurde eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung durchgeführt. Mit dieser Methode werden bestimmte Zellkompartimente charakteristisch angefärbt, so dass verschiedene Zelltypen eindeutig bestimmt werden können. Wie die Abb. 3.38 A zeigt, konnten die Zellen über 9 Tage nach Isolierung erfolgreich kultiviert werden. Mit Hilfe der May-Grünwald-Giemsa-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die Monozyten innerhalb von 9 Tagen Kultivierung zu Makrophagen differenzierten (Abb. 3.38 B).

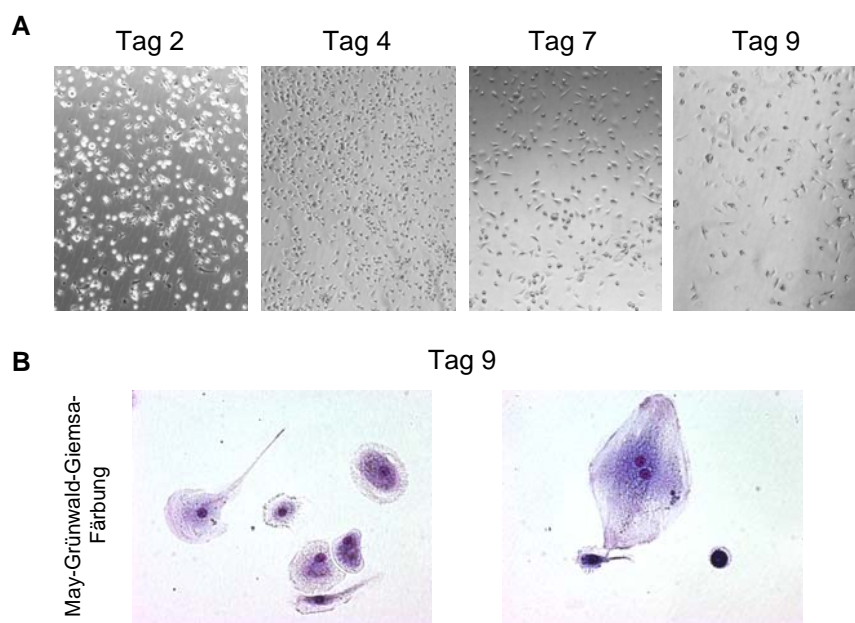


Abb. 3.38: Morphologie von kultivierten Monozyten und Makrophagen. A: Die kultivierten Zellen wurden an den Tagen 2, 4, 7 und 9 fotografiert (100-fache Vergrößerung). B: Zur Identifizierung der differenzierten Zellen wurde an Tag 9 eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung durchgeführt (400-fache Vergrößerung).

Charakteristisch für diese Zellen ist das stark vergrößerte Zytoplasma, welches eine bläuliche Färbung angenommen hat. Durch Plasmaausstülpungen, sogenannte Pseudopodien, können sich die Zellen fortbewegen. Dies ist möglich, da sich Aktin- und Myosinfilamente in den fadenförmigen Austülpungen befinden. Durch die Färbung nehmen die Kerne eine rötliche Farbe an. In der rechten Aufnahme sind zwei Zellkerne in einer Zelle zu erkennen. Dies kann geschehen, wenn aktivierte Makrophagen fusionieren und so mehrkernige Riesenzellen bilden. Typisch für Makrophagen sind die Granula, welche in der Aufnahme im Zytoplasma violett erscheinen. Sie werden Lysosomen genannt und enthalten Enzyme, Proteine und Peptide, mit deren Hilfe phagozytierte Pathogene zerstört werden können.

Die murinen Monozyten konnten erfolgreich isoliert und kultiviert werden, so dass für die nachfolgenden Transduktionsexperimente genügend Zellen mit einer ausreichenden Reinheit zur Verfügung standen.

3.6.1.2 Transduktionseffizienz von $SIV_{smm}PBj$ - und HIV-1-Vektoren auf murinen Monozyten

Um die Fähigkeit der lentiviralen $SIV_{smm}PBj$ - und HIV-1-Vektoren zur Transduktion von murinen Monozyten zu untersuchen, wurden die aufgereinigten Zellen an Tag eins nach Isolierung mit den lentiviralen Vektoren [$SIV_{PBj-EGFP}(VSV)$] und [$HIV-1_{EGFP}(VSV)$] mit einer MOI von 10 transduziert. Nach 7 Tagen wurde die EGFP-Expression der Zellen mikroskopisch ausgewertet. Es konnten jedoch keine grünen Zellen beobachtet werden. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, wurde das Transduktionsprotokoll geändert. Die Monozyten wurden nun an den Tagen 1 und 2 nach Isolierung mit jeweils einer MOI von 100 transduziert. Die Zellen wurden 7 Tage nach Transduktion im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Transduktionen die Viabilität der Monozyten stark verringerte. Dieser Effekt wurde besonders bei den Zellen deutlich, welche mit dem HIV-1-Vektor behandelt wurden. In Abb 3.39 ist eine exemplarische Aufnahme der transduzierten Zellen gezeigt.

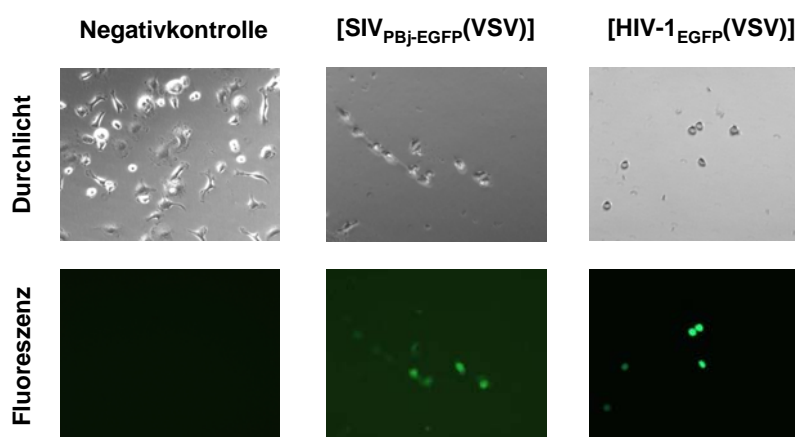


Abb. 3.39: Transduktion muriner Monozyten mit lentiviralen Vektoren. Die Zellen wurden an den Tagen 1 und 2 nach Isolierung mit den genannten Vektoren mit je einer MOI von 100 transduziert. Die Auswertung erfolgte 7 Tage nach Transduktion durch Auszählen der grünen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. (200-fache Vergrößerung).

Vergleicht man die transduzierten Monozyten mit untransduzierten Zellen, so wird der negative Effekt der Transduktion auf die Viabilität der Zellen deutlich. Dieser Effekt zeigte sich bei allen Transduktionsexperimenten, welche insgesamt dreimal durchgeführt wurden. Durch den Verlust viabler Zellen wird die Aussagekraft der Auswertung aufgrund zu geringer Zellzahlen stark reduziert, so dass keine Aussage hinsichtlich der Transduktionseffizienz beider Vektoren getroffen werden kann. Es kann jedoch gesagt werden, dass der SIV_{smm}PBj-Vektor auf murinen Monozyten nicht die guten Transduktionseigenschaften wie auf humanen Monozyten besitzt.

3.6.2 Eignung lentiviraler Vektoren zur Transduktion simianer Monozyten

Da Rhesusaffen (*Makaka mulatta*) und Schweinsaffen (*Makaka nemestrina*) als Tiermodell für lentivirale Vektoren in Frage kommen, z.B. für therapeutische Vakzinierungen, wurde die Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren zur Transduktion von Monozyten dieser zwei verschiedenen Affenspezies getestet.

3.6.2.1 Isolierung und Kultivierung primärer simianer Monozyten

Um eine Aktivierung der simianen Monozyten zu vermeiden, sollte aus Affenblut eine Negativdepletion durchgeführt werden, bei welcher alle Zellen außer Monozyten an Antikörper gebunden werden. Da jedoch kein Kit für eine Negativdepletion für simiane Monozyten erhältlich war, wurde ein Kit zur Negativdepletion von humanen Monozyten getestet, da einige humane Antikörper mit simianen Zellen kreuzreagieren. Die simianen Monozyten konnten damit jedoch nicht erfolgreich isoliert werden. Aufgrund dessen wurden die simianen Zellen mittels einer Positivisolierung aus Heparin-Blut mehrerer gesunder Schweins- und Rhesusaffen separiert. Die Leukozytenpopulation wurde über einem Ficoll-Gradienten von den restlichen Bestandteilen des Blutes getrennt und mit den Antikörpern, welche den Monozytenmarker CD14 erkennen und an magnetische Beads gekoppelt waren, inkubiert. Die so gebundenen Monozyten wurden auf einer Säule zurückgehalten, während alle anderen Zellen von der Säule gewaschen werden konnten. Der prozentuale Anteil der isolierten Monozyten wurde vor und nach der Anreicherung mit Hilfe des Monozyten-spezifischen Oberflächenmarkers CD14 bestimmt. Eine repräsentative FACS-Analyse für den Anteil an Monozyten vor und nach Isolierung aus dem Blut eines Schweins- und Rhesusaffen ist in Abbildung 3.40 gezeigt.

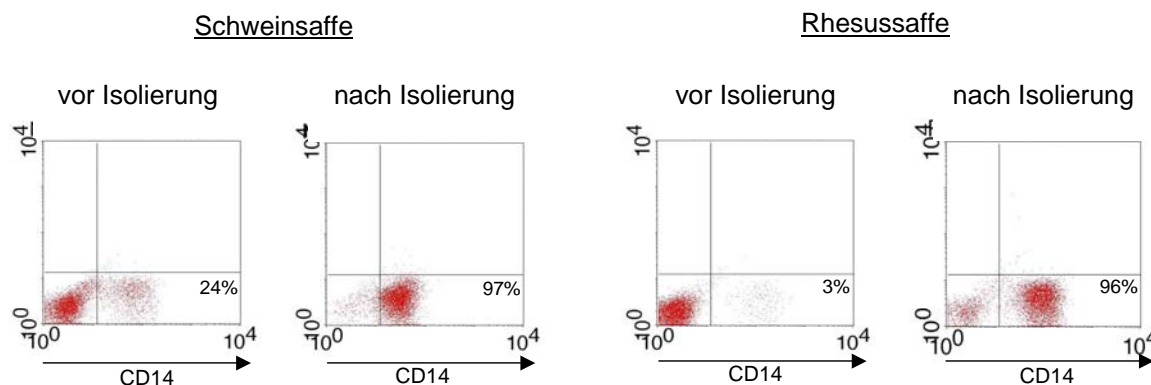


Abb. 3.40: Anteil an Monozyten vor und nach Isolierung. Der prozentuale Anteil an simianen Monozyten wurde anhand des spezifischen Markers CD14 im FACS-Gerät bestimmt. Gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel für einen Schweins- und Rhesusaffen.

Die Zellzahlen und die Reinheit der CD14⁺-Zellen vor und nach Isolierung aller durchgeführten Versuche sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst. Durchschnittlich konnten aus 30ml Blut eines Schweinsaffen nach der Positivisolierung $7,4 \times 10^6$ Zellen mit einer Reinheit der Monozyten von 96% gewonnen werden. Aus 30 ml Blut eines Rhesusaffen konnten im Schnitt in $2,9 \times 10^6$ Monozyten angereichert werden, welche eine Reinheit von 94,2% besaßen.

Die isolierten simianen Monozyten wurden zunächst in DMEM mit 10% autologem Plasma und 200mM Glutamin kultiviert. Da die Viabilität der Zellen jedoch sehr gering war, wurde im weiteren ein Medium mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 verwendet. Diese Zytokine induzieren die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen. Diese Zellen werden u.a. in der Immuntherapie eingesetzt. Aufgrund dessen kann hier die mögliche Anwendung der transduzierten simianen Monozyten für die Immuntherapie getestet werden.

Unter diesen Kultivierungsbedingungen war die Viabilität der Zellen hoch genug, um die Transduktionseigenschaften der lentiviralen Vektoren auf simianen Monozyten untersuchen zu können.

Tabelle 3.13: Monozytenausbeute und –reinheit aus simianem Blut.

		Schweinsaffen					Rhesusaffen			
		Vor Isolierung		Nach Isolierung			Vor Isolierung		Nach Isolierung	
Versuchs- chnr.	Tiernr.	Zellzahl $\times 10^7$	CD14+ [%]	Zellzahl $\times 10^6$	CD14+ [%]	Tiernr.	Zellzahl $\times 10^7$	CD14+ [%]	Zellzahl $\times 10^6$	CD14+ [%]
I	6508	3,43	24	5,5	91	A12	4,31	3	0,75	82
Ila	6508	5	21	8,55	98	424	2,6	14	4,1	98
Ilb	6496	2,6	27	5,8	97	92171	4,4	6	3	98
III	6503	2,22	15,3	3,4	99	551	2,76	6,8	1,3	96
IV	6496	3,32	25,1	7,1	95,9	223	1,24	13,4	0,35	97,2
V	6503	4,1	19,3	4,1	98,6	551	1,76	12,3	1,55	97,2
VII	297	5,4	14	6,1	96,4	306	1,7	15	2,3	96,2
VIII	323	8,5	11,4	9,2	94	223	1,7	16,5	3,5	97
X	6496	4	22,8	18,8	93,8	92144	1,88	4,82	0,8	81,66
XI	297	5,8	17,1	3,7	92,8	271	1,35	13,1	1,9	92,5
XII	6503	4,3	14	5,5	97	223	2,33	49	8,8	99
XIII	323	5,8	20	9,35	95	22	3,75	29	7,75	97
XIV	279	5,28	20,4	8,9	95,3	92171	3,5	8,3	2,05	92,6
∅		4,6	19,3	7,4	95,7		2,56	14,7	2,9	94,2

3.6.2.2 Transduktionseffizienz von SIV_{simm}PBJ- und HIV-1-Vektoren auf simianen Monozyten

Nach der Etablierung der Isolierungs- und Kultivierungsmethode konnten die Transduktionseigenschaften der lentiviralen Vektoren [SIV_{PBJ-EGFP}(VSV)] und [HIV-1_{EGFP}(VSV)] auf simianen Monozyten analysiert werden. An Tag 1 nach Isolierung wurden die Zellen parallel mit den beiden Vektoren mit jeweils einer MOI von 5 transduziert und 7 Tage später die EGFP-Expression im FACS-Gerät analysiert. Abb. 3.41 zeigt repräsentative Aufnahmen von transduzierten Monozyten eines Schweins- und Rhesusaffen. Die Ergebnisse der einzelnen Transduktionsexperimente und der Mittelwert sind in Abb. 3.42 dargestellt.

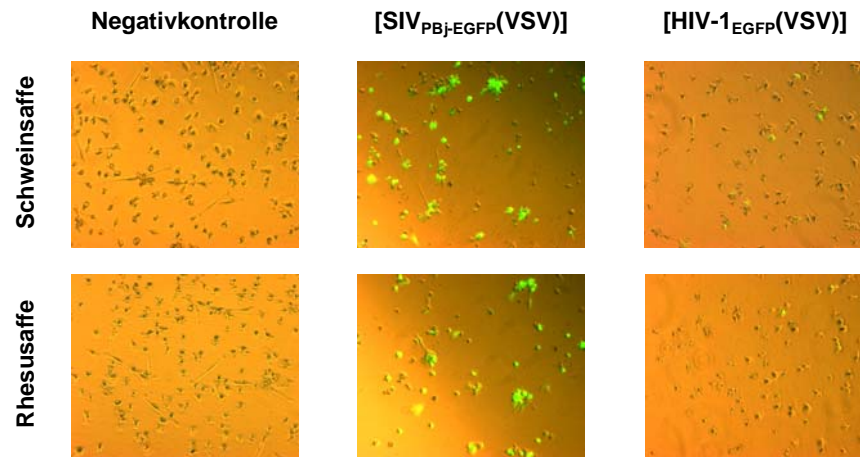


Abb. 3.41: Transduktion von simianen Monozyten mit lentiviralen Vektoren. Die Monozyten wurden mit einer MOI von 5 mit den oben genannten Vektoren transduziert. Die Analyse der EGFP-Expression erfolgte eine Woche später im FACS-Gerät. Gezeigt sind die repräsentativen Aufnahmen von Monozyten eines Schweinsaffen und Rhesusaffen. (100-fache Vergrößerung).

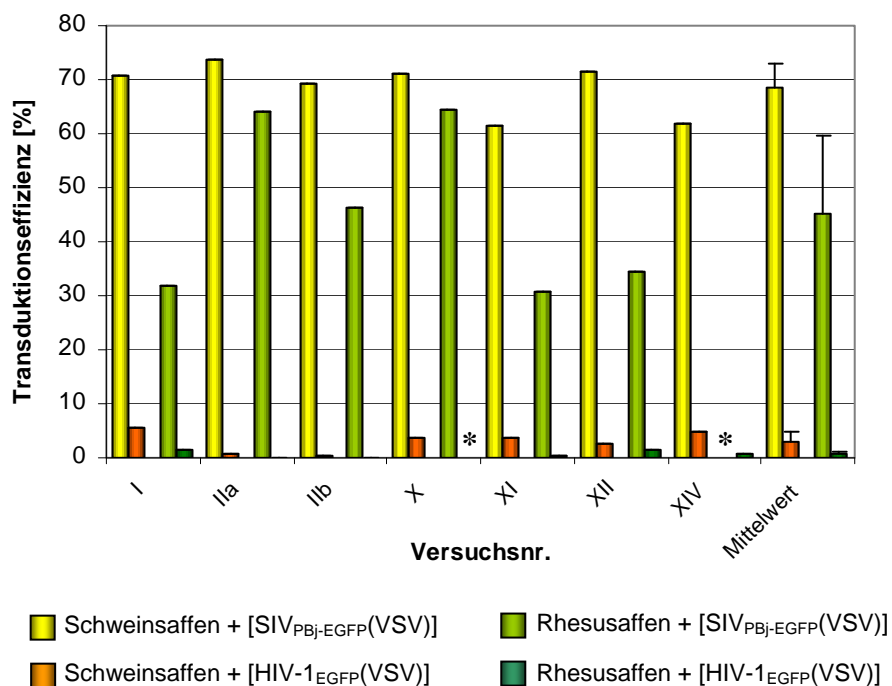


Abb. 3.42: Transduktionseffizienzen von [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)] und [HIV-1_{EGFP}(VSV)] auf simianen Monozyten. Zellen von Schweinsaffen und Rhesusaffen wurden an Tag 1 nach Isolierung mit den angegebenen Vektoren mit einer MOI von 5 transduziert. Die EGFP-Expressionsanalyse erfolgte eine Woche später im FACS-Gerät. Die Versuchsnummern beziehen sich auf Tabelle 3.13. Gezeigt ist die Transduktionseffizienz aller Versuche und deren Mittelwert. *: Auswertung aufgrund zu geringer Zellzahl nicht möglich.

Die jeweilige angegebene Versuchsnummer bezieht sich auf die Tabelle 3.13. Die Zellen des Rhesusaffen mit der Versuchsummer X bzw. XIV, welche mit dem [HIV-1_{EGFP}(VSV)] bzw. [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)] transduziert wurden, konnten nicht ausgewertet werden, da die Anzahl an viablen Zellen zu gering war (in Abb. 3.42 mit * gekennzeichnet). Im Allgemeinen konnte der [SIV_{PBj-EGFP}(VSV)]-Vektor die Monozyten beider Affenarten effizient transduzieren. Der Vektor erreichte auf Zellen der Schweinsaffen durchschnittlich eine Effizienz von 69% und auf Zellen der Rhesusaffen von 45%. Im Gegensatz dazu konnten mit dem [HIV-1_{EGFP}(VSV)]-Vektor Monozyten beider Affenarten nur mit geringer Effizienz ($\leq 3\%$) transduziert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die SIV_{simm}PBj-Vektoren die gleiche Fähigkeit wie auf humanen Monozyten besitzen, simiane Monozyten zu einem hohen Prozentsatz und deutlich besser als HIV-1-Vektoren zu transduzieren.

4. Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse der Transduktionseigenschaften von SIV_{smm}PBj-Vektoren. Es sollte untersucht werden, ob es neben humanen Monozyten weitere primäre Zellen gibt, bei welchen SIV_{smm}PBj-abgeleitete Vektoren einen Vorteil in der Transduktionskapazität gegenüber HIV-1-abgeleiteten Vektoren besitzen. Des Weiteren sollte die Eignung von SIV_{smm}PBj-Vektoren für den Einsatz in einer immuntherapeutischen Anwendung getestet werden. Hierbei wurde die hohe Effizienz, die diese Vektoren auf Monozyten haben genutzt, um humane Monozyten sowie unreife dendritische Zellen mit einem *mart-1*-übertragenden SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektor zu transduzieren. Anschließend wurde die Kapazität der maturierten dendritischen Zellen, Antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellen zu primen, analysiert. Schließlich sollten die Transduktionseigenschaften des Vektors für murine und simiane Monozyten untersucht werden, um ein Tiermodell für Anwendungen des SIV_{smm}PBj-Vektors zur Verfügung zu haben.

4.1 Transduktion von humanen hämatopoetischen Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind interessante Zielzellen für gentherapeutische Anwendungen (Van Tendeloo *et al.*, 2001), da sie die Vorläufer aller Zellen des Blutes sind und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Der Einsatz von lentiviralen Vektoren bietet den Vorteil, dass keine Zellteilung benötigt wird, um das Transgen in das Genom zu integrieren (Naldini *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1990). Jedoch können ruhende Stammzellen nicht sehr effizient mit HIV-1-abgeleiteten Vektoren transduziert werden. Durch eine Stimulierung der Stammzellen zur Verbesserung der Transduktion könnten wichtige Eigenschaften verloren gehen. So wurde gezeigt, dass diejenigen Stammzellen, die sich in der G0-Phase befinden, *in vitro* eine vielfach höhere Differenzierungskapazität besitzen als Stammzellen, welche sich in der G1-Phase befinden (Summers *et al.*, 2001). Ca. 70% der Stammzellen aus Nabelschnurblut befinden sich in der G0-Phase des Zellzyklus (Lucotti *et al.*, 2000). Da für SIV_{smm}PBj-Vektoren bereits eine effiziente Transduktion humaner Monozyten, welche sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden, gezeigt werden konnte (Mühlebach *et al.*, 2005), sollte nun im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob der SIV_{smm}PBj-Vektor auch humane, ruhende hämatopoetische Stammzellen transduzieren kann. Hierbei wurden nicht nur die absolute Transduktionseffizienz analysiert, sondern auch das Differenzierungspotenzial der transduzierten Zellen *in vitro* und *in vivo*.

4.1.1 Transduktionseffizienz von SIV_{smm}PBj-Vektoren für humane hämatopoetischen Stammzellen

Auf unstimulierten Stammzellen erzielte der SIV_{smm}PBj-Vektor im Vergleich zu den HIV1- und HIV-2-abgeleiteten Vektoren die geringste Transduktionseffizienz. Es scheint, dass die HIV-1- und HIV-2-abgeleiteten Vektoren besser für die Transduktion humaner Stammzellen geeignet sind, als die SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektoren. Diese Beobachtung stimmt mit bereits publizierten Daten überein, in denen gezeigt wurde, dass ein HIV-1-abgeleiteter Vektor effizienter humane hämatopoetische Stammzellen transduzieren kann als ein SIV_{mac}-abgeleiteter Vektor (Dupuy *et al.*, 2005).

Ähnliche Transduktionseffizienzen mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor auf hämatopoetischen Stammzellen erzielten Zielske *et al.* (2003), dabei setzten sie sogar eine 10-fach geringere MOI ein. Diese Daten scheinen zunächst widersprüchlich. Da die Zellen in der publizierten Arbeit jedoch mit 10% FCS kultiviert wurden, könnte dies bereits eine Stimulierung der Zellen induziert haben, wodurch sie susceptibler für die Transduktion mit den lentiviralen Vektoren geworden sind. Um dies in der vorliegenden Arbeit zu vermeiden, wurden die Zellen zum Transduktionszeitpunkt nicht mit FCS, sondern mit humanem AB-Serum kultiviert. Die publizierten Daten weiterer Gruppen weichen aufgrund unterschiedlicher Transduktionsprotokolle und Kultivierungsmethoden stark voneinander ab. Scherr *et al.* (2002) erzielten mit einer MOI von 3 eine Transduktionseffizienz von 13%. Haas *et al.* (2000) wiederum erzielten ähnliche Ergebnisse, setzten jedoch eine 100-fach höhere MOI ein. Daher können diese Daten mit den in dieser Arbeit erzielten Werten nur schlecht miteinander verglichen werden.

Gründe für die geringen Transduktionseffizienzen lentiviraler Vektoren auf unstimulierten Stammzellen könnten in der Aktivität des Proteasoms liegen. Wird das Proteasom inhibiert, kann mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor eine höhere Transduktionseffizienz erzielt werden (Santoni de Sio *et al.*, 2006). Weiterhin wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Restriktion der lentiviralen Vektoren nach dem Zelleintritt und vor der Integration geschieht. Das Proteasom könnte die Transduktion direkt durch Abbau des viralen Kerns inhibieren oder indirekt durch Abbau von zellulären Faktoren, welche während der frühen Schritte der Transduktion benötigt werden.

Der SIV_{smm}PBj-Vektor ist nicht in der Lage, diesen Block auf hämatopoetischen Stammzellen zu überkommen und besitzt keinen Transduktionsvorteil gegenüber den anderen lentiviralen Vektoren für humane hämatopoetische Stammzellen.

4.1.2 Lentivirale Vektoren können das *in vitro*-Differenzierungspotenzial von hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen

Um die Differenzierungseigenschaften der mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduzierten Stammzellen *in vitro* zu analysieren, wurden Zellen aus Nabelschnurblut eingesetzt. Im Vergleich zu mobilisierten CD34⁺-Zellen zeigen CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut *in vitro* eine höhere Differenzierungskapazität, die sich auch in ihrer ausgezeichneten Repopulierungsfähigkeit *in vivo* widerspiegelt (Ng *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2001). Die *in vitro*-Differenzierungskapazität der mit den verschiedenen Vektoren transduzierten CD34⁺-Zellen wurde in einem Progenitorassay analysiert, in welchem die Bildung von Granulozyten-, Erythrozyten- und Makrophagenvorläuferzellen untersucht werden kann. Dabei zeigte sich, dass das *in vitro*-Differenzierungspotenzial der Stammzellen durch die Transduktion mit den lentiviralen Vektoren im Vergleich zu untransduzierten Zellen verändert wurde. Zellen, die mit dem SIV_{smm}PBJ-Vektor transduziert wurden, bildeten mehr Vorläuferkolonien. Das gegenteilige Verhalten wurde bei den mit HIV-1-Vektoren transduzierten Zellen beobachtet. Diese Zellen bildeten insgesamt weniger Vorläuferzellen, deutlich wurde dies insbesondere für Makrophagenkolonien. Auch die Transduktion mit dem HIV-2-Vektor scheint die Differenzierung in diesen Zelltyp zu beeinträchtigen, jedoch weniger stark als der HIV-1-Vektor. Durch die Transduktion mit dem HIV-2- und SIV_{smm}PBJ-Vektor scheinen die Zellen bevorzugt in die granulozytäre Linie zu differenzieren. Es sind jedoch insgesamt nur sehr wenige Granulozytenkolonien ausgewachsen, so dass die Aussagekraft dieser Auswertung niedrig ist. Auf die Differenzierung der Stammzellen in die erythroiden Vorläuferzellen hatte die Transduktion mit den lentiviralen Vektoren nur einen geringen Einfluss.

Der Einfluss der lentiviralen Vektoren auf das *in vitro*-Differenzierungspotenzial der hämatopoetischen Stammzellen könnte z.B. durch die Expression der akzessorischen Gene bewirkt werden. Diese werden von den in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren in die Zielzellen übertragen und dort exprimiert. Nur der HIV-2-Vektor besitzt eine Deletion des *nef*-Gens. Ein möglicher Hinweis auf den Einfluss der akzessorischen Gene ist, dass der SIV_{smm}PBJ- und HIV-2-Vektor die Differenzierung der Stammzellen in ähnlicher Weise beeinflussten. Beide Vektoren besitzen das akzessorische Gen *vpx*, während der HIV-1-Vektor für das akzessorische Gen *vpu* codiert. Das Vpx Protein, welches auch für die Transduktion von humanen Monozyten essentiell ist, könnte möglicherweise auch die Differenzierung von humanen Stammzellen beeinflussen. Ein weiterer Hinweis für den Einfluss der akzessorischen Gene ist, dass durch die Expression des Nef Proteins nach Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor die

Differenzierung der Zellen in die lymphoide Linie beeinflusst wird (Dorival *et al.*, 2008). Diese Vorläuferzellen können mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Progenitorassay jedoch nicht untersucht werden, so dass diese Beobachtungen nicht verglichen werden können.

Um die Rolle der akzessorischen Gene in der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen genauer zu untersuchen, könnten die Zellen mit einzelnen Knockout-Mutanten für die akzessorischen Gene transduziert werden und anschließend die Bildung der verschiedenen Kolonietypen analysiert werden.

Bisher wurde der Einfluss der Transduktion auf die Differenzierung in die verschiedenen Kolonietypen untersucht, unabhängig davon, ob die einzelnen Kolonien auch tatsächlich das Transgen aufgenommen hatten. Im nächsten Schritt wurde die EGFP-Expression der Kolonien im gleichen Progenitorassay analysiert. Unerwarteterweise war die EGFP-Expression der verschiedenen Kolonietypen sehr inhomogen und stimmten nicht mit den oben beschriebenen verändertem Differenzierungspotenzial der transduzierten Stammzellen überein. Es konnten nur EGFP-exprimierende Granulozytenvorläufer beobachtet werden, die aus Stammzellen nach Transduktion mit dem HIV-2-Vektor differenzierten. Die mit den SIV_{smm}PBJ- und HIV-1-Vektoren transduzierten Stammzellen exprimierten bevorzugt das Transgen nach Differenzierung in die erythroiden Vorläuferzellen.

Insgesamt exprimierten die meisten Kolonien EGFP, die aus Zellen differenzierten, welche mit dem HIV-1-Vektor transduziert wurden. Hingegen exprimierte nur ein geringer Anteil der Gesamtkolonien das Transgen, die aus den mit HIV-2-Vektoren transduzierten Stammzellen differenzierten. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Transduktionseffizienzen, die die beiden Vektoren auf den Stammzellen vor Beginn der *in vitro*-Differenzierung erzielen konnten. Hier konnte der HIV-2-Vektor im Vergleich zum HIV-1-Vektor eine doppelt so hohe Effizienz erreichen. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede könnten die verschiedenen Promotoren sein. Im HIV-1-Vektor wird das *egfp*-Gen über den CMV-Promotor, im HIV-2-Vektor wird das Gen über die virale LTR angetrieben. Der CMV-Promotor könnte für eine Transgenexpression in den differenzierten Vorläuferzellen geeigneter sein als die virale LTR.

Gründe für die unterschiedliche Transgenexpression könnten Kolonietyp-spezifisch exprimierte Restriktionsfaktoren sein, die auf die verschiedenen lentiviralen Vektoren einen unterschiedlichen Einfluss haben. Diese Faktoren könnten z.B. die Transkription des *egfp*-Gens inhibieren. Eine andere Möglichkeit ist eine unterschiedliche Expression von zellulären Faktoren in den verschiedenen Kolonietypen, die für eine Transkription des Fremdgens benötigt werden könnten. Die Expression dieser Faktoren könnte während der

Differenzierung in die verschiedenen Kolonietypen herabreguliert werden. Werden keine ruhenden, sondern stimulierte Stammzellen nach Transduktion mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor in einem Progenitorassay eingesetzt, unterscheidet sich die Transgenexpression in den verschiedenen Kolonietypen kaum (Gao *et al.*, 2001). Durch die Stimulierung der Stammzellen mit Zytokinen könnten die Restriktionsfaktoren nicht mehr bzw. die für eine Expression des Transgens benötigten zellulären Faktoren exprimiert werden.

Grundsätzlich sind jedoch alle hier getesteten lentiviralen Vektoren für die Transduktion von humanen hämatopoetischen Stammzellen geeignet, wobei die Zellen nach Transduktion mit dem HIV-1-abgeleiteten Vektor jedoch ein geringeres *in vitro*-Differenzierungspotenzial besaßen.

4.1.3 Die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen mit lentiviralen Vektoren hat keinen Einfluss auf das *in vivo*-Differenzierungspotenzial

Um das *in vivo*-Differenzierungspotenzial der mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduzierten Stammzellen zu analysieren, wurde das Knochenmark von NOD/SCID-Mäusen mit den Zellen repopuliert. Diese Versuche wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Eckert vom Max-Delbrück-Zentrum in Berlin durchgeführt. Die Engraftmentrate wurde durch FACS-Analysen des humanen Markers CD45 auf Zellen im Knochenmark der Mäuse bestimmt. Die CD45-Expression der untransduzierten und der mit den verschiedenen Vektoren transduzierten Stammzellen unterschieden sich kaum. Die erhaltenen Daten stimmen mit publizierten Daten überein, in welchen die Engraftmentrate von Stammzellen nach Transduktion mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor untersucht wurde (Gao *et al.*, 2001; Miyoshi *et al.*, 1999). Ein Einfluss durch die Transduktion mit den verwendeten lentiviralen Vektoren auf das Engraftment konnte somit nicht festgestellt werden.

Eine EGFP-Expression der transplantierten Zellen im Knochenmark konnte hingegen nur in sehr wenigen Zellen detektiert werden (< 0,21%). Diese geringe EGFP-Expression ist nicht erwartet worden, da vor der Transplantation 18% der mit dem HIV-2-Vektor transduzierten Stammzellen das *egfp*-Gen exprimierten. In Publikationen konnten mit einer ähnlichen Transduktionseffizienz vor Transplantationsbeginn 6-7 Wochen nach der Repopulierung noch 9% EGFP⁺-Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden (Scherr *et al.*, 2002). Ein Expressionsverlust durch Silencing des CMV-Promotors in der vorliegenden Arbeit ist nicht zu erwarten, da in mehreren Studien gezeigt wurde, dass das *egfp*-Gen durch diesen Promotor auch mehrere Wochen nach Transplantation der transduzierten Stammzellen in NOD/SCID-Mäuse noch exprimiert wurde (Miyoshi *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2001; Kikuchi *et*

al., 2004; Zielske *et al.*, 2003). Einen Einfluss auf die EGFP-Expression durch das erneute Einfrieren der Zellen nach der Transduktion kann ebenso ausgeschlossen werden. Es wurde gezeigt, dass kein Unterschied in der Anzahl der EGFP⁺-Zellen vor und nach Einfrieren der transduzierten Zellen besteht. Ein Grund für die sehr geringe Transgenexpression der transplantierten Zellen könnte sein, dass die transduzierten Stammzellen nicht mehr die Fähigkeit zur Repopulierung besaßen. Der Verlust der Repopulierungskapazität von Stammzellen wird mit dem Verlust des Stammzellmarkers CD34 in Verbindung gebracht. Diese Möglichkeit kann hier jedoch ausgeschlossen werden, da die CD34-Expression nach Transduktion der Stammzellen noch mindestens 96% betrug. Auch wurde durch das erneute Einfrieren und Auftauen der Zellen keine Veränderung der CD34-Expression der transduzierten Stammzellen detektiert. Eine CD34-Expressionsanalyse wurde auch auf den transplantierten Zellen durchgeführt. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen untransduzierten und transduzierten Zellen festgestellt. Des Weiteren stimmen diese Werte mit publizierten Daten zur CD34-Expression auf transduzierten und transplantierten Stammzellen überein (Scherr *et al.*, 2002; Kikuchi *et al.*, 2004).

Vergleichbare Beobachtungen zum Verlust der Transgenexpression nach Transplantation konnten in Publikationen nicht gefunden werden. Ein Unterschied zu den veröffentlichten Daten ist jedoch, dass 3-Plasmidsysteme für die Generierung der lentiviralen Vektoren eingesetzt wurden (Gao *et al.*, 2001; Scherr *et al.*, 2002; Dupuy *et al.*, 2005; Salmon *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003), während in der vorliegenden Arbeit mit 2-Plasmidsystemen gearbeitet wurde. Zu Beginn der Arbeit standen jedoch noch nicht alle 3-Plasmidsysteme der verwendeten Vektoren zur Verfügung. In den hier verwendeten 2-Plasmidsystemen ist nur das *env*-Gen deletiert, alle anderen viralen Gene werden in die Zielzelle übertragen und dort auch exprimiert. Für das Nef Protein von SIVmac251 konnte bereits ein störender Einfluss auf die Hämatopoese in Affen gezeigt werden (Prost *et al.*, 2008). Dieses oder weitere virale Proteine könnten in der vorliegenden Arbeit die Repopulierungskapazität der transduzierten Stammzellen beeinflusst haben.

Des Weiteren wurde auch die Differenzierung der Stammzellen anhand der Marker für T-Zellen, Monozyten und Leukozyten untersucht. Hier wurde kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt.

Abschließend kann gesagt werden, dass kein signifikanter Unterschied im *in vivo*-Differenzierungspotenzial der mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduzierten Stammzellen beobachtet wurde. Sie sind jedoch alle für die Repopulierung von NOD/SCID-Mäusen geeignet. Durch den Verlust der Transgenexpression der transplantierten Zellen

kann eine präferenzielle Eignung des SIV_{smm}PBj-Vektors oder eines der anderen Vektoren bezüglich des Engraftments und der Zelldifferenzierung jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

4.2 SIV_{smm}PBj-abgeleitete Vektoren besitzen keinen Transduktionsvorteil für humane B-Lymphozyten

In bisherigen Studien konnten mit VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren auf unstimulierten B-Lymphozyten nur eine geringe Transduktionseffizienz erzielt werden (Serafini *et al.*, 2004; Bovia *et al.*, 2003; Chinnasamy *et al.*, 2000). Trotz geringerer MOI konnte im Rahmen dieser Arbeit auf diesen Zellen sowohl mit dem SIV_{smm}PBj- als auch mit einem HIV-1-Vektor eine unerwartet hohe Transduktionseffizienz erzielt werden. Die Unterschiede in der Transgenexpression können nicht durch die verschiedenen Promotoren verursacht worden sein, da sowohl der von Serafina *et al.* eingesetzte PGK-Promotor sowie der in der vorliegenden Arbeit verwendete CMV-Promotor für eine Transgenexpression in humanen B-Zellen geeignet ist (Bovia *et al.*, 2003). Ebenso kann die erhöhte Transduktionseffizienz nicht auf eine Aktivierung der B-Zellen zurückgeführt werden, da durch die Expressionsanalyse des Aktivierungsmarkers CD69 gezeigt wurde, dass sich die B-Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion in einem unstimulierten Zustand befanden. Ein Grund für die Unterschiede könnte sein, dass Serafina *et al.* die B-Zellen aus Tonsillen isolierten, während die Zellen in der vorliegenden Arbeit aus Blut gewonnen wurden. Beide Zellpopulationen könnten unterschiedlich suzeptibel für eine Transduktion mit lentiviralen Vektoren sein.

Unerwarteterweise konnte die Transduktionseffizienz durch Stimulierung der B-Zellen kaum gesteigert werden, obwohl der Hauptanteil der Zellen den Aktivierungsmarker exprimierten. Durch die Stimulierung wäre eine höhere Transduktionseffizienz erwartet worden, wie dies für T-Zellen gezeigt werden konnte (Costello *et al.*, 2000; Serafina *et al.*, 2004). Bei B-Zellen scheint dies abhängig von der Art der Stimulierung zu sein. Werden die B-Zellen mit den gleichen Zytokinen wie in dieser Arbeit stimuliert, kann nur eine geringe Steigerung der Transduktionseffizienz erzielt werden (Bovia *et al.*, 2003). Werden die Zellen durch eine Infektion mit EBV oder durch Ko-Kultur mit einer murinen Feeder-Zelllinie stimuliert, kann die Effizienz deutlich gesteigert werden (Bovia *et al.*, 2003).

Insgesamt zeigten die Transduktionsversuche, dass der SIV_{smm}PBj-Vektor humane B-Lymphozyten mit vergleichbarer Effizienz wie der HIV-1-Vektor transduzieren kann. Der

SIV_{smm}PBj-Vektor besitzt auf unstimulierten humanen B-Lymphozyten somit keinen Vorteil wie auf humanen Monozyten.

4.3 Effiziente Transduktion von humanen Makrophagen und dendritischen Zellen

Der SIV_{smm}PBj-Vektor kann sowohl Monozyten als auch Makrophagen effizient transduzieren, wohingegen der HIV-1-Vektor auf beiden Zelltypen nur eine geringe Transduktionseffizienz erzielen kann. Dabei konnte weder der SIV_{smm}PBj-Vektor noch der HIV-1-Vektor auf Makrophagen eine höhere Effizienz erzielen als auf Monozyten, obwohl Makrophagen als susceptibler für eine Transduktion mit HIV-1-Vektoren gelten (Mühlebach *et al.*, 2005; Arfi *et al.*, 2008; Kedzierska *et al.*, 2002; Neil *et al.*, 2001; Goujon *et al.*, 2008). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die Stimulierung der transduzierten Monozyten mit Zytokinen, die in der vorliegenden Arbeit für die Differenzierung in Makrophagen eingesetzt wurden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass für eine effiziente Transgenexpression in Makrophagen die Zellen bereits als Monozyten mit dem SIV_{smm}PBj-Vektor transduziert werden sollten.

Des Weiteren wurde der Einfluss des akzessorischen Proteins Vpx auf die Transduktionseffizienz von Makrophagen untersucht. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass Vpx für eine Transduktion von Monozyten mit dem SIV_{smm}PBj-Vektor essentiell ist (Wolfrum *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Beobachtung auch für eine effiziente Transduktion von Makrophagen bestätigt. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Daten überein: Goujon *et al.* (2008) konnten ebenfalls durch die Anwesenheit des Vpx Proteins in SIV_{mac}-abgeleiteten Vektoren die Transduktionseffizienz auf Makrophagen steigern.

Ähnliche Transduktionsergebnisse wurden auch auf humanen dendritischen Zellen erzielt. Der HIV-1-Vektor konnte weder Monozyten noch unreife dendritische Zellen transduzieren. Schroers *et al.* (2000) konnten mit HIV-1-Vektoren ebenfalls unreife dendritische Zellen nicht transduzieren. Der SIV_{smm}PBj-Vektor konnte hingegen beide Zelltypen sehr effizient transduzieren. Auch für die Transduktion von dendritischen Zellen ist das virale Protein Vpx essentiell. Wird das Protein nicht mit in die Partikel verpackt, besitzt der SIV_{smm}PBj-Vektor die gleichen Transduktionseigenschaften wie der HIV-1-Vektor. Auch Goujon *et al.* (2006) zeigten für dendritische Zellen, dass das Protein Vpx für die Transduktion mit SIV_{mac}-abgeleiteten Vektoren notwendig ist.

Der SIV_{smm}PBJ-Vektor kann also Makrophagen, dendritische Zellen und Monozyten im Gegensatz zu HIV-1-abgeleiteten Vektoren effizient transduzieren. Auch wurde gezeigt, dass nach Transduktion der Monozyten diese Zellen noch in Makrophagen und dendritische Zellen differenziert werden können. Für eine effiziente Transduktion all dieser Zelltypen ist das virale Protein Vpx essentiell.

Der Block für HIV-1-abgeleitete Vektoren in myeloiden Zellen liegt zwischen Zelleintritt und reverser Transkription (Arfi *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2008; Sonza *et al.*, 1996). Das Vpx Protein scheint diesen Block ausschalten oder umgehen zu können. Es gibt verschiedene Ansätze um die Wirkungsweise von Vpx zu erklären. Eine Möglichkeit ist die Wechselwirkung von Vpx mit Apobec-Proteinen (Peng *et al.*, 2007; Pion *et al.*, 2006). Andere Arbeitsgruppen konnten Interaktionen in Makrophagen und dendritischen Zellen von Vpx mit dem Ubiquitin-Proteasomsystem nachweisen (Srivastava *et al.*, 2008; Goujon *et al.*, 2007). Eine weitere Möglichkeit der Wirkungsweise von Vpx könnte die Wechselwirkung mit einem Trim5- α -ähnlichen Protein sein.

4.4 Eignung von SIV_{smm}PBJ-Vektoren zum Priming von CD8⁺-T-Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass durch Transduktion von unreifen dendritischen Zellen mit HIV-1-abgeleiteten Vektoren und anschließender Maturierung der Zellen Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) generiert werden können (Breckpot *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2006; Dyllal *et al.*, 2001; Gruber *et al.*, 2000). Der Zeitpunkt der Transduktion könnte einen Einfluss auf die Antigenpräsentation reifer dendritischer Zellen haben, was zu einer unterschiedlichen Effizienz zur Generierung von zytotoxischen T-Zellen führen könnte. Daher wurde untersucht, ob auch durch Transduktion von Monozyten und anschließender Maturierung zu dendritischen Zellen zytotoxische T-Zellen generiert werden können. Als Kontrolle wurden reife dendritische Zellen eingesetzt, die als unreife dendritische Zellen transduziert wurden. Als Antigen wurde das Mart-1 Protein ausgewählt, welches von den meisten Melanomzellen exprimiert wird.

4.4.1 Einfluss der Transduktion auf Phänotyp und Zytokinsekretion von dendritischen Zellen

Die Expression von co-stimulatorischen Rezeptoren, wie CD80 und CD86, auf reifen dendritischen Zellen ist essentiell für eine effiziente Stimulierung von CD8⁺-T-Zellen (Gabrilovich, 2004). Aufgrund dessen ist es wichtig, den Einfluss der Transduktion auf diese

Rezeptoren zu untersuchen. Dazu wurden Monozyten oder unreife dendritische Zellen mit einer niedrigen MOI mit einem EGFP-übertragendem SIV_{smm}PBj-Vektor transduziert und maturiert. Für beide Zelltypen wurde eine leichte Hochregulierung der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie der MHC Klasse I und Klasse II Moleküle beobachtet. Es ist jedoch nicht zu erwarten, dass diese leichte Erhöhung einen negativen Effekt auf die Eignung des SIV_{smm}PBj-Vektors hat.

Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten zur Transduktionen mit HIV-1-abgeleiteten Vektoren bei Verwendung niedriger MOIs überein (Gruber *et al.*, 2000; Breckpot *et al.*, 2003). Bei einer Verwendung höherer MOIs wird die Funktion der transduzierten dendritischen Zellen negativ beeinflusst, so dass eine Stimulierung von T-Zellen nicht mehr möglich ist (Chen *et al.*, 2004). Dies kann auf die Herabregulierung der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie auf eine veränderte Zytokinproduktion der dendritischen Zellen zurückgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Veränderung in der Zytokinproduktion durch die Transduktion der dendritischen Zellen mit SIV_{smm}PBj-Vektoren detektiert werden.

Dies bedeutet, dass der SIV_{smm}PBj-Vektor bei Verwendung von niedrigen MOIs grundsätzlich geeignet ist, um transduzierte dendritische Zellen für immuntherapeutische Anwendungen einzusetzen.

4.4.2 Effiziente Transduktion von Monozyten mit *mart*-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektoren

Um einen *mart*-übertragenden Vektor zur Verfügung zu haben, wurde zunächst das Tumorantigen in den Transfektor des SIV_{smm}PBj-abgeleiteten 3-Plasmidsystems kloniert. Die daraus generierten Vektoren besaßen jedoch einen zu geringen Titer, um sie für die Transduktion von Monozyten einsetzen zu können (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde das *mart*-Gen in das 2-Plasmidsystem des 4xko-Vektors inseriert, in welchem alle akzessorischen Gene deletiert waren. Für die Generierung der Vektoren wurde zusätzlich ein Vpx-Expressionsplasmid eingesetzt, da die Transduktion mit den SIV_{smm}PBj-Vektoren abhängig von der Anwesenheit dieses Proteins in den viralen Partikeln ist. Nach Transduktion von Monozyten oder unreifen dendritischen Zellen wurden das neue Transgen auch nach Maturierung zu reifen dendritischen Zellen exprimiert. Es zeigten sich jedoch Unterschiede in der Transgenexpression zwischen dem *mart*- und *egfp*-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektor. Nach Transduktion von Monozyten oder unreifen dendritischen Zellen mit dem *egfp*-übertragenden Vektor wurde eine ähnliche Transgenexpression nach Maturierung der Zellen detektiert. Mit dem *mart*-übertragenden Vektor zeigten sich jedoch teilweise

deutliche Unterschiede in der Transgenexpression der reifen dendritischen Zellen, unabhängig davon ob Monozyten oder unreife dendritische Zellen transduziert wurden. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte in der Nachweismethode des Transgens liegen. Für die Bestimmung der Transduktionseffizienz musste eine intrazelluläre Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern durchgeführt werden, während das EGFP Protein selbst ein fluoreszierendes Protein ist. Dadurch könnte sich eine ungenauere Titerbestimmung der Mart-Vektoren ergeben haben. Im Folgenden wurde daher immer der gleiche Vektorstock eingesetzt. Trotzdem zeigte sich, dass die Transduktionseffizienzen variierten. Da die reifen dendritischen Zellen, die als Monozyten oder unreife dendritische Zellen transduziert wurden, jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden sollten, sind identische Transduktionseffizienzen keine Voraussetzung. Die CD8⁺-T-Zellen wurden mit den transduzierten reifen dendritischen Zellen insgesamt dreimal stimuliert, um anschließend ihre Mart-Spezifität und Funktionalität zu analysieren.

4.4.3 Antigenpezifität und Funktionalität der generierten zytotoxischen T-Zellen

Die Antigenpezifität der generierten T-Zellen wurde durch eine Dextramer-Färbung nachgewiesen. Ein Dextramer besteht aus Fluoreszenz-markierten MHC-Molekülen, welche an den Mart-spezifischen T-Zellrezeptor binden. Es wurden die T-Zellen eines Spenders analysiert, welche mit reifen dendritischen Zellen stimuliert wurden, die bereits als Monozyten transduziert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Frequenz von Mart-spezifischen zytotoxischen T-Zellen dieses Spenders von 0% auf ca. 6% erhöht werden konnte. Lopes *et al.* (2006) konnten die Anzahl von Mart-spezifischen T-Zellen nach Stimulierung mit dendritischen Zellen, die mit einem *mart*-übertragenen HIV-1-Vektor transduziert wurden, auf 0,6% - 1,4% erhöhen. Der Grund für die Diskrepanz beider Daten könnte in den unterschiedlichen Zeitpunkten der Analyse liegen. Lopes *et al.* analysierten die T-Zellspezifität nach einmaliger Stimulierung, während in der vorliegenden Arbeit die Analyse der Mart-Spezifität nach dreimaliger Stimulierung erfolgte.

Um die Funktionalität der generierten zytotoxischen T-Zellen zu testen, wurde deren Zytokinproduktion und die zytotoxische Kapazität untersucht. Erkennen zytotoxische T-Zellen ihr Antigen auf Zielzellen sezernieren sie Zytokine, die *in vivo* weitere Immunzellen anlocken und aktivieren können. Wurden die zytotoxischen T-Zellen aus beiden Ansätzen in dieser Arbeit mit Mart⁺-Melanomzelllinien co-kultiviert, sezernierten sie die Zytokine IFN- γ , TNF- α und GM-CSF. Auf Mart⁻Melanomzellen konnten keine oder nur eine geringe Zytokinkonzentration detektiert werden. Dies bedeutet, dass die T-Zellen spezifisch das Mart-Antigen erkannt haben. Die IFN- γ -Konzentration der T-Zellen nach co-Kultivierung mit

Mart⁺-Melanomzelllinien war jedoch sehr gering. Gründe hierfür könnten in der geringen Zellzahl der zytotoxischen T-Zellen liegen, die für die Produktion der Überstände eingesetzt wurden. Die generierten Zellen sind jedoch prinzipiell in der Lage nach Erkennung ihres Antigen IFN- γ zu sezernieren.

Die quantitative Analyse der zytotoxischen Kapazität der T-Zellen aus beiden Ansätzen konnte mit einem Donor erfolgreich durchgeführt werden. Es wurde jeweils die maximale Anzahl der zur Verfügung stehenden T-Zellen eingesetzt, so dass sich unterschiedliche Verhältnisse zwischen den T-Zellen aus beiden Ansätzen zu den Zielzellen ergaben.

Die T-Zellen, welche mit als Monozyten transduzierten reifen dendritischen Zellen stimuliert wurden, erkannten nur die Mart⁺-Melanomzelllinie und lysierten einen Teil der Zellen. Die T-Zellen, welche mit als unreifen Zellen transduzierten reifen dendritischen Zellen stimuliert wurden, lysierten zusätzlich einen geringen Anteil der Mart⁻-Melanomzelllinie.

In nachfolgenden Assays wurden die Zellen weiterer Spender eingesetzt, es konnte jedoch keine Zelllyse mehr beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte in einer zu geringen Anzahl von T-Zellen im Verhältnis zu den Zielzellen liegen. Das Verhältnis von Effektorzelle zu Zielzelle ist Donor-spezifisch. Es könnte sein, dass dieses Verhältnis für die getesteten Spender zu niedrig war, so dass keine Zelllyse detektiert werden konnte. Aufgrund zu geringer Zellzahlen konnten jedoch für diese Spender nicht mehr T-Zellen im Zytotoxizitätsassay eingesetzt werden.

Aufgrund dieser Einschränkung konnte nur prinzipiell gezeigt werden, dass der SIV_{smm}PBj-Vektor geeignet ist, Mart-spezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren. Diese zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage Zytokine zu produzieren, welche für eine Immunantwort wichtig sind. Auch besitzen diese Zellen noch die Funktion die erkannten Melanomzellen zu lysieren.

4.4.4 Mit SIV_{smm}PBj-Vektoren transduzierte Monozyten können nach Differenzierung zu Makrophagen zytotoxische T-Zellen generieren

Monozyten sind nicht nur die Vorläuferzellen von dendritischen Zellen, sondern auch von Makrophagen. Beide Zellen besitzen wichtige Funktionen im Immunsystem und können mit unterschiedlichen Immunzellen interagieren. Deshalb wäre es interessant, durch die Transduktion von Monozyten, sowohl dendritische Zellen als auch Makrophagen für eine Immuntherapie einzusetzen. Es wurde bereits gezeigt, dass mit Mart-Peptiden beladene

Makrophagen Mart-spezifische zytotoxische T-Zellen generieren können (Mehrotra *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob auch nach Transduktion von Monozyten und anschließender Differenzierung zu Makrophagen, diese Zellen eine T-Zell-stimulatorische Kapazität besitzen. Dazu wurden CD8⁺-T-Zellen mit transduzierten Makrophagen zweimal stimuliert und anschließend in einem Zytotoxizitätsassay eingesetzt. Mit einem von vier Donoren wurde die lytische Kapazität der generierten zytotoxischen T-Zellen dem Zytotoxizitätsassay nachgewiesen. Die zytotoxischen T-Zellen erkannten die Mart⁺-Melanomzelllinie und lysierten ca. 12 % der Zellen. Die Mart⁻-Zelllinie wurde nicht erkannt. Mehrotra *et al.* (2006) detektierten nach Stimulierung von CD8⁺-T-Zellen mit Mart-Peptiden beladenen Makrophagen eine Zelllyse der Zelllinie von ca. 30%. Sie verwendeten allerdings eine mit Mart-Peptiden beladene Zelllinie und keine Melanomzelllinie, dadurch könnten die Zellen mit unterschiedlicher Effizienz erkannt und lysiert worden sein. Des Weiteren könnten auch Donor-spezifische Eigenschaften zu den unterschiedlichen Werten beigetragen haben.

Um auszuschließen, dass das T-Zellpriming durch dendritische Zellen durchgeführt wurde, welche sich in der Makrophagenpopulation befinden haben könnten, wurde die Expression des Oberflächenmarkers CD14 analysiert. Über 95% der zum Priming eingesetzten Zellen besaßen diesen Marker, welcher von Makrophagen, nicht jedoch von dendritischen Zellen exprimiert wird.

Obwohl die lytische Kapazität der zytotoxischen T-Zellen nur mit einem Spender durchgeführt werden konnte, ist prinzipiell gezeigt, dass durch Transduktion von Monozyten mit *mart*-übertragenden SIV_{smm}PBj-Vektoren und anschließender Differenzierung zu Makrophagen, diese Zellen noch die Fähigkeit besitzen, Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren. Somit stehen, durch die Transduktion von Monozyten, sowohl dendritische Zellen, als auch Makrophagen für immuntherapeutische Anwendungen zur Verfügung.

4.5 Das Mausmodell ist für die Anwendung von SIV_{smm}PBj-Vektoren nicht geeignet

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass humane Monozyten sehr effizient mit einem SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektor transduziert werden können (Mühlebach *et al.*, 2005). Die Voraussetzung für eine mögliche Anwendung von transduzierten Monozyten

in einem Tiermodell ist, dass sich die entsprechenden Monozyten vergleichbar gut transduzieren lassen. Deshalb wurde zunächst die Transduktionseigenschaften des SIV_{smm}PBJ-Vektors im Vergleich zu einem HIV-1-abgeleiteten Vektor auf unstimulierten, murinen Monozyten analysiert.

Die aus dem Knochenmark isolierten murinen Monozyten wurden an Tag 1 nach Isolierung mit einer MOI von 10 mit den lentiviralen Vektoren [HIV-1_{EGFP}(VSV)] und [SIV_{PBJ}-EGFP(VSV)] transduziert, wobei keine effiziente Transduktion der Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese konnte auch durch eine Erhöhung der MOI bis auf 200 nicht signifikant gesteigert werden. Bei der höheren MOI konnten zwar grün-fluoreszierende Zellen detektiert werden, die Viabilität der Zellen war durch die Inkubation mit den viralen Vektoren stark erniedrigt, so dass eine aussagekräftige Analyse der Transduktionseffizienz nicht möglich war. He *et al.* (2005) beschreiben, dass sie Monozyten direkt nach der Isolierung aus Knochenmark mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor erfolgreich transduzieren können. Die Daten sind allerdings schwer mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen vergleichbar, da unterschiedliche Isolierungs- und Kultivierungsmethoden verwendet wurden. He *et al.* isolierten zwar ebenfalls Knochenmark aus Mäusen, führten jedoch nur eine Depletion von T-, B-Lymphozyten und NK-Zellen durch und kultivierten die restlichen Zellen mit Zytokinen für die Differenzierung zu unreifen dendritischen Zellen. Die transduzierte Zellpopulation könnte neben den Monozyten also noch weitere Zellen enthalten, welche suszeptibler für lentivirale Vektoren sind. Beispielsweise könnten dies hämatopoetische Stammzellen sein, die mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor transduziert werden können (Kurre *et al.*, 2006; Kurre *et al.*, 2004; Mostoslavsky *et al.*, 2005). Somit ist letztlich nicht eindeutig gezeigt worden, dass es sich bei den transduzierten Zellen um Monozyten handelt. Darüber hinaus ist es möglich, dass durch die nach He *et al.* transduzierten murinen Monozyten nach Inkubation mit Zytokinen ihren Aktivierungsstatus veränderten, wodurch sie suszeptibler für die Transduktion mit lentiviralen Vektoren wurden. Ähnliches wurde bereits für humane Monozyten gezeigt, die nach Transduktion mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor das Transgen selbst nicht exprimierten, sondern erst nach der Differenzierung zu dendritischen Zellen (Neil *et al.*, 2001). Ein weiterer Grund für die geringe Transduktionseffizienz könnte die Verwendung des Glykoproteins des vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) sein. Publierte Daten zeigen jedoch, dass mit diesem Hüllprotein pseudotypisierte lentivirale Vektoren murine Zellen transduzieren können (Ricks *et al.*, 2008; Barrette *et al.*, 2000; He *et al.*, 2005.).

Neben dem Differenzierungsgrad der Monozyten könnten auch Spezies-spezifische Blocks der Grund für eine Inhibition von lentiviralen Vektoren sein. In murinen T-Zellen und T-

Zelllinien konnte zwar gezeigt werden, dass die reverse Transkription und der Kernimport des Präintegrationskomplexes (PIC) von HIV-1 mit vergleichbarer Effizienz wie in humanen Zellen abläuft, die chromosomale Integration jedoch im Vergleich um das 18 bis >305-fache reduziert ist (Tervo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Eine andere Arbeitsgruppe konnte eine Restriktion während bzw. unmittelbar nach der reversen Transkription feststellen (Baumann *et al.*, 2004). Die Inhibition könnte durch die Aktivität von Restriktionsfaktoren wie APOBEC3G verursacht werden. Auch murine Zellen exprimieren dieses antivirale Protein, welches eine HIV-1-Infektion verhindern kann (Mariani *et al.*, 2003, Cell). Dieses oder ähnliche antivirale Proteine könnten auch in murinen Monozyten exprimiert werden und dadurch eine effiziente Transduktion mit viralen Vektoren inhibieren.

Da der SIV_{smm}PBj-Vektor keinen Transduktionsvorteil gegenüber dem HIV-1-Vektor auf murinen Monozyten besitzt und beide lentiviralen Vektoren eine sehr geringe Transduktionseffizienz aufweisen, kommen Mäuse nicht als Tiermodell für Anwendungen des SIV_{smm}PBj-Vektors in Frage, bei denen Fremdgene in Monozyten exprimiert werden sollen.

4.6 Affen sind als Tiermodell für die Anwendung des SIV_{smm}PBj-Vektors geeignet

Im Gegensatz zu murinen Monozyten konnten simiane Monozyten mit dem SIV_{smm}PBj-Vektor effizient transduziert werden. Allerdings mussten die simianen Zellen mit Zytokinen kultiviert werden, um die Zellviabilität zu erhöhen. Durch die Zytokine könnten die Monozyten aktiviert und die Suszeptibilität dieser Zellen für die Transduktion mit den viralen Vektoren erhöht worden sein. Der HIV-1-abgeleitete Vektor konnte die Monozyten von Schweins- und Rhesusaffen jedoch nur mit geringer Effizienz transduzieren. Der SIV_{smm}PBj-Vektor hingegen erzielte mit einer MOI von 5 auf Monozyten von Schweinsaffen eine Transduktionseffizienz von ca. 70% und auf Monozyten von Rhesusaffen von ca. 45%. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bisherigen Publikationen zu replikationsfähigen Lentiviren: Das Parentalvirus SIV_{smm}PBj14 kann im Gegensatz zu HIV-1 effizient auf unstimulierten Schweinsaffen-PBMCs replizieren und sowohl Schweinsaffen als auch Rhesusaffen infizieren (Fultz *et al.*, 1989). Die Pathogenität des SIV_{smm}PBj-Virus in den beiden Affenspezies scheint sich in der Transduktionseffizienz des abgeleiteten Vektors auf den Monozyten widerzuspiegeln. Ca. 80-90% aller Schweinsaffen sterben nach Infektion mit dem Virus (Hirsch *et al.*, 2000; Dewhurst *et al.*, 1990), während die Sterblichkeitsrate von infizierten Rhesusaffen bei ca. 30-50% liegt (Lewis *et al.*, 1992).

Im Gegensatz zu HIV-1-Vektoren scheinen SIV_{smm}PBj-Vektoren die Fähigkeit besitzen, dem Block auf simianen Monozyten entgegenzuwirken bzw. umgehen zu können. Der Block von HIV-1 in simianen Zellen wurde beim Schritt der reversen Transkription nachgewiesen (Münk *et al.*, 2002). Mögliche Restriktionsfaktoren könnten das antivirale Protein Trim5 α oder Proteine der APOBEC-Familie sein, für die gezeigt wurden, dass sie eine HIV-Infektion auf simianen Zellen effizient inhibieren können (Sakuma *et al.*, 2007; Stremlau *et al.*, 2004).

Insgesamt ist zu sagen, dass sowohl Rhesus- als auch Schweinsaffen geeignet sind, um Anwendungen des SIV_{smm}PBj-Vektors zu testen. Da die Zellen zur Erhöhung der Viabilität mit Zytokinen zur Differenzierung zu dendritischen Zellen kultiviert wurden, könnte hier eine mögliche Anwendung von SIV_{smm}PBj-transduzierten Monozyten bzw. daraus differenzierten dendritischen Zellen für die Immuntherapie, z.B. für therapeutische Vakzinierungen, getestet werden. Lu *et al.* (2002) haben mit Peptiden beladene dendritische Zellen zur Vakzinierung gegen eine SIVmac Infektion von Rhesusaffen eingesetzt. Für humane Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass mit Adenovektoren transduzierte dendritische Zellen effizienter T-Zellen stimulieren können als mit Peptiden beladene (Nakamura *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2006). Mit Hilfe des SIV_{smm}PBj-Vektors könnte eine ähnliche Strategie in einem simianen Tiermodell getestet werden.

5. Zusammenfassung

In jüngster Zeit werden vom humanen Immundefizienzvirus-1-abgeleitete lentivirale Vektoren auch in der Gentherapie eingesetzt. Obwohl diese Vektoren nicht-mitotische Zellen transduzieren können, sind sie für einen Gentransfer in primäre ruhende Zellen oft nicht geeignet. In der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ des Paul-Ehrlich-Instituts wurde ein vom simianen Immundefizienzvirus SIV_{simm}PBj-abgeleiteter lentiviraler Vektor entwickelt, welcher im Gegensatz zu HIV-1-abgeleiteten Vektoren effizient in der G₀-Phase des Zellzyklus arretierte humane Fibroblasten und humane primäre Monozyten transduzieren kann (Mühlebach *et al.*, 2005).

Im dieser Arbeit wurde das Potenzial dieses neuen Vektors für mögliche Anwendungen in der Gentherapie untersucht, indem seine Transduktionsfähigkeit für weitere primäre Zellen bestimmt wurde. Dabei waren humane hämatopoetische Stammzellen von besonderem Interesse, da sie die Vorläuferzellen aller Zellen des Blutes sind und die Eigenschaft zur Selbsterneuerung besitzen. Die Effizienz des Gentransfers in unstimulierten Stammzellen mit dem SIV_{simm}PBj-Vektor war jedoch nicht höher als mit anderen lentiviralen Vektoren. Interessanterweise konnte aber ein Einfluss der lentiviralen Vektoren auf das *in vitro*-Differenzierungspotenzial der transduzierten Stammzellen in die verschiedenen Vorläuferzellen beobachtet werden: Nach Transduktion mit dem SIV_{simm}PBj- und einem HIV-2-abgeleiteten Vektor differenzierten die Stammzellen bevorzugt in granulozytäre Vorläuferzellen, während die Transduktion mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor die Anzahl aller Vorläuferzellen deutlich reduzierte und insbesondere die Differenzierung in Makrophagenvorläuferzellen verminderte. Zur Untersuchung ihres Differenzierungspotenzials *in vivo* wurden transduzierte hämatopoetische Stammzellen zur Repopulierung des Knochenmarks von NOD/SCID-Mäusen eingesetzt. Hierbei wurde jedoch kein Einfluss der verschiedenen lentiviralen Vektoren auf die Differenzierung der Stammzellen beobachtet. Allerdings konnte nur in einem sehr geringen Anteil der transplantierten Zellen eine Expression des übertragenen Gens nachgewiesen werden, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die transduzierten Zellen die Fähigkeit zur Repopulierung verloren hatten. Insgesamt ist jedoch zu sagen, dass entgegen der Erwartungen der neue Vektor keinen Vorteil gegenüber HIV-1-Vektoren zur Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen aufweist.

Weiter wurde die Transduktionsfähigkeit des SIV_{simm}PBj-Vektors für humanen B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen untersucht. Auf ruhenden B-Lymphozyten besaß der SIV_{simm}PBj-Vektor keinen Transduktionsvorteil gegenüber einem

HIV-1-abgeleiteten Vektor, während Makrophagen und dendritische Zellen mit signifikant höherer Effizienz transduziert werden konnten.

Die hohe Transduktionseffizienz des SIV_{smm}PBj-Vektors für Monozyten und dendritische Zellen eröffnet die Möglichkeit einer Anwendung in der Immuntherapie, da dendritische Zellen die professionellsten und effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen sind. Daher wurde die generelle Eignung des SIV_{smm}PBj-Vektors für immuntherapeutische Anwendungen untersucht. Ein Tumor-assoziiertes Antigen (Mart-1) wurde in Monozyten übertragen und die transduzierten Zellen zu reifen dendritischen Zellen maturiert. Diese Zellen besaßen die Fähigkeit, Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren, deren Funktion durch Sekretion von Zytokinen, in Einzelfällen auch durch spezifische Lyse von Mart-exprimierenden Tumorzellen nachgewiesen wurde. Weiterhin wurde gezeigt, dass nach Transduktion von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen auch diese prinzipiell in der Lage sind, Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren. Obwohl hier keine vergleichenden Untersuchungen zur Effizienz des T-Zell-Primings durchgeführt werden konnten, ist die prinzipielle Eignung des SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektors für eine Immuntherapie damit nachgewiesen.

Schließlich wurde untersucht, ob die Maus oder nicht-menschliche Primaten als Tiermodelle für eine mögliche Weiterentwicklung des Vektors in Frage kommen. Murine Monozyten konnten jedoch nicht effizient transduziert werden. Hingegen erwies sich der SIV_{smm}PBj-Vektor als gut geeignet zur Transduktion von simianen Monozyten, so dass ein Affenmodell für Anwendungen des SIV_{smm}PBj-Vektors, wie beispielsweise zur Tumor-Immuntherapie oder für Vakzinierungsstudien, in Frage kommt.

6. Literaturverzeichnis

A

Adema G J et al. (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387, 713-717

Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K (2007). CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol.*; 37: 686-95

Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, and Trono D (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76, 853-864

Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol.*; 70: 2581-5

Albert ML, Pearce SFA, Francisco LM, et al. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*; 188: 1359-1368

Andersen JL, DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Kim B, Jacquot G, Benichou S, and Planelles V (2006) HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax not ANT. *PLoS Pathog.* 2, e127

Arfi V, Rivière L, Jarrosson-Wuillème L, Goujon C, Rigal D, Darlix JL, Cimarelli A (2008). Characterization of the early steps of infection of primary blood monocytes by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*; 82: 6557-65

Atkins KM, Thoomas L, Youker RT, Harriff MJ, Pissani F, You H, and Thomas G (2008). HIV-1 Nef binds PACS-2 to assemble a multi-kinase cascade that triggers MHC-I downregulation: Analysis using siRNA and knockout mice. *J. Biol. Chem.* 283, 11, 772-11, 784

B

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

Banchereau J, Palucka AK (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.*; 5: 296-306

Barrette S, Douglas JL, Seidel NE, Bodine DM (2000). Lentivirus-based vectors transduce mouse hematopoietic stem cells with similar efficiency to moloney murine leukemia virus-based vectors. *Blood.*; 96: 3385-91

Baumann JG, Unutmaz D, Miller MD, Breun SK, Grill SM, Mirro J, Littman DR, Rein A,

KewalRamani VN (2004). Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection. *J Virol.*;78: 12537-47

Beer BE, Foley BT, Kuiken CL, Tooze Z, Goeken RM, Brown CR, Hu J, St Claire M, Korber BT, Hirsch VM (2001). Characterization of novel simian immunodeficiency viruses from red-capped mangabeys from Niagala (SIVrcmNG409 and SIVrcmNG411), *J. Virol.* 75 12014-12027

Belshan M, Ratner L (2003). Identification of the nuclear localization signal of human immunodeficiency virus type 2 Vpx. *Virology.*; 311: 7-15

Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH, Stewart CC, To LB (1991). Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood.*; 77: 2591-6

Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 94: 5320-5.

Bogerd, HP, and Cullen, BR (2008). Single-stranded RNA facilitates nucleocapsid:APOBEC3G complex formation. *RNA* 14, 1228-1236

Boom T, van der Bruggen P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*; 183: 725-729

Bovia F, Salmon P, Matthes T, Kvell K, Nguyen TH, Werner-Favre C, Barnet M, Nagy M, Leuba F, Arrighi JF, Piguat V, Trono D, Zubler RH (2003). Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood.*; 101: 1727-33

Breckpot K, Dullaers M, Bonehill A, van Meirvenne S, Heirman C, de Greef C, van der Bruggen P, Thielemans K (2003). Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy. *J Gene Med.*; 5: 654-67

Brenner M, Munch J, Schindler M, Wildum S, Stolte N, Stahl-Henning C, Fuchs D, Matz-Rensing K, Franz M, Heeney J, *et al.* (2006) Importance of the N-distal AP-2 binding element in Nef for simian immunodeficiency virus replication and pathogenicity in rhesus macaques. *J. Virol.* 80, 4469-4481

Brocker T (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on MHC class II expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 186, 1223-1232

Buchsacher GL Jr, Wong-Staal F (2000). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood.*; 95: 2499-504

Burns JC, Freidmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titre and efficient gene transfer into mammalian and non-mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 8033-8037

C

Case SS, Price MA, Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G, Haas DL, Xu D, Stripecke R, Naldini L, Kohn DB, Crooks GM (1999). Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 96: 2988-93

Castellino F, Haung AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites to CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*; 440: 890-895

Caux C. et al. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 180, 1841-1847

Chaudhuri R, Lindwasser OW, Smith WJ, Hurley JH, and Bonifacino JS (2007) Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the A2 clathrin adaptor. *J. Virol.* 81, 3877-3890

Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, and Martin M (1996). Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 coconstimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab. Invest.* 74, 975-983

Chen X, He J, Chang LJ (2004). Alteration of T cell immunity by lentiviral transduction of human monocyte-derived dendritic cells. *Retrovirology.*; 1: 37

Chinnasamy D, Chinnasamy N, Enriquez MJ, Otsu M, Morgan RA, Candotti F (2000). Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. *Blood.*; 96: 1309-16

Costello E, Munoz M, Buetti E, Meylan PR, Diggelmann H, Thali M (2000). Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther.*; 7: 596-604

Cournaud V, Lauré F, Fultz PN, Montagnier L, Bréchet C, Sonigo P (1992). Genetic differences accounting for evolution and pathogenicity of simian immunodeficiency virus from a sooty mangabey monkey after cross-species transmission to a pig-tailed macaque. *J Virol.*; 66: 414-9

D

Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, Kanki PJ, Essex M, Desrosiers RC (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science.*; 228: 1201-4

Dao MA, Arevalo J, Nolta JA (2003). Reversibility of CD34 expression on human

hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood.*; 101: 112-8

Dewhurst S, Embretson JE, Anderson DC, Mullins JI, Fultz PN (1990). Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIVSMM-PBj. *Nature.*; 345: 636-40

Dorival C, Brizzi F, Lelièvre JD, Sol-Foulon N, Six E, Henry A, André-Schmutz I, Cavazzana-Calvo M, Coulombel L, Estaquier J, Schwartz O, Lévy Y (2008). HIV-1 Nef protein expression in human CD34+ progenitors impairs the differentiation of an early T/NK cell precursor. *Virology.*; 377: 207-15

DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.*; 7: 379-87

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D et al. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*; 72: 8463-8471

Dullaers M, Van Meirvenne S, Heirman C, Straetman L, Bonehill A, Aerts JL, Thielemans K, Breckpot K (2006). Induction of effective therapeutic antitumor immunity by direct in vivo administration of lentiviral vectors. *Gene Ther.*; 13: 630-40

Dupuy FP, Mouly E, Mesel-Lemoine M, Morel C, Abriol J, Cherai M, Baillou C, Nègre D, Cosset FL, Klatzmann D, Lemoine FM (2005). Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters. *J Gene Med.*; 7: 1158-71

Dyall J, Latouche JB, Schnell S, Sadelain M (2001). Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood.*; 97: 114-21

F

Fletcher III TM, Brichacek B, Sharova N, Newman MA, Stivahtis G, Sharp PM, Emerman M, Hahn BH, Stevenson M (1996). Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIVsm, *EMBO J.* 15 6155-6165

Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet*; 25: 217-222

Frecha C, Costa C, Negre D, Gauthier E, Russell SJ, Cosset FL, Verhoeyen E (2008). Stable transduction of quiescent T-cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood.* Sep 23. [Epub ahead of print]

Freudenthal PS, Steinman RM (1990). The distinct surface of human blood dendritic cells,

as observed after an improved isolation method. Proc Natl Acad Sci U S A.; 87: 7698-702

Fukumori T, Akari H, Yoshida A, Fujita M, Koyama AH, Kagawa S, Adachi A (2000). Regulation of cell cycle and apoptosis by human immunodeficiency virus type 1 Vpr, *Microbes Infect.* 2 1001-1017

Fultz PN (1991). Replication of an acutely lethal simian immunodeficiency virus activates and induces proliferation of lymphocytes. *J Virol.*; 65: 4902-9

Fultz PN, McClure HM, Anderson DC, Switzer WM (1989). Identification and biologic characterization of an acutely lethal variant of simian immunodeficiency virus from sooty mangabeys (SIV/SMM). *AIDS Res Hum Retroviruses*; 5: 397-409

Fultz PN, Zack PM (1994). Unique lentivirus--host interactions: SIVsmmPBj14 infection of macaques *Virus Res.*; 32: 205-2

G

Gabrilovich D (2004). Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*; 4: 941-52

Gao Z, Golob J, Tanavde VM, Civin CI, Hawley RG, Cheng L (2001). High levels of transgene expression following transduction of long-term NOD/SCID-repopulating human cells with a modified lentiviral vector. *Stem Cells.*; 19: 247-59

Gibbs JS, Lackner AA, Lang SM, Simon MA, Sehgal PK, Daniel MD, and Desrosiers RC (1995). Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx. *J. Virol* 69, 2378-2383

Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, Hahn BH, and Emmerman M (1998). HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat. Med.* 4, 65-71

Goujon C, Arfi V, Pertel T, Luban J, Lienard J, Rigal D, Darlix JL, Cimorelli A (2008). Characterization of Simian Immunodeficiency Virus SIVSM/Human Immunodeficiency Virus Type 2 Vpx Function in Human Myeloid Cells. *J Virol.*; 82: 12335-45

Goujon C, Jarrosson-Wuillème L, Bernaud J, Rigal D, Darlix JL, Cimorelli A (2006). With a little help from a friend: increasing HIV transduction of monocyte-derived dendritic cells with virion-like particles of SIV(MAC). *Gene Ther.*; 13: 991-4

Goujon C., Riviere L., Jarrosson-Wuilleme L., Bernaud J., Rigal D., Darlix J.L, and Cimorelli A. (2007). SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. *Retrovirology* 4, 2

Gruber A, Kan-Mitchell J, Kuhen KL, Mukai T, Wong-Staal F (2000). Dendritic cells transduced by multiply deleted HIV-1 vectors exhibit normal phenotypes and functions and elicit an HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *Blood.*; 96: 1327-33

Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, Dorrell C, Pereira DS, Kelly M, Naldini L, Dick JE (2000).

Transduction of human CD34+ CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol Ther.*; 1: 566-73

H

Haas DL, Case SS, Crooks GM, Kohn DB (2000). Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther.*; 2: 71-80

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, Cavazzana-Calvo M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*;17: 415-9

Harris, R.S., and Liddament, M.T. (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 868-877

He Y, Zhang J, Mi Z, Robbins P, Falo Jr LD. (2005). Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J Immunol*; 174: 3808-3817

Henderson L.E., Sowder R.C., Copeland T.D., Benveniste R.E., and Oroszlan S. (1998). Isolation and characterization of a novel protein (X-ORF product) from SIV and HIV-2. *Science* 241, 199-201

Hirsch V.M., Sharkey M.E., Brown C.R., Brichacek B., Goldstein S., Wakefield J., Byrum R., Elkins W.R., Hahn B.H., Lifson J.D., Stevenson M. (1998). Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIVsmPBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification. *Nat. Med.* 4 (12), 1401-1408

Hirsch VM, Dapolito GA, Goldstein S, McClure H, Emau P, Fultz PN, Isahakia M, Lenroot R, Myers G, Johnson PR (1993). A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys. *J Virol.*; 67:1517-1528.

Hirsch VM, Lifson JD (2000). Simian immunodeficiency virus infection of monkeys as a model system for the study of AIDS pathogenesis, treatment, and prevention. *Adv Pharmacol.*; 49: 437-77

Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature.*; 339: 389-92

Hu J., W.M. Switzer, B.T. Foley, D.L. Robertson, R.M. Goeken, B.T. Korber, V.M. Hirsch, Beer B.E. (2003). Characterization and comparison of recombinant simian immunodeficiency virus from drill (*Mandrillus leucophaeus*) and mandrill (*Mandrillus sphinx*) isolates. *J. Virol.*;

Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*; 24: 356-359

I

Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinmann RM (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med*; 178: 479-488

Inaba K., Romani N., Steinman R. M. (1989). An antigen-independent contact mechanism as an early Stepp in T-cell proliferative responses to dendritic cell. *J. Exp. Med.* 165: 1403-17 ?

Iwasaki A, Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*; 5: 987-995

J

Janeway C *et al.* (2001). *Immunologie*. 5. Auflage; Spektrum Verlag

Johnson PR, Fomsgaard A, Allan J, Gravell M, London WT, Olmsted RA, Hirsch VM (1990). Simian immunodeficiency viruses from African green monkeys display unusual genetic diversity. *J Virol. Mar*; 64: 1086-1092

Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.*; 27: 3135-42

K

Kamata M., Nitahara-Kasahara Y., Miyamoto Y., Yoneda Y., Aida Y. (2005). Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 79 (6), 3557-3564

Kedzierska K, Crowe SM (2002). The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem.*; 9: 1893-903

Kestler H. D.J. Ringler K. Mori D.L. Panicali P.K. Sehgal M.D. Daniel, and Desrosiers R. C. (1991) Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65, 651-662

Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Ishiwata A, Kimura K, Takano K, Madoiwa S, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y (2004). Sustained transgene expression by human cord blood derived CD34+ cells transduced with simian

immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *J Gene Med.*; 6: 1049-60

Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, Wilson JM. (2001). Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol*; 19: 225-230

Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Déglon N, Aebischer P. (2000). Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*; 290: 767-773

Korin YD, Zack JA (1999). Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection in nucleoside-treated G0 lymphocytes. *J Virol.*; 73(8): 6526-32

Korin YD, Zack JA. (1998). Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol*; 72: 3161-3168

Kotsopoulou E et al. (2000). A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimised HIV-1 *gag-pol* Gene. *J Virol*; 74: 4839-4852

Kowolik CM, Yee JK. (2002). Preferential transduction of human hepatocytes with lentiviral vectors pseudotyped by Sendai virus F protein. *Mol Ther*; 5: 762-769

Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.*; 84: 691-701.

Kurre P, Anandakumar P, Harkey MA, Thomasson B, Kiem HP (2004). Efficient marking of murine long-term repopulating stem cells targeting unseparated marrow cells at low lentiviral vector particle concentration. *Mol Ther.*; 9: 914-22

Kurre P, Anandakumar P, Kiem HP (2006). Rapid 1-hour transduction of whole bone marrow leads to long-term repopulation of murine recipients with lentivirus-modified hematopoietic stem cells. *Gene Ther.*; 13: 369-73

L

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.*; 6: 1229-34

Lai Z, Brady RO. (2002). Gene transfer into the central nervous system in vivo using a recombinant lentivirus vector. *J Neurosci Res*; 67: 363-371

Lama J., Mangasarian A., and Trono D. (1999). Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Enc incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr*

León B, Martínez del Hoyo G, Parrillas V, Vargas HH, Sánchez-Mateos P, Longo N, López-Bravo M, Ardavín C (2004). Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. *Blood*; 103: 2668-76

Lewis MG, Zack PM, Elkins WR, Jahrling PB (1992) Infection of rhesus and cynomolgus macaques with a rapidly fatal SIV (SIVSMM/PBj) isolate from sooty mangabeys. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 8: 1631-9

Lewis PF, Emerman M (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol.*; 68: 510-6

Li Z, Düllmann J, Schiedmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kühlcke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*; 296 :497

Liu K, Idoyaga J, Charalambous A, Fujii S, Bonito A, Mordoh J et al. (2005). Innate NKT lymphocytes confer superior adaptive immunity via tumor-capturing dendritic cells. *J Exp Med*; 202: 1507-1516

Lopes L, Fletcher K, Ikeda Y, Collins M (2006). Lentiviral vector expression of tumour antigens in dendritic cells as an immunotherapeutic strategy. *Cancer Immunol Immunother.*; 55: 1011-6

Lu W, Wu X, Lu Y, Guo W, Andrieu JM (2003). Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. *Nat Med.*; 9: 27-32

Lucotti C, Malabarba L, Rosti V, Bergamaschi G, Danova M, Invernizzi R, Pecci A, Ramajoli I, Perotti C, Torretta L, De Amici M, Salvaneschi L, Cazzola M (2000). Cell cycle distribution of cord blood-derived haematopoietic progenitor cells and their recruitment into the S-phase of the cell cycle. *Br J Haematol.*; 108: 621-8

Ludewig B, Ehl S, Karrer U, et al. (1998). Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *J Virol*; 272: 3812-3818

M

Margottin F., Bour S.P., Durand H., Selig L., Benichou S., Richard V., Thomas D., Strebel K., and Benarous R. (1998). A novel WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1, 565-574

Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Münk C, Nymark-McMahon H, Landau NR (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell.*; 114: 21-31

Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, et al. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity.

Mehrotra S, Zaidi N, Chakraborty NG, Mukherji B (2006). Macrophages as stimulators of MART-1 27-35 epitope-specific human cytolytic T lymphocytes in vitro. *Pathobiology.*; 73: 238-43

Mellman I, Steinman RM. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*; 106: 255-258

Miller DG, Adam MA, Miller AD. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol*; 10: 4239-4242

Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*; 72: 8150-8157

Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE (1999). Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.*; 283: 682-6

Modlich U, Bohne J, Schmidt M, von Kalle C, Knöss S, Schambach A, Baum C. (2006). Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood*;15 :2545-53

Modrow S et al. (2003). *Molekulare Virologie*. 2. Auflage; Spektrum Verlag

Morel F, Galy A, Chen B, Szilvassy SJ (1998). Equal distribution of competitive long-term repopulating stem cells in the CD34+ and CD34- fractions of Thy-1lowLin-/lowSca-1+ bone marrow cells. *Exp Hematol.*; 26: 440-8

Mostoslavsky G, Kotton DN, Fabian AJ, Gray JT, Lee JS, Mulligan RC (2005). Efficiency of transduction of highly purified murine hematopoietic stem cells by lentiviral and oncoretroviral vectors under conditions of minimal in vitro manipulation. *Mol Ther.*; 11: 932-40

Mueller S.M., Jung R., Weiler S., Lang S.M. (2004) Vpx proteins of SIVmac239 and HIV-2ROD interact with the cytoskeletal protein alpha-actinin 1; *Journal of General Virology*, 85, 3291-3303

Mühlebach MD, Wolfrum N, Schüle S, Tschulena U, Sanzenbacher R, Flory E, Cichutek K, Schweizer M (2005). Stable transduction of primary human monocytes by simian lentiviral vector PBj. *Mol Ther.*; 12: 1206-16

Mühlebach MD. Doktorarbeit 2000

Münk C, Brandt SM, Lucero G, Landau NR (2002). A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 99: 13843-8

N

Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Ueda K, Ojima T, Naka T, Ishida K, Yamaue H (2005). Dendritic cells transduced with tumor-associated antigen gene elicit potent

therapeutic antitumor immunity: comparison with immunodominant peptide-pulsed DCs. *Oncology.*; 68: 163-70

Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, Hotta T, Kato S (1999). Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. *Blood.*; 94: 4053-9

Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. (1996). In vivo delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*; 272: 263-267

Neil S, Martin F, Ikeda Y, Collins M (2001). Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes. *J Virol.*; 75: 5448-56

Neil S.J., Zang T., and Bieniasz P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425-430

Neil, S.J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2006). HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PloS Pathog.* 2, e39

Ng YY, van Kessel B, Lokhorst HM, Baert MR, van den Burg CM, Bloem AC, Staal FJ (2004). Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *J Leukoc Biol.*; 75: 314-23

Novembre FJ, Johnson PR, Lewis MG, Anderson DC, Klumpp S, McClure HM, Hirsch VM (1993). Multiple viral determinants contribute to pathogenicity of the acutely lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj variant. *J Virol.*; 67: 2466-74

Novembre FJ, Lewis MG, Saucier MM, Yalley-Ogunro J, Brennan T, McKinnon K, Bellah S, McClure HM (1996). Deletion of the nef gene abrogates the ability of SIV smmPBj to induce acutely lethal disease in pigtail macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses.*; 12: 727-36

Noviello C.M., Benichou S., and Guatelli J.C. (2008) Cooperative binding of the class I major histocompatibility complex cytoplasmic domain and human immunodeficiency virus type 1 Nef to the endosomal AP-1 complex via its mu subunit. *J. Virol.* 82, 1249-1258

O

Ogawa M (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.*; 81: 2844-53

Oh ST, Kim CH, Park MY, Won EH, Sohn HJ, Cho HI, Kang WK, Hong YK, Kim TG (2006). Dendritic cells transduced with recombinant adenoviruses induce more efficient anti-tumor immunity than dendritic cells pulsed with peptide. *Vaccine.*; 24: 2860-8

Orlic D, Bodine DM (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood.*; 84: 3991-4.

Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 93: 11400-6

Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H (1996). Long-term lymphohematopoietic

reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.*; 273: 242-5

P

Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, Rangel ZG, Munson PJ, Wahl SM (2007). Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood.*; 110: 393-400

Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, Stalder R, Correa R, Steinman RM, Piguet V (2006). APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med.*; 203: 2887-93

Pizzato M., Helander A., Popova E., Calistri A., Zamborlini A., Palu G., and Gottlinger H.G. (2007). Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 6812-6817

Prost S, Le Dantec M, Augé S, Le Grand R, Derdouch S, Auregan G, Déglon N, Relouzat F, Aubertin AM, Maillere B, Dusanter-Fourt I, Kirszenbaum M (2008). Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques. *J Clin Invest.*; 118: 1765-75

R

Ricks DM, Kutner R, Zhang XY, Welsh DA, Reiser J (2008). Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*; 17: 441-50

Roesler J, Brenner S, Bukovsky AA, Whiting-Theobald N, Dull T, Kelly M, Civin CI, Malech HL (2002). Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood.*; 100: 4381-90

Roeth J.F., and Collins K.L. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 548-563

Rosenberg SA (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature.*; 411: 380-4

S

Sakuma R, Noser JA, Ohmine S, Ikeda Y (2007). Inhibition of HIV-1 replication by simian restriction factors, TRIM5alpha and APOBEC3G. *Gene Ther.*; 14: 185-9

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

- Salmon P**, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler RH, Trono D (2000). High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood.*; 96 : 3392-8
-
- Sanders DA**. (2002). No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr Opin Biotechnol*; 13: 437-442
-
- Santoni de Sio FR**, Cascio P, Zingale A, Gasparini M, Naldini L (2006). Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction. *Blood.*; 107: 4257-65
-
- Sato T**, Laver JH, Ogawa M (1999). Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood.*; 94: 2548-54
-
- Scherr M**, Battmer K, Blömer U, Schiedlmeier B, Ganser A, Grez M, Eder M (2002). Lentiviral gene transfer into peripheral blood-derived CD34+ NOD/SCID-repopulating cells. *Blood.*; 99: 709-12
-
- Schroers R**, Sinha I, Segall H, Schmidt-Wolf IG, Rooney CM, Brenner MK, Sutton RE, Chen SY (2000). Transduction of human PBMC-derived dendritic cells and macrophages by an HIV-1-based lentiviral vector system. *Mol Ther.*; 1: 171-9
-
- Schuler G.**, and Steinman R. M. (1997). Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J. Exp. Med.* 186, 1183-1187
-
- Schwartz O.**, Marechal V., Le G.S., Lemonnier F., and Heard J.M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Med.* 2, 338-342
-
- Seggewiss R**, Pittaluga S, Adler RL, Guenaga FJ, Ferguson C, Pilz IH, Ryu B, Sorrentino BP, Young WS 3rd, Donahue RE, von Kalle C, Nienhuis AW, Dunbar CE (2006). Acute myeloid leukemia is associated with retroviral gene transfer to hematopoietic progenitor cells in a rhesus macaque. *Blood*; 15; 3865-7
-
- Serafini M**, Naldini L, Introna M (2004). Molecular evidence of inefficient transduction of proliferating human B lymphocytes by VSV-pseudotyped HIV-1-derived lentivectors. *Virology.*; 325: 413-24
-
- Sheehy**, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650
-
- Sonza S**, Maerz A, Deacon N, Meanger J, Mills J, Crowe S (1996). Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol.*; 70: 3863-9
-
- Specht J. M.** et al. (1997). Dendritic cells retrovirally transduced with a model tumor antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J. Exp. Med.* 186, 1213-1221
-
- Spina C.A.**, Kwoh T.J., Chowes M.Y., Guatelli J.C., and Richman D.D. (1994) The

importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 279, 115-23

Srivastava S., Swanson S.K., Manel N., Florens L., Washburn M.P., and Skowronski J. (2008). Lentiviral Vpx accessory factor targets VprBP/DCAF1 substrate adaptor for Cullin 4 E3 ubiquitin ligase to enable macrophage infection. *PLoS Pathogen.* 4, e1000059

Steinman RM, Banchereau J (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature.*; 449: 419-26

Steinman RM, Cohn ZA. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* ; 137 ; 1142-1162

Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K et al. (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann NY Acad Sci*; 987: 15-25

Stivahtis G.L., Soares M.A., Vodicka M.A, Hahn B.H., Emerman M. (1997) Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggest a fundamental role in primate lentivirus evolution and biology, *J. Virol.* 71 4331-4338

Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature.*; 427: 848-53

Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, Chang J, Testa NG (2001). Cord blood G(0) CD34+ cells have a thousand-fold higher capacity for generating progenitors in vitro than G(1) CD34+ cells. *Stem Cells.*; 19: 505-13

Swigut T., Alexander L., Morgen J., Lifson J., Mansfield K.G., Lang S., Johnson R.P., Skowronski J., and Desrosiers R. (2004). Impact of Nef-mediated downregulation of major histocompatibility complex class I on immune response to simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 78, 13335-13344

T

Tan PH, Beutelspacher SC, Xue SA, Wang YH, Mitchell P, McAlister JC et al. (2005). Modulation of dendritic-cell function following transduction with viral vectors: implications for gene therapy. *Blood*; 105: 3824-3832

Teruo HM, Goffinet C, Keppler OT (2008). Mouse T-cells restrict replication of human immunodeficiency virus at the level of integration. *Retrovirology*;5 : 58

Tristem M, Purvis A., Quicke D.L. (1998). Complex evolutionary history of primate lentiviral *vpr* genes, *Virology* 240 232-237

Tristem M., Marshall C., Karpas A., Petrik J., and Hill F. (1990). Origin of *vpx* in lentiviruses. *Nature* 347, 341-342

Tsujimoto H, Hasegawa A, Maki N, Fukasawa M, Miura T, Speidel S, Cooper RW,

Moriyama EN, Gojobori T, Hayami M (1989). Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill. *Nature*; 12: 539-541

U

Ueda T, Yoshida M, Yoshino H, Kobayashi K, Kawahata M, Ebihara Y, Ito M, Asano S, Nakahata T, Tsuji K (2001). Hematopoietic capability of CD34+ cord blood cells: a comparison with CD34+ adult bone marrow cells. *Int J Hematol.*; 73: 457-62

Ueno F., Shiota H., Miyaura M., Yoshida A., Sakurai A., Tatsuki J., Koyama A.H., Adachi A., Fujita M. (2003). Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes Infect.* 5 (5), 387-395

Unutmaz D, KewalRamani VN, Marmon S, Littman DR (1999). Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med.*; 189: 1735-46

V

Van Damme N., Goff D., Katura C., Jorgenson R.L., Mitchell R., Johnson M.C., Stephens E.B., and Guatelli J.C. (2008). The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3, 1-8

Van den Eynde BJ, van den Bruggen P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*; 9: 684-693

Van Tendeloo VF, Van Broeckhoven C, Berneman ZN (2001). Gene therapy: principles and applications to hematopoietic cells. *Leukemia.*; 15: 523-44

Verhoeyen E, Wiznerowicz M, Olivier D, Izac B, Trono D, Dubart-Kupperschmitt A, Cosset FL (2005). Novel lentiviral vectors displaying "early-acting cytokines" selectively promote survival and transduction of NOD/SCID repopulating human hematopoietic stem cells. *Blood.*; 106: 3386-95

W

Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, Schmid B et al. (2006). Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood*; 108: 544-550

Winslow T *et al.* (2001). *Stem Cells :Scientific Progress and Future Research Directions* ; NIH

Wolftrum N, Mühlebach MD, Schüle S, Kaiser JK, Kloke BP, Cichutek K, Schweizer M (2007). Impact of viral accessory proteins of SIVsmmPBj on early steps of infection of quiescent cells. *Virology.*; 364: 330-41

Woods NB, Fahlman C, Mikkola H, Hamaguchi I, Olsson K, Zufferey R, Jacobsen SE, Trono D, Karlsson S (2000). Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood.*; 96: 3725-33

Y

Yang Y, Huang CT, Huang X, Pardoll DM. (2004). Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol*; 5: 508-515

Yu X, Zhan X, D'Costa J, Tanavde VM, Ye Z, Peng T, Malehorn MT, Yang X, Civin CI, Cheng L (2003). Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Mol Ther.*; 7: 827-38

Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, O., and Yu, X.F. (2003). Induction of APOBEC3 ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302, 1056-1060

Z

Zhang JX, Diehl GE, Littman DR (2008). Relief of preintegration inhibition and characterization of additional blocks for HIV replication in primary mouse T cells. *PLoS ONE.*; 3: e2035

Zhou LJ and Tedder TF. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 2588-92

Zielske SP, Gerson SL 2003. Cytokines, including stem cell factor alone, enhance lentiviral transduction in nondividing human LTCIC and NOD/SCID repopulating cells. *Mol Ther.*; 7: 325-33

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*; 73: 2886-2892

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
agm	Afrikanische grüne Meerkatze
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom
Amp	Amicillin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BFU-E	“blast forming unit-erythroid”
BSA	Bovines Serumalbumin
CB-HSC	Stammzellen aus Nabelschnurblut
CD	“cluster of differentiation”, CD-Oberflächenmerkmale
CFU-GM	“colony forming unit – granulocyte macrophage”
CIP	“calf intestinal phosphatase”
CMV	Cytomegalievirus
cPpt	Zentraler Polypurintrakt
cpz	Chimpanzee, Schimpanse
CSF	„colony-stimulating factor“, koloniestimulierender Faktor
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTS	Zentrale Terminationssequenz
DC	Dendritische Zelle
DKFZ	Deutsches Krebsforschungsinstitut
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
egfp/EGFP	Enhanced green fluorescence protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
env	Envelope, Hüllprotein
et al.	Und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	5´-Fluoroisothiocyanat
FLT-3 Ligand	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
gag	Group specific antigen, Strukturgen
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Horse radish peroxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IFN	Interferon
IL	Interleukin
imDC	Unreife dendritische Zelle
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	Long terminal repeat
m	Milli
M	Molar
mac	Macaque, Makake
MACS	Magnetic activated cell sorting
mDC	Reife dendritische Zelle
MHC	Major histocompatibility complex

MLV	Murines Leukämievirus
Mnd	Mandrill, Drills
Mob HSC	Mobilisierte Stammzellen
MOI	Multiplicity of infection; Anzahl der Partikel pro Zelle
mRNA	Messenger RNA
n	nano
nef	Negative factor
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NKZ	Natürliche Killerzellen
NLS	Kernlokalisierungssignal
NOD/SCID	Nonobese diabetes/severe combined immunodeficiency
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
pA	Polyadenylierung
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PIC	Präintegrationskomplex
pol	polymerase
PPT	Polypurintrakt
Psi, ψ	Verpackungssignal
rcm	Red capped mangabeys, Rotscheitelmangabe
rev	Regulator of expression of virion proteins
rh	Rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SCF	Stammzellfaktor
SCID	Severe combined immunodeficiency
SIN	Selbst inaktivierend
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
smm	Sooty mangabey monkey, Halsbandmangabe
syk	Sykes, Diademmeerkatze
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
tat	Transaktivator of transcription
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vif	Viral infectivity factor
Vpr	Viral protein rapid
Vpu	Viral protein u
Vpx	Viral protein x
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
w/v	Gewicht pro Volumen
WPRE	Woodchuck posttranscriptional regulatory element
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

Danksagung

Herrn Professor Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Möglichkeit am Paul-Ehrlich-Institut meine Promotion anfertigen zu können.

Herrn Professor Dr. Bernd Ludwig danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Universität.

Bei Herrn Professor Dr. Matthias Schweizer möchte ich mich besonders für die Betreuung der Arbeit bedanken, sowie für seine Hilfsbereitschaft auch außerhalb wissenschaftlicher Fragestellungen.

Herrn Professor Dr. Gerd Sutter möchte ich für die Betreuung als Mentor, sowie für seine hilfreichen und motivierenden Worte bedanken.

Bei Frau Dr. Silke Schüle möchte ich für die Betreuung insbesondere zu Beginn meiner Doktorarbeit danken, wo sie mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Sylvia Panitz und Tanja Kearns danke ich für ihre technische Unterstützung, insbesondere Sylvia für die „super Titer“ und Tanja für die „Maxis“, sowie für viele nette Gespräche.

Besonderer Dank geht an Mario Percovic, Melanie Krämer, Ferdinand Kopietz und Henning Hofmann, die meinen Laboralltag oft aufgeheitert haben.

Professor Dr. Carsten Münk danke ich für sein stets offenes Ohr und für die vielen hilfreichen Tipps.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Heide Muckenfuß für viele wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Gespräche, sowie für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Bei Dr. Matthias Hamdorf möchte ich mich für seine Hilfe bei dem einen oder anderen kleinen „Stammzellproblem“ bedanken.

Allen Mitgliedern der Abteilung 6 möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre große Unterstützung und Motivation bedanken. Mein besonderer Dank gilt Marcos Palomo, der mir in allen Lebenslagen zur Seite stand

Lebenslauf

Name: Julia Kathie Kaiser
Geburtsdatum: 27.10.1978
Geburtsort: Wiesbaden
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

Schule	1985 - 1998	
	Abschluss	allgemeine Hochschulreife, Note: 1,8
Studium	1999 - 2004	Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main Studienschwerpunkte: Biochemie, Biophysikalische Chemie, Zellbiologie
Diplom	08/03 - 09/03	Diplomhauptprüfung
Diplomarbeit	10/03 - 07/04	Titel der Diplomarbeit: „Die Bedeutung der akzessorischen Gene bei der Transduktion primärer humaner Monozyten mit SIV _{smm} PBJ-abgeleiteten lentiviralen Vektoren“ durchgeführt am Paul-Ehrlich-Institut in Langen, in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Cichutek, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schweizer
Promotion	Abschluss seit 10/04	Diplom, Gesamtnote: 1,0 Thema: „Eignung von SIV _{smm} PBJ-abgeleiteten lentiviralen Vektoren für die Transduktion primärer Zellen und für immuntherapeutische Anwendungen“ durchgeführt am Paul-Ehrlich-Institut in Langen, in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Cichutek, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schweizer

Bibliographie

Publikationen

Muckenfuss H, **Kaiser JK**, Krebil E, Battenberg M, Schwer C, Cichutek K, Münk C, Flory E. Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human APOBEC3G gene. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(11):3784-96

Wolfrum N, Mühlebach MD, Schüle S, **Kaiser JK**, Kloke BP, Cichutek K, Schweizer M. Impact of viral accessory proteins of SIVsmmPBj on early steps of infection of quiescent cells. *Virology.* 2007 Aug 1;364(2):330-41

Mündliche Präsentationen

J. Kaiser, S. Schüle, Y. Sun, M. Schweizer and K. Cichutek. „Transduction of primary human immune cells suitable for immunotherapy using SIVsmmPBj-derived lentiviral vectors“. CliniGene, 1st Training Course, Barcelona, Spain, 2007

Poster

J. Kaiser, N. Wolfrum, S. Schüle, M. Schweizer and K. Cichutek. “Transduction of quiescent primary cells by SIVsmmPBj-derived lentiviral vectors”. Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting, Munich, Germany, 2006

J. Kaiser, S. Schüle, Y. Sun, N. Wolfrum, M. Schweizer and K. Cichutek. „Transduction of quiescent human primary cells suitable for immunotherapy using SIVsmmPBj-derived lentiviral vectors“. Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, Netherlands, 2007

J. Kaiser, S. Schüle, Y. Sun, M. Schweizer and K. Cichutek. “Suitability of SIVsmmPBj-derived lentiviral vectors for immunotherapy”. Third European Congress of Virology, Nürnberg, Germany, 2007

J. Kaiser, S. Schüle, Y. Sun, N. Wolfrum, M. Schweizer and K. Cichutek. "Transduction of Quiescent Human Primary Cells Suitable for Immunotherapy using SIVsmmPBj-derived Lentiviral Vectors". German Society of Gene Therapy (DG-GT), 14th Annual Meeting, Heidelberg, Germany, 2007

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation „Eignung von SIV_{smm}PBj-abgeleiteten lentiviralen Vektoren für die Transduktion primärer Zellen und für immuntherapeutische Anwendungen“ selbständig angefertigt wurde und ich mich keiner anderen Hilfsmittel als den angegebenen bedient habe, insbesondere, dass Entlehnungen aus anderen Schriften, soweit sie nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Quelle bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Wiesbaden, den 28. September 2009

.....

Julia Kaiser