

Pharmakokinetische Untersuchungen genkorrigierter Hämatopoese in klinischen retroviralen Studien

DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Anna Paruzynski

geboren in Mainz

Tag der mündlichen Prüfung:

04.Mai 2010

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Valerie Bosch
Genom-Veränderungen und Carcinogenese
Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Christof von Kalle
Translationale Onkologie
Deutsches Krebsforschungszentrum und
Nationales Centrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ZUSAMMENFASSUNG	VIII
SUMMARY	IX
1 EINLEITUNG	- 10 -
1.1 Erbliche Immundefizienzen des humanen hämatopoetischen Systems	- 10 -
1.1.1 Septische Granulomatose (“Chronic Granulomatous Disease”, CGD)	- 11 -
1.1.2 Schwerer kombinierter Immundefekt ausgelöst durch Adenosin-Desaminase-Mangel („Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“, ADA-SCID)	- 12 -
1.1.3 Das Wiskott-Aldrich Syndrom („Wiskott-Aldrich Syndrome“, WAS).....	- 14 -
1.2 Somatische Gentherapie.....	- 15 -
1.2.1 Methoden des Gentransfers	- 15 -
1.2.2 Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen	- 17 -
1.2.3 Integrierende retrovirale Vektorsysteme der Gentherapie	- 20 -
1.3 Historie der klinischen Gentherapie	- 23 -
1.4 Risiken und Nebenwirkungen des retroviralen Gentransfers	- 25 -
1.4.1 Methoden der Integrationsstellenanalyse.....	- 26 -
1.4.2 Integrationsstellenverteilung retroviraler Vektoren.....	- 27 -
1.4.3 Nebenwirkungen in präklinischen und klinischen Gentherapiestudien	- 28 -
1.5 Vektor- und Sicherheitsoptimierung in der Gentherapie	- 30 -
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	- 32 -

2	MATERIAL UND METHODEN	- 34 -
2.1	Material.....	- 34 -
2.1.1	DNA aus transduzierten Zelllinien.....	- 34 -
2.1.2	Patientenmaterial.....	- 35 -
2.1.3	Oligonukleotide.....	- 37 -
2.1.4	DNA-Längenstandards, Enzyme und Kits	- 41 -
2.1.4.1	DNA-Längenstandard.....	- 41 -
2.1.4.2	Enzyme und Kits	- 41 -
2.1.5	Sonstige Chemikalien und Reagenzien.....	- 42 -
2.1.6	Sonstige Materialien.....	- 43 -
2.1.7	Puffer und Lösungen.....	- 43 -
2.1.8	Geräte	- 44 -
2.1.9	Computerprogramme und Datenbanken	- 45 -
2.1.10	Fotomaterial.....	- 45 -
2.2	Methoden.....	- 45 -
2.2.1	Transduktion von HeLa-Zellen	- 45 -
2.2.2	DNA-Isolation aus Zellen	- 46 -
2.2.3	DNA-Isolation aus Blut/Knochenmark.....	- 46 -
2.2.4	DNA Vervielfältigung mittels „GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit“	- 46 -
2.2.5	RNA-Isolation aus Zellen.....	- 47 -
2.2.6	cDNA-Synthese	- 47 -
2.2.7	Konzentrationsbestimmung der DNA, RNA und cDNA.....	- 48 -
2.2.8	Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	- 49 -
2.2.9	Bestimmung der Transduktionseffizienz.....	- 50 -
2.2.10	Amplifikation spezifischer Integrationsstellen – „Tracking“-PCR	- 51 -
2.2.11	Amplifikation großer DNA-Fragmente – „Midrange“-PCR	- 52 -
2.2.12	Lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR).....	- 53 -
2.2.13	Nicht-restriktive lineare amplifikationsmedierte PCR (nrLAM-PCR).....	- 58 -
2.2.14	Gelelektrophorese.....	- 61 -
2.2.15	Aufreinigung der PCR-Produkte	- 61 -
2.2.16	Fusionsprimer-PCR.....	- 61 -
2.2.17	Sequenzierung	- 63 -
2.2.18	„Realtime“-PCR.....	- 64 -

3	ERGEBNISSE	- 67 -
3.1	Genomische Zugänglichkeit der Integrationsstellenanalyse und Weiterentwicklung der LAM-PCR	- 67 -
3.1.1	Die Erstellung eines mathematischen Modells zur Abschätzung des für die LAM-PCR zugänglichen humanen Genoms	- 67 -
3.1.1.1	Die Bestimmung der genomischen Zugänglichkeit der Integrationsstellenanalyse	- 68 -
3.1.1.2	Die Zugänglichkeit des Genoms für die Integrationsstellenanalyse wird beeinflusst durch das Restriktionsenzym und die Amplifikationslänge	- 68 -
3.1.1.3	Die Validierung des mathematischen Modells	- 72 -
3.1.2	Etablierung einer nicht restriktiven (nr) LAM-PCR	- 73 -
3.1.2.1	Vergleichende Analyse lentiviral transduzierter HeLa-Klone mit LAM-PCR und nrLAM-PCR	- 76 -
3.1.2.2	Die Verwendung der nrLAM-PCR in Kombination mit der Pyrosequenzierung (GS FLX) zur Analyse präklinischer und klinischer Proben	- 78 -
3.1.2.3	Die Analyse klonaler Dominanz in einer retroviralen Gentherapiestudie	- 79 -
3.2	Die Analyse gammaretroviraler Integrationsstellen in der klinischen Gentherapie	- 82 -
3.2.1	Vergleichende Integrationsstellenanalyse	- 83 -
3.2.2	Retrovirale Gentherapie der X-gekoppelten Septischen Granulomatose (X-CGD)	- 85 -
3.2.2.1	Klonalitätsanalyse der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation	- 86 -
3.2.2.2	Charakterisierung bevorzugter Integrationsorte	- 96 -
3.2.2.3	Vergleich der <i>MDS1-EV11</i> Integrationsstellen der schweizer und koreanischen X-CGD Gentherapiestudie mit der deutschen Gentherapiestudie	- 98 -
3.2.2.4	Genexpressionsanalysen in der schweizer Gentherapiestudie	- 101 -
3.2.3	Retrovirale Gentherapie des schweren kombinierten Immundefekts ausgelöst durch Adenosin-desaminasemangel (ADA-SCID)	- 103 -
3.2.3.1	Klonalitätsanalyse der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation	- 104 -
3.2.3.2	Charakterisierung bevorzugter Integrationsorte	- 106 -
3.2.4	Retrovirale Gentherapie des Wiskott-Aldrich Syndroms (WAS)	- 107 -
3.2.4.1	Klonalitätsanalyse der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation	- 107 -
3.2.4.2	Charakterisierung bevorzugter Integrationsorte	- 111 -
3.2.4.3	Analyse der Integrationsstellen in gesorteten Fraktionen	- 112 -

4	DISKUSSION	- 114 -
4.1	Integrationsstellenanalyse und genomische Zugänglichkeit der linearen amplifikationsmedierten PCR (LAM-PCR)	- 115 -
4.2	Steigerung der Zugänglichkeit von Integrationsloki im Genom durch nicht-restriktive Integrationsstellenanalyse	- 117 -
4.3	LAM-PCR/nrLAM-PCR und Pyrosequenzierung (GS FLX)	- 120 -
4.4	Klinische Gentherapie mit gammaretroviralen Vektoren.....	- 122 -
4.5	Klonale <i>in vivo</i> Selektion in der klinischen retroviralen Gentherapie	- 123 -
4.5.1	<i>In vivo</i> Expansion genkorrigierter Zellen in drei X-CGD Gentherapiestudien.....	- 124 -
4.5.2	ADA-SCID – Das klonale Inventar nach Behandlung einer lymphoiden Erkrankung	- 128 -
4.5.3	WAS – Das klonale Inventar nach Behandlung einer Erkrankung des myeloiden und lymphoiden Systems	- 128 -
4.5.4	Vergleich der <i>MDS1-EVII</i> - Integrationen in allen analysierten klinischen Gentherapiestudien	- 129 -
4.5.5	Integrationsstellen im lymphoiden und myeloiden hämatopoetischen System.....	- 130 -
4.6	Verwendung gammaretroviraler Integrationsloki zur pharmakokinetischen Markierung	- 131 -
4.7	Optimierung der Vektorsicherheit für zukünftige Gentherapiestudien	- 132 -
5	LITERATURVERZEICHNIS	- 135 -
6	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	- 146 -
6.1	Publikationen.....	- 146 -
6.2	Kongressbeiträge	- 147 -
7	ANHANG	- 150 -
	DANKSAGUNG	- 157 -
	ERKLÄRUNG	- 159 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

454	Pyrosequenzierung („454 Sequencing System from 454 Life Science, a Roche Company ”)
AAV	Adenoassoziierte Viren
ADA	Adenosindesaminase
ADA-SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt basierend auf ADA-Mangel („Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“)
bp	Basenpaare
BLAT	„Blast Like Alignment Tool“
BMI1	„BMI1 Polycomb Ring Finger Oncogene“
CAMTA1	„Calmodulin-Binding Transcription Activator 1“
CCND2	„CCND2 Cyclin D2“
CD	„Cluster of Differentiation“
CDKN2A	„Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A“
CGD	Septische Granulomatose („Chronic Granulomatous Disease“)
CIS	„Common Integration Site“
Chr	Chromosom
CMV	Cytomegalovirus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ds	doppelsträngig
eGFP	„enhanced Green Fluorescent Protein“
env	„Envelope“
EVI1	„Ecotropic Viral Integration Site 1“
FP	Flankenprimer
Fr-MuLV	„Friend Murine Leukemia Virus“
FuP	Fusionsprimer
gag	gruppenspezifisches Antigen
GALV	„Gibbon-Ape Leukemia Virus“
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Human-Leukozyten-Antigen
HSC	Hämatopoetische Stammzellen („Hematopoietic Stem Cells“)

HSCT	Hämatopoetische Stammzell-Therapie („Hematopoietic Stem Cell Therapy“)
HSV	Herpes Simplex Viren
IK	Internes Vektorkontrollfragment
IL2RG	„Interleukin-2 Receptor Common γ -Chain“
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen („induced Pluripotent Stem Cells“)
IS	Integrationsstelle
kb	Kilobasen
Kda	Kilodalton
LAM-PCR	Lineare Amplifikationsmedierte PCR
LC/LK	Linkerkassette („Linker Cassette“)
LMO2	„LIM Domain Only 2“
LM-PCR	Ligationsmedierte PCR
LTR	„Long Terminal Repeat“
LV	Lentiviraler HIV-1-abgeleiteter SIN-Vektor
MAP3K5	„Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 5“
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS1	„Myelodysplastic Syndrome 1“
MEIS1	„Meis Homeobox 1“
MF	Magnetisches Feld
min	Minuten
MLV	„Murine Leukemia Virus“
MNC	Mononukleäre Zellen („Mononuclear Cells“)
MOI	„Multiplicity of Infection“
NADPH	„Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat“
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOTCH1	„Notch Homolog 1“
nrLAM-PCR	nicht-restriktive LAM-PCR
NUCB2	„Nucleobinding-2“
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes („Peripheral Blood Mononuclear Cells“)
PBS	Primerbindestelle
pol	enzymatische Aktivitäten (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease)
PPT	Polypurintrakt
PRDM16	„PR Domain Containing 16“

R	„Redundant“
RT	Reverse Transkriptase
RV	onkoretroviraler Vektor
sek	Sekunden
SETBP1	„SET Binding Protein 1“
SFFV	„Spleen Focus Forming Virus“
SIN	selbstinaktivierend
ss	einzelsträngig („single-stranded“)
SSBP3	„Single Stranded DNA Binding Protein 3“
STAT3	„Signal Transducer and Activator of Transcription 3“
T-ALL	T-Zell akute lymphoblastische Leukämie
TF	Transkriptionsfaktor
TSS	Transkriptionsstartstelle
TZR	T-Zellrezeptor
U3	„Unique 3“
U5	„Unique 5“
UE	Untereinheit
Ü.N.	über Nacht
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
X-ALD	X-gekoppelte Adrenoleukodystrophie
X-SCID	X-gekoppelter schwerer kombinierter Immundefekt („X-linked Severe Combined Immunodeficiency“)
ZFN	Zinkfingernukleasen
γ c	gemeinsame gamma Kette („common gamma chain“)

ZUSAMMENFASSUNG

Die somatische Gentherapie mit retroviralen Vektoren konnte erfolgreich zur Behandlung monogenetischer Erbkrankheiten eingesetzt werden. Jedoch traten bereits in 3 klinischen Gentherapiestudien schwerwiegende vektorinduzierte Nebenwirkungen auf. Integrationsstellen (IS)-Analysen erlaubten die Detektion von Integrationen in oder in der Nähe von Protoonkogenen, die zu einer Überexpression der Gene und zur malignen Entartung der betroffenen Zellen führten, an deren Folgen 2 der 7 erkrankten Patienten verstarben. Umfassende Analysen der Vektor-IS und deren Einfluss auf zelluläre biologische Prozesse sind daher von größter Wichtigkeit und können dabei helfen, mögliche Risiken schon frühzeitig auf der molekularen Ebene zu erkennen.

Die Bestimmung der IS erfolgte in den untersuchten klinischen Gentherapiestudien mithilfe der linearen amplifikationsmedierten PCR (LAM-PCR). Zur Verbesserung des zugänglichen Anteils der IS wurde ein mathematisches Modell entwickelt, das die genomische Zugänglichkeit von IS in Abhängigkeit der verwendeten Restriktionsenzyme *a priori* berechnet. Weiterer Bestandteil meiner Arbeit war die Etablierung einer nicht restriktiven (nr) LAM-PCR, die eine IS-Analyse ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen ermöglicht.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte vergleichende IS-Analyse in Kombination mit der Sanger Sequenzierung von 5 klinischen (2547 IS) und 3 präklinischen (1316 IS) gammaretroviralen Studien zeigte beeindruckende Übereinstimmungen. So wurden über 70% aller IS in genkodierenden Bereichen detektiert mit einer Anhäufung um die Transkriptionsstartstelle (TSS, 23%-39%). Weiterhin konnten wir die Protoonkogene *MDS1-EVI1* (108 IS), *PRDM16* (37 IS), *LMO2* (13 IS), *CCND2* (12 IS) und *SETBP1* (10 IS) als gemeinsame bevorzugte Integrationsorte beobachten. Ein weiterer Fokus stellten die Klonalitäts- und pharmakokinetischen Analysen der Proben von insgesamt 9 Patienten aus zwei X-CGD, einer ADA-SCID und einer WAS gammaretroviralen Gentherapiestudie dar, die über einen Zeitraum von bis zu 5 Jahren nach Therapie erfolgten. In allen untersuchten Studien zeigte die (nr) LAM-PCR Analyse gefolgt von der Pyrosequenzierung (GS FLX, > 20000 IS) ebenfalls eine nicht zufällige Verteilung mit einer bevorzugten Integration in genkodierenden Bereichen (47%-72%) und einer Anhäufung der IS um die TSS (8%-16%). Weiterhin wurden ebenfalls bevorzugte Integrationsorte in oder in der Nähe der Protoonkogene *MDS1-EVI1* (289 IS), *PRDM16* (104 IS), *LMO2* (52 IS), *SETBP1* (34 IS) und *CCND2* (33 IS) detektiert. Mittels LAM-PCR „Sequence Count“ Analysen konnte eine vektorinduzierte *in vivo* Selektion einzelner *MDS1*-Klone in 3 der insgesamt 4 X-CGD Patienten beobachtet werden. Reverse Transkriptase (RT)-PCR Untersuchungen zur Genexpression in einem X-CGD Patienten zeigten eine Überexpression der von der Integration betroffenen Gene *MDS1-EVI1* und *STAT3*. In den weiteren Patienten der untersuchten Gentherapiestudien verlief die hämatopoetische Repopulation bis zum letzten analysierten Zeitpunkt polyklonal. Allerdings konnten wir auch in der WAS Gentherapiestudie eine *in vivo* Selektion eines *CCND2*- und eines *MDS1*-Klons über „Sequence Count“ Analyse und qPCR nachweisen.

Die Klonalitätsanalysen mittels LAM-PCR/nrLAM-PCR und Hochdurchsatzsequenzierung (Pyrosequenzierung, GS FLX) führten zu einer einzigartigen Datensammlung von insgesamt > 20000 IS aus klinischem Patientenmaterial. Unsere Untersuchungen zeigten, dass herkömmliche retrovirale Vektoren mit aktivem LTR einen sehr signifikanten Einfluss auf die zelluläre Genexpression ausüben. Es bleibt längerfristigen Untersuchungen vorbehalten, zu klären, welche biologischen Auswirkungen die retro- und lentiviralen Vektorsysteme mit selbstinaktivierendem (SIN) LTR auf das Schicksal der transduzierten Zelle haben.

SUMMARY

Somatic gene therapy using retroviral vectors could be used successfully for the treatment of monogenetic inherited diseases. However, with increased efficiency vector-induced severe side effects have already been reported in 3 clinical gene therapy trials. There, integration site (IS) analyses allowed the precise identification and sequencing of the IS locus in the affected cells. In all reported severe adverse events the integrants were found in or close to proto-oncogenes that led to an overexpression of these genes and to malignant cell transformation. Finally 2 of the 7 diseased patients died of the consequences. Thus, comprehensive analyses of the vector integrations and their effects on cellular biological processes are of prime importance and can help to assess the potential risk at an early stage on the molecular level.

In this thesis, IS identification was carried out by using the linear amplification mediated PCR (LAM-PCR) method. To determine the genomic access to viral IS in the host genome, a mathematical model was developed, that enabled the calculation of the genomic accessibility to viral IS *a priori* in dependence of the used restriction enzymes. Moreover, we could develop a non-restrictive (nr) LAM-PCR without the restrictive application of restriction enzymes conventionally needed in IS analyses.

Our comparative IS analysis combined with sanger sequencing was carried out in the scope of this thesis with 5 clinical (2547 IS) and 3 preclinical (1316 IS) gammaretroviral studies, showing impressive correlations between the studies. Thus, more than 70% of the integrations were found to be located in gene coding regions with an accumulation around the transcription start site (TSS, 23%-39%). Furthermore, we found the proto-oncogenes *MDS1-EVI1* (108 IS), *PRDM16* (37 IS), *LMO2* (13 IS), *CCND2* (12 IS) and *SETBP1* (10 IS) as most common favored integration loci. A further focus presented the clonality and pharmacokinetic analyses of samples from 9 patients from two X-CGD, one ADA-SCID and one WAS gammaretroviral clinical gene therapy study over a period of 5 years after therapy. For all analyzed studies, (nr) LAM-PCR followed by pyrosequencing (GS FLX, > 20000 IS) also observed a non-random IS distribution with favored integrations in gene coding regions (47%-72%) and an accumulation around the TSS (8%-16%). The results further also revealed the detection of favored integrations in or close to the proto-oncogenes *MDS1-EVI1* (289 IS), *PRDM16* (104 IS), *LMO2* (52 IS), *SETBP1* (34 IS) and *CCND2* (33 IS). Using LAM-PCR „Sequence Count” analyses a vector-induced *in vivo* selection of individual *MDS1* clones was observed in 3 out of 4 treated X-CGD patients. Reverse Transcriptase (RT)-PCR analyses of the gene expression in one X-CGD patient showed an overexpression of the affected genes *MDS1-EVI1* and *STAT3*. For all further patients of the analyzed clinical gene therapy studies the hematopoietic repopulation stayed polyclonal until the latest time point analyzed. However, for the WAS gene therapy trial we could also detect an *in vivo* selection of one *CCND2* and one *MDS1* clone by „Sequence Count” analysis and qPCR.

The clonality analyses using LAM-PCR/nrLAM-PCR in combination with next generation sequencing (pyrosequencing, GS FLX) led to the generation of a unique data collection of > 20000 total IS from clinical patient material. Our analyses revealed that conventional retroviral vectors with an active LTR have a really significant influence on the cellular gene expression. Long-term studies will help to clarify the biological consequences of the retro- and lentiviral selfinactivating (SIN) LTR vector systems on the fate of the transduced cell.

1 EINLEITUNG

1.1 Erbliche Immundefizienzen des humanen hämatopoetischen Systems

Humane erbliche Immunerkrankungen sind charakterisiert durch schwere Beeinträchtigungen des Immunsystems, zu denen unter anderem die gestörte Entwicklung und Funktion von Phagozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, T- und B-Lymphozyten gehört (Fischer et al., 2007). Die meisten Immundefizienzen sind monogenetische Erkrankungen und beruhen auf dem Defekt eines rezessiven Gens (Janeway et al., 1997). Es wurden bisher mehr als 120 Gene identifiziert, deren Defekt zu mehr als 150 verschiedenen Krankheitsbildern führt (Geha et al., 2007).

Eine der schwersten Formen der monogenetischen Immundefizienzen stellt der schwere kombinierte Immundefekt („Severe Combined Immunodeficiency“, SCID) des lymphatischen Systems dar. Die prophylaktische Einnahme von Medikamenten wie Immunglobulinen oder eine Enzyersatztherapie können die Symptome verschiedener Immundefizienzen zwar lindern (Fischer et al., 2004), allerdings sterben viele Patienten trotz Behandlung verfrüht an Infektionen oder anderen Komplikationen. Eine Knochenmarkstransplantation kann in 70%-80% der Fälle zu einer Heilung führen, wenn die Human-Leukozyten-Antigene (HLA) von Spender und Empfänger identisch sind (Bertrand et al., 1999; Buckley et al., 1999; Antoine et al., 2003; Fischer et al., 2004; Grunebaum et al., 2006). Die erste allogene Knochenmarkstransplantation für SCID wurde 1968 durchgeführt (Gatti et al., 1968) und seitdem steigt die Zahl der Patienten, die sich einer hämatopoetischen Stammzell-Transplantation („Hematopoietic Stem Cell Transplantation“, HSCT) unterziehen, stetig an. Jedoch steht weniger als einem von drei Patienten ein HLA-identischer Spender zur Verfügung (Cavazzana-Calvo et al., 2004). Die Mortalitätsrate bei einer Knochenmarkstransplantation mit einem nicht identischen Spender liegt bei 20%-30% (Antoine et al., 2003; Cavazzana-Calvo et al. 2004).

Die Gentherapie mit hämatopoetischen Stammzellen stellt eine Alternative zur Knochenmarkstransplantation dar, da das therapeutische Gen vertikal in Zellen aller hämatopoetischen Linien weitervererbt wird. Knochenmark oder peripheres Blut kann entnommen, der Gentransfer *ex vivo* durchgeführt und die autologen Zellen anschließend

rücktransplantiert werden (Karlsson, 1991). Sowohl für verschiedene Formen des SCID als auch für CGD („Chronic Granulomatous Disease“) konnte der schwere immunologische Defekt in klinischen Gentherapiestudien durch den Transfer des therapeutischen Gens korrigiert werden (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Aiuti et al., 2002; Gaspar et al., 2004; Ott et al., 2006; Gaspar et al., 2006; Aiuti et al., 2009).

1.1.1 Septische Granulomatose (“Chronic Granulomatous Disease”, CGD)

Die septische Granulomatose ist eine seltene erbliche Immunerkrankung, die charakterisiert ist durch eine Störung der antimikrobiellen Aktivität myeloider Zellen (Curnutte et al., 1994; Segal, 2005). Zellen (z.B. Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und Eosinophile), die mithilfe der Phagozytose pathogene Mikroorganismen unschädlich machen können, sind nicht mehr in der Lage das für die Phagozytose benötigte Superoxid zu bilden. Die Störung der Phagozytose wird durch Mutationen in den Genen ausgelöst, die für die Untereinheiten (UE) des Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-(NADPH)-Oxidase Komplexes kodieren. Zur Bekämpfung und Abtötung eines Pathogens wird dieses phagozytotisch aufgenommen, der in der Phagosomen-Membran lokalisierte NADPH-Oxidase Komplex aktiviert und die Herstellung von Superoxid katalysiert. (Alberts et al., 2004; Janeway et al., 1997).

Die Aktivierung des NADPH-Oxidase Komplexes erfordert die Rekrutierung der vier zytosolischen Oxidase Komponenten $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$ und Rac2 an die Zellmembran und deren Interaktion mit dem Membranprotein Flavocytochrom b_{558} . Die nun funktionelle Oxidase bindet NADPH und produziert reaktive Sauerstoffspezies (Abo et al., 1991; Knaus et al., 1991; Roos et al., 2003; Cross et al., 2004). Das Membranprotein Flavocytochrom b_{558} besteht aus einer großen UE $gp91^{\text{phox}}$ (gp, Glykoprotein) und einer kleineren UE $p22^{\text{phox}}$. Mutationen der $phox$ -UE unterbinden die Zusammenlagerung der Oxidase-Komponenten mit dem Flavocytochrom b_{558} .

2/3 aller CGD-Patienten leiden an einer X-chromosomal gekoppelten rezessiven Erkrankung, die eine Mutation in der $gp91^{\text{phox}}$ UE aufweist (Qasim et al., 2009). Die drei weiteren bekannten CGD-Erkrankungen sind autosomal rezessiv und es liegen Mutationen in den Oxidase-Komponenten $p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$ und $p67^{\text{phox}}$ vor. Patienten, die eine Mutation in der $p40^{\text{phox}}$ UE tragen, sind bisher nicht bekannt (Winkelstein et al., 2000).

Konventionelle Behandlungen der CGD beinhalten die prophylaktische Einnahme von Antibiotika (Margolis et al., 1990), Antimykotika (Gallin et al., 2003) und Interferon gamma (Marciano et al., 2004), die zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten führen. Jedoch können diese Behandlungen die protektive Funktion der NADPH-Oxidase nicht vollständig wiederherstellen, so dass die jährliche Sterberate für die autosomal rezessiven Formen immer noch bei 2% und für die X-gekoppelten Formen bei 5% liegt (Winkelstein et al., 2000). Bereits 2 X-CGD Patienten in Deutschland und 2 X-CGD Patienten in der Schweiz konnten durch Gentherapie behandelt werden (Ott et al., 2006; Seger, 2008). Allerdings traten bei den in Deutschland behandelten Patienten vektorinduzierte Nebenwirkungen auf, die zu der Entwicklung eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) führten (Ott et al., 2006; Stein et al., 2010).

1.1.2 Schwerer kombinierter Immundefekt ausgelöst durch Adenosindesaminasemangel („Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“, ADA-SCID)

Die verschiedenen SCID-Formen sind seltene, monogenetische Erkrankungen, die Defekte in der zellulären und humoralen Immunabwehr aufweisen. 11 unterschiedliche Formen konnten identifiziert werden. Defekte in den Genen *Jak-3* („Janus Kinase-3“) (O’Shea et al., 2004), *IL7RA* („Interleukin 7 Receptor Alpha“) (Roifman et al., 2000), *RAG1* und *RAG2* („Recombination Activation Genes“), *Artemis* (Corneo et al., 2001), *CD3* (Dadi et al., 2003; De Saint et al., 2004; Rieux-Laucat et al., 2006), *CD45* (Kung et al., 2000), *ADA* („Adenosine Deaminase,“) (Hershfield et al., 2004), *DNA Ligase IV* (Gaspar et al., 2009), *DNA-PKcs* („DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit“) (Gaspar et al., 2009) und *Cernunnos/XLF* (Gaspar et al., 2009) führen zur autosomal rezessiven SCID-Form.

Die X-gekoppelte Form (X-SCID) ist charakterisiert durch eine gestörte Expression des Gens *IL2RG* („Interleukin-2 Receptor Common γ -Chain“), welches für die gemeinsame gamma Kette (γ c-Kette) der Rezeptoren für die Interleukine 2, 4, 7, 9, 15 und 21 kodiert (Puck 1999; Qasim et al. 2009). Ein Defekt der γ c-Kette führt zum Fehlen der T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, sowie zu einer Beeinträchtigung der B-Lymphozyten Funktion (Noguchi et al., 1993a; Noguchi et al., 1993b; Sugamura et al., 1996; Leonard, 1996; Leonard, 2001; White et al., 2000).

Ohne Behandlung führt diese schwere Immundefizienz zum Tod innerhalb eines Jahres (Cavazzana-Calvo et al., 2007). Die erste gentherapeutische Studie, die einen Langzeiterfolg zeigte, wurde an Kindern mit X-SCID durchgeführt. Allerdings kam es auch hier zu vektorinduzierten schwerwiegenden Nebenwirkungen, die zu der Entstehung einer akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) in 4 der insgesamt 9 erfolgreich behandelten Patienten führten (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003, Hacein-Bey-Abina et al., 2008).

Mutationen in dem Gen *ADA* gehören zu den häufigsten Ursachen eines autosomal rezessiven schweren kombinierten Immundefekts (Hirschhorn et al., 2006). ADA ist ein Enzym des Purinstoffwechsels und wird in allen Geweben des Körpers exprimiert. Es katalysiert den Abbau von Desoxyadenosin und Adenosin zu Desoxyinosin und Inosin (Hershfield et al., 1995). Das Fehlen von ADA führt zu einer intra- und extrazellulären Anreicherung von Desoxyadenosin und Adenosin (Qasim et al., 2009). Innerhalb der Zellen führt die Umwandlung des Desoxyadenosins zu Desoxyadenosintriphosphat (dATP) durch die Desoxycytidinkinase zu einem intrazellulären Anstieg des dATP Pools. Die Anreicherung von dATP und Desoxyadenosin im Plasma, lymphoiden Gewebe und in den roten Blutkörperchen schadet der Entwicklung und Funktion der Lymphozyten (Gaspar et al., 2009, Sauer et al., 2009).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Anreicherung von dATP zur Inhibierung der Ribonukleotid-Reduktase führt, welches für die DNA Replikation und Reparatur notwendig ist (Lee et al., 1984). Weiterhin wird durch das Anhäufen Apoptose in unreifen Thymozyten ausgelöst (Apasov et al., 2001) und durch die Interaktion mit der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) die V(D)J Rekombination und die Antigen-Rezeptor-Diversität verringert (Gangi-Peterson et al., 1999). Die Desoxyadenosin Akkumulation führt zur Inaktivierung der S-adenosylhomocystein-Hydrolase (SAHH) und somit zu einer Inhibierung von für die Lymphozyten-Aktivität wichtigen Transmethylierungs-Reaktionen (Benveniste et al., 1995). Eine Enzymersatztherapie mit PEG-ADA („Polyethylene Glycol-modified Adenosine Deaminase“) kann helfen, die toxischen Metaboliten abzubauen und die Lymphozyten-Entwicklung zu fördern. 20 ADA-SCID Patienten konnten bereits durch Gentherapie erfolgreich behandelt werden (Aiuti et al., 2002; Gaspar et al., 2006; Aiuti et al., 2009).

1.1.3 Das Wiskott-Aldrich Syndrom („Wiskott-Aldrich Syndrome“, WAS)

Das Wiskott-Aldrich Syndrom ist eine sehr komplexe Erkrankung charakterisiert durch Thrombozytopenie, Bildung von Ekzemen, Immundefizienz und einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer Autoimmunität und von Lymphomen (Bosticardo et al., 2009). Die Krankheit wird ausgelöst durch Mutationen in dem Gen für das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (*WASP*) und der daraus resultierenden fehlenden Expression. WAS-Patienten, die keiner Behandlung unterzogen werden, haben eine verringerte durchschnittliche Lebenserwartung von 15 Jahren (Imai et al., 2004; Ochs et al., 2006).

WASP bindet an den T-Zellrezeptor (TZR) und an die Moleküle CD28 und CD2 und ist bei der T-Zell Aktivierung und der Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts während der Bildung der immunologischen Synapse entscheidend beteiligt (Molina et al., 1993; Gallego et al., 1997; Snapper et al., 1998; Zhang et al., 1999; Badour et al., 2003; Badour et al., 2007). Die immunologische Synapse besteht aus einem inneren Aktivierungsbereich, cSMAC („central supramolecular activation cluster“), in dem sich der TZR, der akzessorische Rezeptor CD28, sowie die Protein Kinase C (PKC) anreichern und einem umliegenden Adhäsionsring, pSMAC („peripheral SMAC“), in dem LFA-1 („lymphocyte function-associated antigen 1“), CD2 sowie der Membrananker Talin lokalisiert sind. Rezeptoren mit einem großen extrazellulären Bereich, wie die Tyrosin-Phosphatase CD45, befinden sich in einem Bereich außerhalb des pSMACs, der als dSMAC („distal SMAC“) bezeichnet wird. Das Aktin-Zytoskelett wird bei einem APZ (antigen-präsentierende Zellen)-Kontakt an die Kontaktzone zwischen den Zellen verlagert (Grakoui et al., 1999). Um die laterale Beweglichkeit an der Plasmamembran zu gewährleisten, sind die rekrutierten Moleküle assoziiert mit spezifischen cholesterinreichen Mikrodomänen (sogenannte „lipid rafts“). Nach der Bindung an den TZR, wird WASP durch WIP („WAS/WASL Interacting Protein“) und NCK („NCK Adaptor Protein“) zu den Mikrodomänen rekrutiert und durch GTP-CDC42 („Cell Division Cycle 42“) aktiviert. Mutationen in *WASP* führen dazu, dass sich die immunologische Synapse nur nach sehr starker TZR Aktivierung bilden kann. Des Weiteren ist die Bildung der „lipid rafts“ und die Stabilität der immunologischen Synapse stark beeinträchtigt (Bosticardo et al., 2009). In neuesten Studien konnte gezeigt werden, dass WASP ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung der natürlichen T-Killerzellen (NKT) spielt. In WAS Patienten konnte eine starke Reduzierung an zirkulierenden NKT festgestellt werden (Locci et al., 2009).

Zurzeit stellt die Knochenmarkstransplantation neben der Gentherapie die einzige Möglichkeit dar, WAS-Patienten zu behandeln (Bosticardo et al., 2009). Steht ein HLA-identischer Spender zur Verfügung, so liegt die Überlebensrate einer Knochenmarkstransplantation bei über 80% (Kobayashi et al., 2006). Allerdings kann bei vielen Patienten ein HLA-identischer Spender nicht gefunden werden. Durch Transplantation autologer das Transgen *WASP* konstitutiv exprimierender hämatopoetischer Stammzellen wurden bereits 8 Patienten behandelt. Über einen Zeitraum von 2,5 Jahren konnte bei zwei Patienten eine stabile *WASP* Expression in lymphoiden und myeloiden Zellen detektiert werden (Boztug et al., 2006; Boztug et al, in Begutachtung bei NEJM 2010).

1.2 Somatische Gentherapie

Die Gentherapie ermöglicht die Behandlung von Erbkrankheiten bzw. Gendefekten durch das Einbringen von Genen in Zellen eines Individuums (Scollay, 2001). Dies kann zum Ersetzen des defekten Gens durch eine funktionsfähige Genkopie führen, die Gentherapie ermöglicht allerdings auch die gezielte Veränderung der behandelten Zelle (Anderson, 1984; Friedmann, 1992; Brown et al., 2006). Man unterscheidet zwischen somatischer Gentherapie und Keimbahngentherapie. Bei der somatischen Gentherapie wird das therapeutische Gen in die somatischen Zellen des Patienten eingebracht, die Veränderung hat daher keinen Einfluss auf die Nachkommen. Bei einer Keimbahngentherapie dagegen werden die genetischen Veränderungen an die Nachkommen des Individuums vererbt, da durch die Therapie die Keimzellen verändert werden. Da die Keimbahngentherapie derzeit immer noch sehr umstritten ist, wird bei der Korrektur von Erbkrankheiten die somatische Gentherapie angewendet (Fischer et al., 2008). Weitere Anwendungsgebiete stellen die Bekämpfung von Infektionskrankheiten (Bunnell et al., 1998) und die Krebstherapie (Gutierrez et al., 1992) dar.

1.2.1 Methoden des Gentransfers

Um einen langfristigen Erfolg der Gentherapie gewährleisten zu können, muss das therapeutische Gen effektiv in die Zielzellen eingebracht und stabil exprimiert werden. Es existieren verschiedene nicht-virale und virale Methoden, die das Einbringen des therapeutischen Gens in verschiedenste Zelltypen, Gewebe und Organe durch *ex vivo* und *in vivo* Strategien ermöglichen. Das Einbringen eines therapeutischen Gens über nicht-virale Methoden wird als Transfektion, das Einbringen mithilfe eines viralen Trägers als Transduktion bezeichnet. Bei der Verwendung

von nicht-viralen Trägern unterscheidet man zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Methoden. Die Transfektion durch Ultraschall (Taniyama et al., 2002), Laser (Zeira et al., 2003), Beschuss der Zielzelle mit DNA-beschichteten Wolfram- oder Goldpartikeln (Yang et al., 1990), magnetische Nanopartikel (Scherer et al., 2002), Mikroinjektion (Capecchi, 1980) oder Elektroporation (Potter et al., 1984; Baum et al., 1994; Bloquel et al., 2004) zählen zu den physikalischen Methoden. Bei der chemischen Transfektion wird das therapeutische Gen zusammen mit einer elektrisch geladenen Verbindung in die Zellen gegeben. Die elektrisch geladene Verbindung stört die Struktur der Zellmembran, wodurch die neue DNA ins Zellinnere gelangen kann. Zu den für die chemische Transfektion verwendbaren Molekülen zählen Kalzium-Phosphat (Graham et al., 1973), kationische Liposomen (Felgner et al., 1987; Kumar et al., 2003), Polykationen (DEAE-Dextran) (Lopata et al., 1984; Sussman et al., 1984) und Polymere (Clark et al., 1999). Bei der biologischen Transfektion werden DNA-Proteinkomplexe (Wagner et al., 1990; Kern et al., 1999) durch rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen. Obwohl die Verwendung von nicht-viralen Trägern einige Vorteile gegenüber der Verwendung viraler Träger aufweist, sind entscheidende Nachteile die geringere Effizienz dieser Methoden verglichen mit viralen Trägern, die angeborene Immunität und die überwiegend transiente Expression des therapeutischen Gens.

Bei dem viralen Transfer eines therapeutischen Gens werden viral abgeleitete replikationsdefiziente Vektoren verwendet. Hierbei kann man zwischen nicht-integrierenden und integrierenden Vektoren unterscheiden. Bei Verwendung der nicht-integrierenden Vektoren kommt es zu einer transienten, bei den integrierenden Vektoren durch Integration in das Genom der Wirtszelle dagegen zu einer stabilen Expression des Transgens. Bei den nicht-integrierenden Vektoren, die sich von Adenoviren, Herpes Simplex Viren (HSV), Ebolaviren, Alphaviren, Hepatitis Viren, Vacciniaviren, Polioviren und SV40 Viren ableiten, liegt die Vektor-DNA als episomale Form im Zellkern vor und geht daher durch Teilung der Wirtszelle verloren (Butler et al., 2002; Pierson et al., 2002). Im Gegensatz zu den rein nicht-integrierenden Vektoren, können von adenoassoziierten Viren (AAV) abgeleitete Vektoren sowohl als episomale Form vorliegen als auch in das Wirtsgenom integrieren (Duan et al., 1998; Miao et al., 1998; Nakai et al., 1999; Kay et al., 2001).

Integrierende Vektoren, die sich von der Familie der *Retroviridae* (Onkoretro-, Lenti- und Spumaviren) ableiten, ermöglichen eine stabile Expression des Transgens in der Wirtszelle (High, 1999; von Kalle et al., 1999; Ehrhardt et al., 2008). In den meisten klinischen Gentherapie-

Studien werden virale Vektoren verwendet, da sie, verglichen mit den nicht-viralen Trägern, einen effizienteren Transfer des therapeutischen Gens gewährleisten. Ein großer Nachteil der integrierenden Vektorsysteme stellt allerdings die Insertionsmutagenese dar, die durch die stabile Integration des Transgens in das Wirtsgenom auftreten kann.

1.2.2 Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen

Als Stammzellen werden allgemein Körperzellen bezeichnet, die sich in verschiedene Zelltypen oder Gewebe ausdifferenzieren können. Je nach Art der Stammzelle und ihrer Beeinflussung haben sie das Potential, sich in jegliches Gewebe (embryonale Stammzellen) oder in bestimmte festgelegte Gewebetypen (adulte Stammzellen) zu entwickeln.

Es existieren mittlerweile eine Reihe von Eigenschaften, die speziell Stammzellen zugeschrieben werden, darunter die extensive Selbsterneuerungskapazität, die Fähigkeit der asymmetrischen Zellteilung, das Vorliegen der Zellen in einer mitotischen „Ruhephase“ und die Differenzierung in die verschiedenen Zelltypen, die das jeweilige Gewebe bilden (Hall et al., 1989; Potten et al., 1990). Nicht jede Stammzelle besitzt alle diese Eigenschaften, so gibt es Hinweise, dass bei Säugetieren sich die Stammzellen symmetrisch teilen (Morrison et al., 1997) und die murinen hämatopoetischen Stammzellen beispielsweise nur begrenzte Selbsterneuerungskapazität aufweisen (Morrison et al., 1994). Durch verschiedenste Untersuchungen, wie *in vivo* Markierungsexperimente, anatomische Studien und *in vitro* Experimente, konnte die Existenz von Stammzellen im Darm (Potten et al., 1990), in den Keimdrüsen (Dym, 1994), in der Haut (Lavker et al., 1993) und im olfaktorischen Epithelium (Monti Graziadei et al., 1979) nachgewiesen werden.

Die Theorie einer Krebs- oder Tumorstammzelle geht auf die Experimente der beiden Forscher Dominique Bonnet und John Dick zurück. Die Transplantation von Zellen aus Patienten mit akuter myeloider Leukämie (AML) in immuninkompetente Mäuse ergab, dass nur wenige der Tumorzellen in den Mäusen Krebs auslösen konnten (Bonnet et al., 1997). Dies lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass die Tumorzellen, die man bisher als homogene Menge ansah, eine Heterogenität aufweisen und sich die Zellen in ihrem Erneuerungspotential erheblich unterscheiden (Dick, 2008; Dick, 2009). Das Hierarchie-Modell der Tumorentstehung geht davon aus, dass nur wenige Zellen innerhalb eines Tumors, die sogenannten Krebs- oder Tumorstammzellen, die Eigenschaften von Stammzellen wie Selbsterneuerungskapazität und

Differenzierungspotential aufweisen und für das Tumorwachstum verantwortlich sind (Dick, 2008; Dick, 2009). Weiterhin wird vermutet, dass diese Zellen gegen manche Krebstherapien resistent sind und zu Rückfällen und der Entstehung von Metastasen führen können (Dick, 2008; Dick, 2009).

Induzierte pluripotente Stammzellen („induced Pluripotent Stem Cells“, iPS) können durch künstliche Reprogrammierung nicht pluripotenter somatischer Zellen generiert werden. Yamanaka und Kollegen konnten erstmals 2006/2007 Mausfibroblasten durch Transduktion mit retroviralen Vektoren, die die Gene *Oct-3/4* („Octamer-3/4“), *SOX2* („SRY-Box Containing Gene 2“), *c-Myc* („Cellular Myelocytomatosis Oncogene“) und *Klf4* („Kruppel-like Factor 4“) exprimieren, in iPS umwandeln (Takahashi et al., 2006; Okita et al., 2007; Maherali et al., 2007; Wernig et al., 2007). Im Jahre 2007/2008 gelang es unabhängig voneinander mehreren Arbeitsgruppen, iPS aus menschlichen Körperzellen zu erzeugen (Yu et al., 2007; Takahashi et al., 2008; Park et al., 2008). iPS haben ein hohes medizinisches Potential, da die Forschung an ihnen weniger ethische Probleme mit sich zieht als die Verwendung embryonaler Stammzellen.

Hämatopoetische Stammzellen („Hematopoietic Stem Cells“, HSC) konnten erstmals durch Verwendung von Antikörpern gegen Oberflächenantigene isoliert (Spangrude et al., 1988) und deren Eigenschaften durch Transplantationsexperimente in letal bestrahlte Wirtstiere nachgewiesen werden. Hierfür wurden Bedingungen verwendet, bei denen die Nachkommen einer einzelnen Stammzelle identifiziert werden können („clonogenic assays“, Morrison et al., 1994). Des Weiteren konnte das Selbsterneuerungspotential dieser Stammzellen durch serielle Transplantationen in sekundäre Tiere demonstriert werden (Morrison et al., 1997). HSC können aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut und dem Nabelschnurblut gewonnen werden und sind in der Lage die gesamten Zellen des Blutes und des Abwehrsystems zu bilden (Hämatopoese, **Abbildung 1.1**). Aufgrund der Pluripotenz, der guten Isolierbarkeit und der Möglichkeit *ex vivo* veränderte HSC wieder zurück in den Patienten zu transplantieren, stellen sie gute Zielzellen für die Gentherapie primärer humaner Immundefizienzen dar (Reya et al., 2001).

Um die stabile Expression des Transgens bei der Gentherapie zu gewährleisten, werden vorwiegend virale integrierende Vektorsysteme verwendet. Die onkoretroviralen Vektoren stellen die zurzeit am häufigsten verwendeten Vektorsysteme dar (Nathwani et al., 2005; Flotte, 2007). Da onkoretrovirale Vektoren nur in den Zellkern sich teilender Zellen eindringen können, müssen sich nicht teilende Zellen vor der Transduktion durch Kultivierung in Anwesenheit von

Zytokinen zur Zellteilung angeregt werden (Roe et al., 1993; Nolta et al., 1995). Eine Optimierung des onkoretroviralen Gentransfers kann erreicht werden durch die Verwendung verschiedener Zytokinkombinationen, die die Kultivierung und das Expandieren HSC ermöglichen ohne jedoch die Selbsterneuerungskapazität und die Pluripotenz dieser Zellen zu beeinflussen (Bhatia et al., 1997; Blundell et al., 1999; Ahmed et al., 2004). Zur Verbesserung der Stammzell-Kultivierung, Anregung der Zellteilung und somit Steigerung der retroviralen Transduktionseffizienz wurden bereits verschiedenen Faktoren wie SCF („Stem Cell Factor“), Interleukin 3 und 6 (IL-3, IL-6), Flt-3L („Flt-3 Ligand“) und Thrombopoetin verwendet (Bhatia et al., 1997; Conneally et al., 1997; Conneally et al., 1998; Demaison et al., 2000, Cavazzana-Calvo et al., 2000; Gaspar et al., 2004). Immer größere Aufmerksamkeit wird allerdings den lentiviralen Vektoren gewidmet, da sie auch sie nicht teilende Zellen transduzieren und somit zumindest einen Teil der Probleme, die mit retroviralen Vektorsysteme auftreten, umgehen können (Case et al., 1999; Miyoshi et al., 1999).

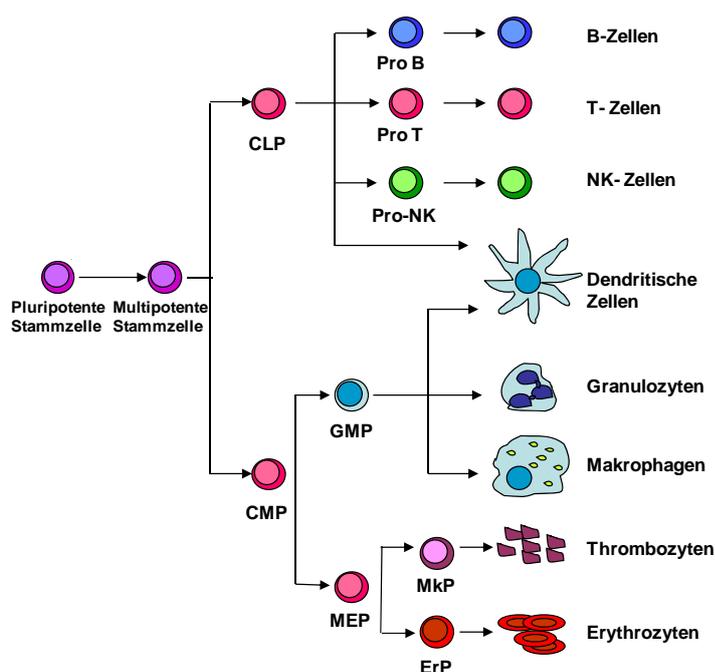


Abbildung 1.1: Die humane Hämatopoese. Pluripotente hämatopoetische Stammzellen bringen multipotente Vorläuferzellen hervor, die wiederum zur Bildung einer gemeinsamen lymphoiden (CLP) und einer gemeinsamen myeloiden Progenitorzelle (CMP) führen. Aus der lymphoiden Vorläuferzelle gehen B-, T-, und NK-Zellen hervor. Aus der myeloiden Vorläuferzelle bildet sich eine Granulozyten/Makrophagen Progenitorzelle (GMP) und eine Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitorzelle (MEP). Die GMP bringt wiederum dendritische Zellen, Granulozyten und Makrophagen, die MEP Thrombozyten und Erythrozyten hervor. CLP, „Common Lymphoid Progenitor“; CMP, „Common Myeloid Progenitor“; GMP, „Granulocytes/Macrophages Precursor“, MEP, „Megakaryocytes/Erythrocytes Precursor“; Mkp, „Megakaryocytes Precursor“; Erp, „Erythrocytes Precursor“; NK-Zellen, Natürliche Killerzellen. Modifiziert aus Reya et al., 2001.

1.2.3 Integrierende retrovirale Vektorsysteme der Gentherapie

Die Familie der Retroviridae

Retroviren bzw. Reverse Transkriptase Onkoviren sind eine große Familie behüllter Viren, die tierische Zellen infizieren. Sie zählen zu den Einzelstrang-RNA-Viren, da ihre Erbinformation als RNA vorliegt. Die aktuelle Taxonomie unterteilt die Retroviren in zwei Unterfamilien und sieben Gattungen. Der Unterfamilie der Orthoretroviren gehören die Gattungen α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren (Onkoretroviren) und Lentiviren an. Der Unterfamilie der Spumaretroviren gehört die Gattung Foamyviren (Spumaviren) an (Coffin et al., 1997; Modrow et al., 1997, Jern et al., 2005, Weiss, 2006).

Infektiöse Retroviruspartikel besitzen ein Kapsid, das von einer Virushülle umgeben ist, sowie einen „Kern“ innerhalb des Kapsids (Nukleokapsid) bestehend aus Proteinen und einem Ribonukleinsäurekomplex. Das einzelsträngige positivstrang-orientierte RNA-Genom ist linear, weist eine 5'-Cap-Struktur und eine 3'-Polyadenylierung auf und liegt diploid vor. Die Übersetzung der einzelsträngigen RNA-Moleküle in doppelsträngige DNA erfolgt nach dem Eintritt in die Wirtszelle im Zuge der reversen Transkription durch wirtseigene Transkriptions-Enzyme und mit Hilfe einer spezifischen zellulären tRNA (Baltimore, 1970; Termin et al., 1970). Die doppelsträngige DNA integriert anschließend stabil in das Wirtsgenom.

Das integrierte virale Genom wird flankiert von zwei identischen langen terminalen Wiederholungen („Long Terminal Repeat“, LTR), die während der reversen Transkription gebildet werden und eine wichtige Rolle bei der Integration spielen. Die LTRs sind aus drei Abschnitten aufgebaut: U3 („Unique“, U); R („Redundant“) und U5. Die U3-Region steuert die Expression des proviralen Genoms und enthält daher Promoter- und Verstärkerelemente. Das provirale Genom enthält die drei Gene *gag*, *pol* und *env*. *gag* kodiert die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, *pol* die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase (RT) und Integrase und *env* kodiert die Proteine der Hülle (**Abbildung 1.2**). Komplexe Retroviren besitzen darüber hinaus noch weitere regulatorische Gene, die als akzessorische Gene bezeichnet werden (Greene et al., 1990; Cullen, 1992; Lee et al., 1993).

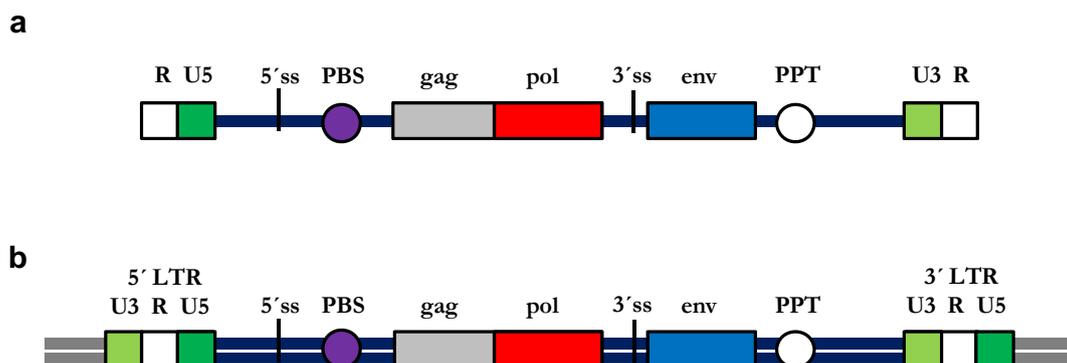


Abbildung 1.2: Aufbau des retroviralen Vektors vor und nach Integration in das Wirtsgenom. (a) Naiver retroviraler Vektor vor der Integration. Die virale RNA beginnt am 5'-Ende mit einer R („Redundant“) und einer U5 (U, „Unique“) Region. Nach der Primerbindestelle (PBS) folgen die Strukturgene *gag*, *pol* und *env*. Am 3'-Ende befindet sich der Polypurintrakt (PPT), eine U3-Region und ebenfalls ein R-Abschnitt. (b) Naiver retroviraler Vektor nach der Integration. Die doppelsträngige DNA enthält nun zwei Sequenzabfolgen (LTR) an beiden Enden, die sich aus den Abschnitten U3, R und U5 zusammensetzen. R, „Redundant“; U, „Unique“; ss, Spleißstelle; PBS, Primerbindestelle; PPT, Polypurintrakt; LTR, „Long Terminal Repeat“. Modifiziert aus <http://www.bioinf.uni-leipzig.de>.

An regulatorischen Sequenzen gibt es im 5'-Bereich eine mit ψ (ψ) bezeichnete Sequenz, die ein Signal für das Verpacken der RNA in die Viruspartikel darstellt und eine Primerbindungsstelle (PBS), an die sich die tRNA anlagern und die reverse Transkription initiieren kann. Im 3'-Bereich findet sich der Polypurintrakt (PPT), dieser spielt ebenfalls eine essentielle Rolle bei der reversen Transkription, da er für die Initiation der Synthese des DNA-Zweitstranges wichtig ist.

Der Lebenszyklus eines Retrovirus besteht aus den Schritten: Infektion der Zelle durch Adsorption an die Zellmembran und Eindringen des Nukleokapsids in die Zelle, reverse Transkription, Passieren der Kernhülle, Integration in das Wirtsgenom, Expression der proviralen Gene, Bildung neuer Viruspartikel, deren Verpackung und Ausknospung (**Abbildung 1.3**). Bei der reversen Transkription wird zunächst eine retrovirus-spezifische zelluläre tRNA an die PBS gebunden und von dieser aus ein zur U5- und R-Region komplementärer Strang gebildet. Es folgt der Abbau der U5- und R-Region durch die RNaseH. Im nächsten Schritt hybridisiert das DNA-Fragment mit der R-Region an der 3'-Flanke. Der DNA-Strang wird am 3'-Ende verlängert und der größte Teil der viralen RNA wird durch die RNaseH abgebaut. Am PPT wird ein zweiter DNA-Strang ausgehend von der verbliebenen viralen RNA gebildet und anschließend die tRNA und die restliche virale RNA durch die RNaseH ebenfalls abgebaut. Danach hybridisiert die PBS des ersten Stranges mit der PBS des zweiten Stranges und beide Stränge werden vervollständigt.

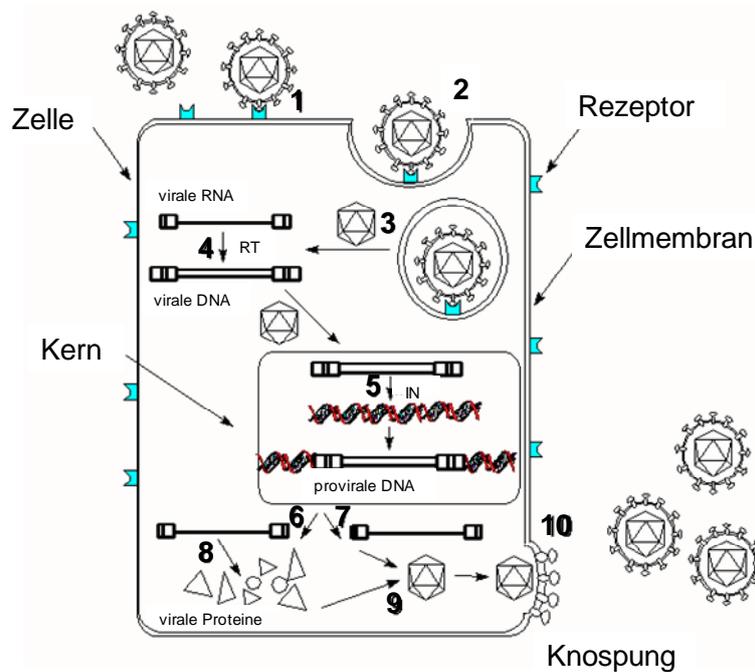


Abbildung 1.3: Retroviraler Lebenszyklus. Der Adsorption an der Zellmembran (1) folgt das Eindringen des Nukleokapsids in die Zelle (2). Dort wird die virale RNA mittels der reversen Transkription in DNA umgeschrieben (3+4). Nach der Integration der DNA in das Wirtsgenom (5), erfolgt die Transkription und Translation der Virusproteine (6-8). Anschließend werden neue Viruspartikel gebildet (9) und diese via Knospung freigesetzt (10). RT, reverse Transkription; IN, Integration. Modifiziert aus <http://www.bioinf.uni-leipzig.de>.

Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren dienen in der klinischen Gentherapie als „Transportvehikel“, die den stabilen Transfer des therapeutischen Gens in die Zielzelle und die Integration des Vektors in das zelluläre Genom ermöglichen. Durch die weitgehende Deletion der Gene *gag*, *pol* und *env* entstehen replikationsdefiziente Vektoren, so dass nach einmaliger Infektion der Zielzellen die Replikation des Vektors ausgeschlossen werden kann.

In klinischen Gentherapiestudien werden ausschließlich replikationsdefiziente Vektoren verwendet, um eine Weiterverbreitung des Vektors zu verhindern. Die deletierten Strukturgene werden durch ein Marker- bzw. therapeutisches Gen ersetzt (Miller et al., 1989). Zur Herstellung der rekombinanten Retroviren können sogenannte Verpackungszelllinien verwendet werden. Diese stellen die retroviralen Proteine, die zur Bildung der Viruspartikel benötigt werden, zur Verfügung. Der retrovirale Vektor enthält das Transgen, das Verpackungssignal ψ (psi), die PBS und den 5'- bzw. 3'-LTR. Da trotz der Deletion der Strukturgene die Möglichkeit einer Rekombination während der Vektorproduktion besteht, wird bei den neueren Generationen der retroviralen Vektoren eine getrennte Transfektion der Gene *gag-pol* und *env* in die Verpackungszelllinie durchgeführt (Danos et al., 1988). Weiterhin gibt es mittlerweile sogenannte

selbst-inaktivierende (SIN)-Vektoren, bei denen die U3-Region deletiert wurde. Durch die Deletion der Promoter- und Verstärkerelemente wird das Risiko einer insertionellen Mutagenese minimiert (Zufferey et al., 1998). Die Expression des Transgens wird in diesem Fall über einen internen Promoter reguliert.

1.3 Historie der klinischen Gentherapie

Die erste klinische Genmarkierungsstudie wurde im Jahre 1989 durchgeführt, in der Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) mit einem retroviralen Vektor transduziert wurden, der ein Neomycin-Resistenzgen trägt. Anschließend wurde eine Infusion dieser Zellen in 5 Patienten mit einem metastasierenden Melanom vorgenommen. Bei keinem der behandelten Patienten traten Nebenwirkungen aufgrund der Gentherapie auf, die genveränderten TIL konnten 3 Wochen bis 6 Monate nach Therapie nachgewiesen werden und Zugabe von Neomycin bestätigte die Expression des Transgens und die damit verbundene Neomycin-Resistenz dieser Zellen (Rosenberg et al., 1990).

Ein Jahr später, 1990 wurde die erste klinische Gentherapiestudie an zwei Kindern durchgeführt, die an der seltenen Immundefizienz ADA-SCID erkrankt waren. Die T-Lymphozyten dieser Kinder wurden *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor transduziert, der das therapeutische Gen *ADA* trug und anschließend den Patienten rücktransplantiert (Blaese et al., 1995). In einer Langzeitbeobachtung (> 10 Jahre) konnten in Patient 1 20% genmodifizierte T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Bei Patient 2 dagegen betrug der Anteil an genkorrigierten T-Zellen lediglich 0,1% und es konnte keine Expression des Transgens detektiert werden (Muul et al., 2003). Aufgrund einer geringen Transduktionseffizienz, einer niedrigen Anzahl an genkorrigierten transplantierten Zellen, dem fehlenden Selektionsvorteil der genkorrigierten Zellen und der fehlenden Expression des Transgens in Patient 2 wurde bei beiden Patienten weiterhin eine Enzyersatztherapie mit PEG-ADA durchgeführt.

Seit der ersten klinischen Gentherapiestudie im Jahre 1990 bis heute (Stand Dezember 2009) wurden mehr als 1500 klinische Studien in 28 verschiedenen Ländern durchgeführt. Die meisten dieser Studien befinden sich in der klinischen Phase I/II. In 23,9% der Studien wurden adenovirale Vektoren und in 20,8% retrovirale Vektoren (1,2% HIV-basierende lentivirale Vektoren) verwendet. In 64,5% der Fälle werden Krebserkrankungen therapiert, bei 7,9% der Gentherapiestudien handelt es sich um die Behandlung monogenetischer Erkrankungen. Weitere

Erkrankungen, die mithilfe der Gentherapie behandelt werden, stellen unter anderem kardiovaskuläre Erkrankungen (8,7%), Infektionskrankheiten (8%), neurologische Erkrankungen (1,9%) und Erkrankungen der Augen (1,1%) dar (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

Im Jahre 2000 wurde von der ersten (onkoretroviralen) Gentherapiestudie mit einem Langzeiterfolg berichtet (Cavazzana-Calvo et al., 2000). In dieser Studie wurde die X-chromosomale Form des schweren kombinierten Immundefektes (X-SCID) therapiert. Autologe CD34+ Zellen wurden nach *ex vivo* Transduktion mit einem das γ c-Transgen exprimierenden retroviralen Vektor den Patienten rücktransplantiert. Bei 9 von 10 behandelten Patienten war die Gentherapie erfolgreich (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). In einer englischen Gentherapiestudie konnte in 10 X-SCID Patienten ebenfalls eine Korrektur der Lymphopoese erreicht werden (Gaspar et al., 2004). Bei beiden X-SCID Gentherapiestudien wurden Kinder therapiert. Der Versuch, X-SCID in zwei älteren Patienten gentherapeutisch zu behandeln, blieb erfolglos. Zwei Patienten im Alter von 15 und 20 Jahren wurden nach erfolgloser HSCT einer Gentherapie unterzogen. Trotz erfolgreicher *ex vivo* Transduktion und anschließender Transplantation der CD34+ Zellen konnte eine Rekonstruktion des lymphopoetischen Systems nicht erreicht werden (Thrasher et al., 2005).

Gaspar et al. und Aiuti et al. konnten mittlerweile von der erfolgreichen Langzeitkorrektur des Immunsystems in ADA-SCID Patienten berichten (Aiuti et al., 2002; Gaspar et al., 2006; Aiuti et al., 2007; Aiuti et al., 2009). 2006 konnte erstmals eine erfolgreiche Rekonstitution des myeloiden Systems in zwei erwachsenen X-CGD Patienten erreicht werden (Ott et al., 2006). Die Patienten wurden nach Konditionierung mit Busulfan einer autologen Transplantation unterzogen. Vorab wurden CD34+ Zellen mit einem retroviralen Vektor transduziert, der das therapeutische Gen *gp91phox* trägt. Nach der Gentherapie bildeten sich bestehende Infektionsherde nachweislich zurück. Ebenfalls erfolgreich konnten zwei Patienten, die unter dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) leiden, durch Behandlung mit einem retroviralen Vektor, der das *WASP* Transgen exprimiert, therapiert werden (Boztug et al., in Begutachtung bei NEJM 2010).

Effiziente und therapeutisch relevante Ergebnisse unter der Verwendung von SIN LTR Vektoren konnten bereits im präklinischen Modell erzielt werden. Diese SIN Vektoren weisen eine Deletion der U3-Region auf und tragen einen internen Promoter, der die Expression des Transgens reguliert. Dupré und Kollegen konnten zeigen, dass die Transduktion von T-Zellen unter Verwendung eines *WASP* kodierenden SIN lentiviralen Vektors zur Korrektur der durch

WAS verursachten Defekte führte (Dupré et al., 2004). Die *ex vivo* Gentherapie mit einem SIN lentiviralen Vektor, der das Gen *ADA* kodiert, konnte die metabolischen Defekte und die damit verbundene Immundefizienz der ADA^{-/-} Mäuse korrigieren (Mortellaro et al., 2006).

Eine Korrektur der X-chromosomal gekoppelten Adrenoleukodystrophie (X-ALD) konnte in der ersten lentiviralen klinischen Gentherapiestudie, initiiert 2006, erreicht werden. Hierfür wurden zwei siebenjährigen Patienten hämatopoetische Vorläuferzellen entnommen, *ex vivo* transduziert und in die Patienten reinfundiert. Die Gentherapie führte zu einer Expression des funktionsfähigen ALD Transgens und zur Korrektur der Erkrankung (Cartier-Lacave et al., 2009).

1.4 Risiken und Nebenwirkungen des retroviralen Gentransfers

Durch Verwendung der integrierenden gammaretroviralen Vektoren konnten verschiedene primäre humane Immundefizienzen erfolgreich therapiert werden (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Aiuti et al., 2002; Gaspar et al., 2004; Gaspar et al., 2006; Ott et al., 2006; Aiuti et al., 2007; Aiuti et al., 2009; Boztug et al., in Begutachtung bei NEJM 2010). Der Gentransfer mittels retroviralen Vektoren birgt allerdings auch Risiken. Durch die Integration des Vektors in das Wirtsgenom kommt es zur Veränderung der Basenabfolge und daher besteht die Gefahr einer Insertionsmutagenese. Eine Insertionsmutagenese muss nicht zwingend zu klinischen Nebenwirkungen führen.

Ursprünglich wurde die Gefahr einer Insertionsmutagenese infolge der monoallelischen Integration als niedrig eingestuft (Moolten et al., 1992; Stocking et al., 1993), doch kam es mittlerweile sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien zu schweren Nebenwirkungen. Die Integration des Vektors kann zu einer Überexpression oder aber zu einer Inaktivierung des betroffenen Gens führen. Durch Aktivierung von Protoonkogenen, der damit verbundenen klonalen Selektion der betroffenen Zellen und der Anhäufung zusätzlicher Mutationen traten bei Patienten zweier X-SCID Gentherapiestudien und einer X-CGD Gentherapiestudie Leukämien und ein MDS auf (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008; Stein et al., 2010).

Daher ist die genaue Analyse retroviraler Integrationsstellen zur Abschätzung der Vektorsicherheit von großer Bedeutung. Einerseits können im präklinischen Modell potentiell toxische Effekte eines Vektors (z.B. wachstumsförderndes Transgen, starker Promoter), aber auch die Risiken spezifischer Vektor-Zielzellkombinationen bestimmt werden (Modlich et al., 2005; Modlich et al., 2006; Montini et al., 2006; Modlich et al., 2008; Montini et al., 2009).

Andererseits können im klinischen Verlauf frühzeitig klonale Verschiebungen und prä-maligne Entwicklungen erkannt und zeitnah geeignete Gegenmaßnahmen (z. B. Transplantation) ergriffen werden.

1.4.1 Methoden der Integrationsstellenanalyse

Die ligationsmedierte PCR (LM-PCR), die Inverse PCR und die lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR) ermöglichen die Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge nach erfolgter Integration und somit die Analyse retroviraler Integrationsstellen. Die LM-PCR wurde erstmals 1989 von Mueller et al. und Pfeifer et al., die Inverse PCR von Silver und Kollegen beschrieben (Mueller et al., 1989; Pfeifer et al., 1989; Silver et al., 1989). Die sehr sensitive LAM-PCR wurde in unserem Labor etabliert und ermöglichte erstmals die Analyse der Integrationsstellen bis auf Einzelzellniveau (Schmidt et al., 2001; Schmidt et al., 2007; Schmidt et al., 2009) (**Abbildung 1.4**). Erst durch die vollständige Sequenzierung des humanen und murinen Genoms wurde die potentiell genomweite Bestimmung der Integrationsstellen im Wirtsgenom durchführbar (Lander et al., 2001; Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Bovee et al., 2008).

Die Kombination der PCR-basierenden Methoden zur Integrationsstellenanalyse mit der Hochdurchsatz-Sequenzierung (Sanger Sequenzierung, „Next Generation Sequencing Technologies“) ermöglicht es potentiell, dominante Klone und (prä)maligne Entwicklungen frühzeitig zu detektieren (Ott et al., 2006; Wang et al., 2008). Sowohl bei den weniger sensitiven LM-PCR und Inversen PCR als auch bei der LAM-PCR werden Restriktionsenzyme zur Fragmentierung der DNA verwendet. Da die kompetitive Amplifikation wesentlich effizienter für kurze DNA Fragmente (wenige 100bp) stattfindet, kann es durch die Verwendung von Restriktionsenzymen zu einer ungleichmäßigen Darstellung des klonalen Integrations-Repertoires einer transduzierten Probe kommen (Harkey et al., 2007; Wang et al., 2008; Gabriel et al., 2009). So können längere Fragmente (z.B. >300bp in einer polyklonalen Probe) nur schwach oder gar nicht amplifiziert werden, und somit können die jeweiligen Integrationsstellen auch nicht detektiert werden. Die genaue Bestimmung dieser limitierenden Faktoren und die Etablierung einer nicht-restriktiven Methode sind Bestandteil dieser Arbeit.

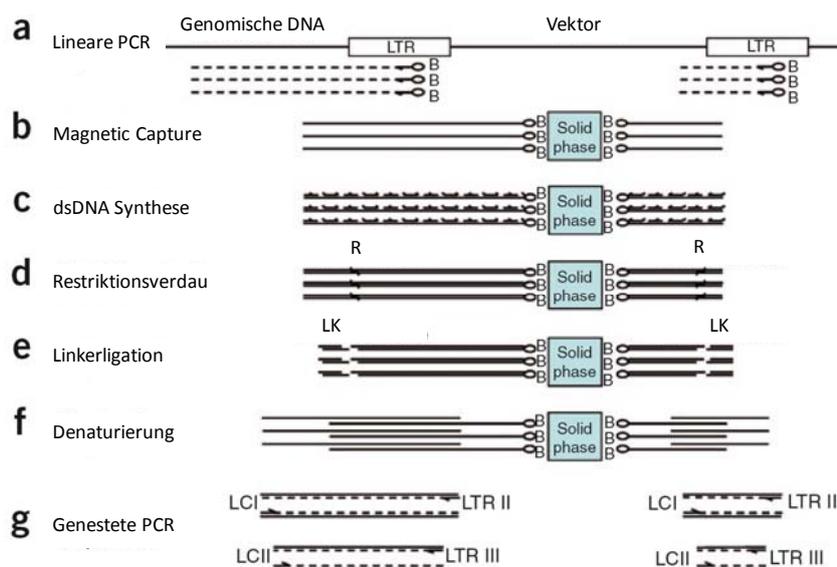


Abbildung 1.4: Lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR). Nach der linearen Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge mit biotinylierten Primern (a) werden die Fragmente an „Beads“ gebunden (b). Dort erfolgen dann der Aufbau des zweiten DNA-Stranges (c), das Fragmentieren der DNA mithilfe von Restriktionsenzymen (d) und die Ligation einer Linkerkassette (e). Nach dem Ablösen von den „Beads“ (f), werden die Fragmente exponentiell amplifiziert (g). LTR, „Long Terminal Repeat“; ds, doppelsträngig; LK, Linkerkassette; R, Restriktionsschnittstelle; LCI + LCII, Linkerkassetten-Primer; LTRII + LTRIII, LTR-Primer; „Solid phase“, „Streptavidin-Beads“. Modifiziert aus Schmidt et al., 2007.

1.4.2 Integrationsstellenverteilung retroviraler Vektoren

Die Analyse der Integrationsstellenverteilung und der Einfluss des integrierenden Vektors auf das Wirtsgenom sind von großer Bedeutung für die Sicherheitsbestimmung und klinische Anwendung dieser Vektoren. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen des Integrationsmusters retroviraler Vektoren lieferten Hinweise, dass die Integration weniger zufällig verläuft als zunächst angenommen (Schroeder et al., 2002; Wu et al., 2003; Mitchell et al., 2004, Deichmann et al., 2007; Schwarzwaelder et al., 2007).

Wu et al. konnte zeigen, dass MLV („Murine Leukemia Virus“) basierende Vektoren eine starke Präferenz für die Integration in Promoter- und genkodierende Bereiche aufweisen. Integrationsstellen treten bevorzugt in einem 5-10 kb Fenster um die Transkriptionsstartstelle (TSS) auf (Wu et al., 2003, Hematti et al., 2004). HIV („Human Immunodeficiency Virus“) basierende Vektoren integrieren ebenfalls verstärkt in genkodierende Bereiche, allerdings über die gesamte Länge des Gens und nicht bevorzugt in der Nähe der TSS. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass ~70% der Integrationen durch HIV basierende Vektoren in genkodierenden Regionen stattfindet (Schroeder et al., 2002). Diese Präferenz ist signifikant, da man bei einer zufälligen Verteilung nur 30% der Integrationen in genkodierenden Bereichen erwarten würde. Es konnte ebenfalls eine verstärkte Integration MLV basierender Vektoren in

der Nähe von DNase I hypersensitiven DNA Regionen (Lewinski et al., 2006) und in der Nähe von CpG Inseln (Mitchell et al., 2004) detektiert werden. Felice et al. konnte zeigen, dass die Integration gammaretroviraler MLV basierender Vektoren im Gegensatz zu lentiviralen HIV basierenden Vektoren bevorzugt in der Nähe von Transkriptionsfaktor (TF) Bindungsstellen stattfindet. Dies weist darauf hin, dass TF möglicherweise an den LTR binden und gemeinsam mit der Integrase die Integration in regulatorische Regionen steuern (Felice et al., 2009).

In weiteren Untersuchungen konnte sowohl für MLV als auch für HIV basierende Vektoren ein zelltyp-spezifisches Integrationsmuster beobachtet werden. Dies wurde auf Unterschiede in der Genexpression der verschiedenen Zellarten zurückgeführt (Laufs et al., 2003; Glimm et al., 2005; Ott et al., 2006; Recchia et al., 2006; Aiuti et al., 2007; Cattoglio et al., 2007; Deichmann et al., 2007; Schwarzwaelder et al., 2007). Im Gegensatz zu MLV und HIV weisen retrovirale ASLV („Avian Sarcoma Leukemia Virus“) basierende Vektoren eine nahezu zufällige Integration in das Wirtsgenom auf, ohne Präferenz für den TSS oder für genkodierende Bereiche (Mitchell et al., 2004; Hu et al., 2007).

1.4.3 Nebenwirkungen in präklinischen und klinischen Gentherapiestudien

Mögliche Konsequenzen der Vektorintegration für einzelne Zellen, Gewebe und Organe sind abhängig von den Eigenschaften des verwendeten Vektors, der Vektorkopienzahl pro Zelle, dem Zelltyp und der verwendeten Zellzahl, dem Anwachsen und der Proliferation der transduzierten Zellen in der krankheitsspezifischen Umgebung (Baum et al., 2004). Präklinische Modelle helfen dabei das Risiko eines Vektors vor Verwendung in der klinischen Gentherapie abzuschätzen.

Bereits in verschiedenen Zellkulturstudien wurde gezeigt, dass die Insertionsmutagenese zur Immortalisierung individueller Klone führen kann (Du et al., 2005). Das Auftreten von Nebenwirkungen *in vivo* wurde erstmals 2002 im murinen Modell beschrieben (Li et al., 2002). HSC wurden mit einem onkoretroviralen Vektor transduziert, der das Transgen *dLNGFR* („Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor“) exprimierte und anschließend in bestrahlte Mäuse transplantiert. Die serielle Transplantation der *dLNGFR* exprimierenden Zellen führte zu der unkontrollierten Proliferation einer HSC, die eine Integration in dem Protoonkogen *EVI1* („Ecotropic Viral Integration Site 1“) aufwies.

In einer weiteren murinen retroviralen Gentherapiestudie konnte gezeigt werden, dass die retrovirale Integration in der Nähe bestimmter Gene zu deren Überexpression führt und die Expansion dieser Klone steuern kann. Die genaue Analyse der dominanten Integrationsstellen ergab, dass alle betroffenen Gene eine Rolle bei der Selbsterneuerung oder der Aktivität von HSC spielen (Kustikova et al., 2005). Das Auftreten von Leukämien nach Gentransfer mit einem *MDR1* („Multidrug Resistance 1“) kodierenden retroviralen Vektor konnte zum einen auf die Expansion einzelner Klone mit Integrationen in bekannten Protoonkogenen als auch auf die hohe Vektordosis zurückgeführt werden (Modlich et al., 2005).

In einem nichthumanen Primatenmodell konnte nach Transplantation von CD34+ Zellen, die mit einem MLV basierenden Vektor transduziert wurden, eine erhöhte Frequenz an Integrationen in dem *MDS1*- („Myelodysplastic Syndrome 1“) *EVI1* und *PRDM16* („PR Domain Containing 16“) Genlokus detektiert werden. Obwohl Zellklone, die Integrationen in einem der Gene aufwiesen, einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Klonen zeigten, konnte keine abnormale Proliferation der betroffenen Zellklone beobachtet werden (Calmels et al., 2005). In einem weiteren nichthumanen Primatenmodell entwickelte eines der Tiere 5 Jahre nach Gentherapie eine akute myeloide Leukämie. Die Tumorzellen des Tieres trugen eine Vektorintegration in dem Gen *Bcl2-A1* („Bcl2 Related Protein A1“), das antiapoptotische Eigenschaften aufweist und assoziiert wird mit einer schlechten Prognose in akuter myeloider Leukämie. Eine weitere Vektorintegration konnte mehr als 20 kb entfernt von dem Gen *Cdm92* gefunden werden (Seggewiss et al., 2006).

Nebenwirkungen bei der Verwendung lentiviraler Vektoren wurden bisher nur im Zusammenhang mit der konstitutiven Expression des therapeutischen Gens *IL2RG* beschrieben. Sehr umstritten war hierbei der Einfluss des wachstumsvermittelnden Transgens bei der Entstehung von T-Zelllymphomen im murinen Modell (Pike-Overzet et al., 2006; Thrasher et al., 2006; Woods et al., 2006; Modlich et al., 2008).

Durch ausführliche Analysen der Integrationsstellen konnte in 3 klinischen Gentherapiestudien gezeigt werden, dass die Integration des Vektors in oder in der Nähe bestimmter Gene die Expansion einzelner Klone steuern kann. In zwei X-SCID Gentherapiestudien entwickelten 5 der insgesamt 19 ansonsten erfolgreich behandelten Patienten 24-68 Monate nach Therapie eine akute lymphatische Leukämie. Bei 4 dieser Patienten konnte eine Integration in oder in der Nähe des Protoonkogens *LMO2* detektiert werden, die zu dessen (Über-)Expression führte (Hacein-

Bey-Abina et al., 2003; Deichmann et al., 2007; Schwarzwaelder et al., 2007). Einer der Patienten trug eine weitere Integrationsstelle in der Nähe des Protoonkogens *BMI1* („BMI1 Polycomb Ring Finger Oncogene“). Bei dem fünften Patienten wurde eine Integration in einem weiteren Protoonkogen, *CCND2* („CCND2 Cyclin D2“), detektiert (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008). Bei allen Patienten traten weitere genetische Veränderungen wie chromosomale Translokationen, „gain-of-function“ Mutationen, die zu einer Aktivierung von *NOTCH1* („Notch Homolog 1“) führten, Deletionen des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* („Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A“) und Translokationen, wie zwischen der TCR- β Region und dem *SIL-TAL1* Locus, auf (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008).

In einer X-CGD Gentherapiestudie konnten zwei Patienten erfolgreich behandelt werden. 5 Monate nach Transplantation wurde eine starke Expansion genmarkierter myeloider Vorläuferzellen beobachtet, ausgelöst durch insertionelle Aktivierung der Protoonkogene *MDS1-EVI1*, *PRDM16* und *SETBP1* („SET Binding Protein 1“) (Ott et al., 2006; Stein et al., 2010). Beide Patienten entwickelten ein MDS in Kombination mit einer Monosomie 7. Patient 1 verstarb 27 Monate nach Gentherapie. Trotz hoher Anzahl genmarkierter Zellen im peripheren Blut sank die Zahl der Superoxid produzierenden Granulozyten 9 bzw. 15 Monate nach Gentherapie in beiden Patienten. Dies korrelierte mit der gleichzeitigen Abnahme der *gp91phox* Expression. Genauere molekulare Untersuchungen konnten eine Methylierung des retroviralen SFFV Promoters, allerdings nicht der Verstärkerelemente, im LTR finden. Dies führte zur Abnahme der *gp91phox* Expression, aber eine Aktivierung der *MDS1-EVI1*, *PRDM16* oder *SETBP1* Expression war über die unmethylierten retroviralen Verstärkerelemente nach wie vor möglich (Stein et al., 2010).

1.5 Vektor- und Sicherheitsoptimierung in der Gentherapie

Das Auftreten von schwerwiegenden Nebenwirkungen in einigen klinischen Gentherapiestudien kann nicht ausschließlich auf das verwendete Vektorsystem zurückgeführt werden, da unter anderem bei der Gentherapie der ADA-SCID mit gammaretroviralen Vektoren bisher keine Nebenwirkungen auftraten (Gaspar et al., 2006; Aiuti et al., 2007; Aiuti et al., 2009). Vielmehr scheint das Zusammenspiel verschiedener Faktoren von Bedeutung zu sein. Unabhängig davon ist eine Optimierung der bestehenden Vektorsysteme von großer Wichtigkeit, um die Risiken der klinischen Gentherapie minimieren zu können. Daher könnte die Verwendung von sogenannten SIN-Vektoren das Risiko einer Insertionsmutagenese reduzieren, da bei diesen Vektoren die U3-

Region des LTR, die die Promoter- und Verstärkerelemente enthält, deletiert ist (Zufferey et al., 1998). Das Transgen wird mithilfe eines internen Promoters exprimiert. Montini und Kollegen konnten zeigen, dass die SIN LTR Konfiguration bei lentiviralen Vektoren das genotoxische Potential im Vergleich zur Anwesenheit eines vollständigen funktionsfähigen LTR signifikant verringert (Montini et al., 2006; Montini et al., 2009). So zeigten SIN lentivirale Vektoren in einem *Cdkn2a* ^{-/-} Tumormausmodell ein wesentlich niedrigeres onkogenes Potential verglichen mit gammaretroviralen Vektoren (Montini et al., 2006). Neueste Untersuchungen basierend auf demselben Tumormausmodell zeigten allerdings, dass die Verwendung SIN lentiviraler Vektoren mit starken internen Promotoren zu einem beschleunigten Auftreten von Tumoren führt (Montini et al., 2009).

Die erfolgreiche Verwendung von SIN gammaretroviralen Vektoren konnte sowohl in Zellkultursystemen als auch im Mausmodell für die Behandlung von X-SCID gezeigt werden (Thornhill et al., 2008). Trotz verringerter Genotoxizität dieser Vektoren (Modlich et al., 2006), traten auch hier unter der Verwendung starker interner Promotoren Nebenwirkungen im Mausmodell auf (Modlich et al., 2008).

Die Verwendung eines UCOE („Ubiquitously Chromatin Opening Element“) in Zusammenhang mit SIN-Vektoren könnte die Sicherheit der Vektorsysteme weiter erhöhen, da es keine Verstärkerelemente enthält und somit die Gefahr einer Beeinflussung benachbarter Gene sinkt. Weiterhin konnte eine stärkere Expression des Transgens detektiert werden verglichen mit SIN-Vektoren, die einen internen SFFV- („Spleen Focus Forming Virus“) oder CMV- („Cytomegalovirus“) Promoter tragen (Zhang et al., 2007).

Der gezielte Einsatz von spezifischen Vektorsystemen für bestimmte Zielzellen stellt eine weitere Möglichkeit der Sicherheitsoptimierung dar. So eignet sich die Verwendung von nicht-integrierenden Vektoren vorwiegend für postmitotische Gewebe, denn durch die fehlende Zellteilung geht der episomal vorliegende Vektor nicht verloren. Da der Vektor eine deutlich verminderte Integrationshäufigkeit aufweist (1000-10000fach verringert), wird die Gefahr einer Insertionsmutagenese reduziert (Philpott et al., 2007). Eine erfolgreiche Verwendung von nicht-integrierenden lentiviralen Vektoren zur Korrektur der Retinitis Pigmentosa („*C-Mer Proto-oncogene Tyrosine Kinase*“ (*MERTK*)-Defizienz) und zur Korrektur einer retinalen Dystrophie („*Retinal Pigment Epithelium 65*“ (*RPE65*)-Defizienz) konnte im Ratten- bzw. Mausmodell gezeigt werden (Yanez-Munoz et al., 2006).

Die gezielte Integration in bestimmte Genloki bietet eine weitere Möglichkeit, das Risiko der Insertionsmutagenese zu reduzieren. Zinkfingernukleasen (ZFN) und das „Sleeping Beauty“-Transposon kombiniert mit nicht-integrierenden lentiviralen Vektoren sind mögliche Transfervehikel für eine solche gerichtete Integration (Ivics et al., 2007; Cathomen et al., 2008; Vink et al., 2009). ZFN induzieren Doppelstrangbrüche und ermöglichen die Integration definierter Sequenzen über homologe Rekombination. In der Gentherapie ist es von großer Bedeutung, dass die Doppelstrangbrüche und der nachfolgende Einbau der DNA gezielt in bestimmten Genloki stattfinden und es nicht zum Schneiden der DNA außerhalb der Zielsequenz kommt (Cathomen et al., 2008).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Integrationsstellen können als molekulare Marker für eine transduzierte Zelle und deren Tochterzellen verwendet werden. Ihr Nachweis in genkorrigierten Zellen ermöglicht es unter anderem, die Klonalität der hämatopoetischen Repopulation nach *ex vivo* Gentransfer aufzuzeigen und die Physiologie der Hämatopoese zu untersuchen. Um das Risiko des verwendeten Vektorsystems abschätzen und zukünftige Gentherapiestudien effizienter und sicherer gestalten zu können, muss das klonale Inventar der genkorrigierten Hämatopoese sukzessiv analysiert werden. Die Verwendung von Restriktionsenzymen zur Fragmentierung der DNA, die allen bisher etablierten Integrationsstellenanalysen gemeinsam ist, stellt durch die ungleiche Amplifikation der DNA-Fragmente ein Hindernis bei der umfassenden Integrationsstellenanalyse dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten das klonale Inventar von zwei X-CGD, einer ADA-SCID und einer WAS Gentherapiestudie, die unter Verwendung eines onkoretroviralen Vektors durchgeführt wurden, in einem Untersuchungszeitraum von bis zu 5 Jahren charakterisiert werden. Weiterhin sollte durch die Etablierung einer nicht-restriktiven Methode eine schnellere und umfassendere Analyse der Integrationsstellen ermöglicht werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien sollten dazu beitragen folgende Fragestellungen aufzuklären:

1. Ist es möglich die Zugänglichkeit des humanen Genoms für die Integrationsstellenanalyse unter Verwendung der LAM-PCR mithilfe eines mathematischen Modells zu berechnen?
2. Kann eine nicht-restriktive Methode zur Erhöhung des für die Integrationsstellenanalyse zugänglichen Genoms etabliert werden?

3. Welche Klonalität zeigt die genkorrigierte hämatopoetische Repopulation in den verschiedenen Gentherapiestudien?
4. Wie hoch ist der Beitrag individueller Integrationsklone an der hämatopoetischen Repopulation zu verschiedenen Zeitpunkten?
5. Kann eine bevorzugte Integration in oder in der Nähe bekannter Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene beobachtet werden?
6. Kommt es zu einer Beeinflussung der zellulären Transkription oder einer klonalen Proliferation durch den integrierten Vektor?

Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass durch bioinformatische Analysen das für die Integrationsstellenanalyse zugängliche Genom berechnet und durch Etablierung einer nicht-restriktiven (nr) LAM-PCR diese Zugänglichkeit erhöht werden kann. Die Klonalitäts- und pharmakokinetischen Analysen erbrachten in allen untersuchten Gentherapiestudien eine anfängliche polyklonale Repopulation der Hämatopoese. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte in einzelnen Patienten ein starker Einfluss des integrierten Vektors auf die *in vivo* Selektion individueller Klone und auf die zelluläre Genexpression detektiert werden. In einem Patienten der X-CGD-Gentherapiestudien entwickelte sich 3½ Jahre nach Gentherapie durch die *in vivo* Selektion eines Integrationsklons eine oligoklonale bis monoklonale Situation. Bevorzugte Integrationen in den Protoonkogenen *MDS1*, *EVI1*, *PRDM16*, *SETBP1*, *LMO2* und *CCND2* konnten ebenfalls beobachtet werden. Hierbei stellten *MDS1* und *EVI1* die am häufigsten von der Integration betroffenen Genloki dar.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Zellen und DNA Proben aus präklinischen und klinischen Gentherapiestudien, die mit onkoretroviralen oder lentiviralen Vektoren durchgeführt wurden, dienten als Ausgangsmaterial für diese Arbeit. Der Großteil der untersuchten Proben wurde freundlicherweise im Rahmen von Kooperationen zur Verfügung gestellt.

2.1.1 DNA aus transduzierten Zelllinien

DNA aus lentiviral transduzierten HeLa-Zellen

Die vergleichende Integrationsstellenanalyse mit LAM-PCR und nrLAM-PCR wurde an HeLa Einzelzellklonen durchgeführt. Hierfür wurden 1×10^5 HeLa-Zellen in einer 6 well Platte ausgesät (verwendetes Medium: DMEM versetzt mit 10% FBS, 2 mM Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin) und mit einem SIN lentiviralen Vektor, der *eGFP* („Green Fluorescent Protein“) unter der Kontrolle eines internen SFFV Promoters exprimiert, bei einer MOI („Multiplicity of Infection“) von 2 transduziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in eine 96 well Platte ausgesät mit einer durchschnittlichen Konzentration von 2 Zellen pro 100 μ l. Die GFP positiven Einzelzellklone wurden weiterkultiviert und nach 10 Wochen wurde die DNA isoliert.

DNA aus onkoretroviral transduzierten HeLa-Zellen

Die onkoretroviral transduzierten HeLa-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Odile Cohen-Haguenaer zur Verfügung gestellt. 5×10^4 Zellen wurden in einer 6 well Platte ausgesät (verwendetes Medium: DMEM versetzt mit 10% FBS, 2 mM Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin) und 18 Stunden mit einem sinFr-MuLV („Friend Murine Leukemia Virus“) Vektor, der einen Insulator im LTR enthält und *eGFP* von einem internen nativen Promoter exprimiert, transduziert (MOI 1). 5 Tage nach Transduktion wurden die GFP positiven Zellen aussortiert und weiterkultiviert. Nach 6 Wochen wurde in unserem Labor die DNA für die Integrationsstellenanalyse mit der nrLAM-PCR isoliert.

DNA aus lentiviral transduzierten T-Zellklonen

DNA von lentiviral transduzierten T-Zellklonen wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Fulvio Mavilio zur Verfügung gestellt. T-Zellen von gesunden Probanden wurden mit zwei verschiedenen lentiviralen Vektoren (pRRL-SIN-18-Cytomegalovirus (CMV) promoter-GFP bzw. pRRL-SIN-18-Phosphoglycerate Kinase (PGK) promoter-GFP) bei einer MOI von 50 transduziert. Anschließend wurden die Zellen in einer 96 well Platte mit einer Konzentration von 0,3-1 Zelle pro 100 µl ausgesät (Cattoglio et al., 2007). Die DNA der transduzierten T-Zellklone wurde für die Integrationsstellenanalyse mit der nrLAM-PCR verwendet.

DNA aus lentiviral transduzierten *lin*- Zellen

Lentiviral transduzierte *lin*- Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Luigi Naldini zur Verfügung gestellt. *Lin*- Zellen wurden mit einem SIN lentiviralen Vektor mit einem internen SFFV Promoter (sinLV-SF), mit einem lentiviralen Vektor mit einem ET-Promoter im LTR (LV-WET) oder mit einem SFFV Promoter im LTR (LV-SF) transduziert (Montini et al., 2006; Montini et al., 2009). 60 Tage nach Kultivierung der transduzierten Zellen wurde in unserem Labor die DNA isoliert.

2.1.2 Patientenmaterial

Patientenmaterial einer onkoretroviralen X-SCID Genterapiestudie (London, UK)

In Rahmen der X-SCID Genterapiestudie in London wurden 10 Patienten behandelt. CD34+ Zellen dieser Patienten wurden *ex vivo* mit einem „Gibbon-Ape Leukemia Virus (GALV)“-pseudotypisierten gammaretroviralen Vektor, welcher die cDNA des therapeutischen Transgens *I/2RG* unter der Transkriptionskontrolle des MLV-LTRs enthielt, transduziert und anschließend den Patienten rücktransplantiert (Gaspar et al., 2004). Einer der Patienten (Patient 8) entwickelte 717 Tage nach Transplantation der genetisch veränderten CD34+ Zellen eine T-Zell akute lymphoblastische Leukämie (T-ALL). Prof. Dr. Adrian Thrasher stellte uns freundlicherweise DNA aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC, „Peripheral Blood Mononuclear Cells“) dieses Patienten zur Verfügung, um den potentiellen Einfluss des integrierten Vektors auf die Entstehung der Leukämie zu untersuchen.

Patientenmaterial einer onkoretroviralen ADA-SCID Gentherapiestudie (London, UK)

Im Rahmen der ADA-SCID Gentherapiestudie, die im *Great Ormond Street Hospital for Children NHS Trust* in London, Großbritannien durchgeführt wurde, wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Adrian Thrasher sowohl CD34+ Zellen und PBMC als auch verschiedene Zellfraktionen (CD19, CD3, CD56, Granulozyten, Monozyten) von 3 Patienten zur Verfügung gestellt. CD34+ Zellen der Patienten wurden *ex vivo* mit einem GALV-pseudotypisierten gammaretroviralen Vektor, der das Transgen *ADA* über einen SFFV-Promoter im LTR exprimiert und ein mutiertes WPRE („Woodchuck Hepatitis Post-Transcriptional Regulatory Element“) enthält, transduziert und den Patienten reinfundiert. Die Patienten wurden vorab einer Chemotherapie mit Melphalan unterzogen (Gaspar et al., 2006). Nach der Rücktransplantation der transduzierten Zellen wurde den Patienten sukzessiv peripheres Blut und Knochenmark entnommen. In dieser Arbeit wurden folgende Zeiträume untersucht: 1026 bis 1760 Tage nach Transplantation (Patient 1), 264 bis 926 Tage nach Transplantation (Patient 2) und Tag 277 nach Transplantation (Patient 3).

Patientenmaterial einer onkoretroviralen X-CGD Gentherapiestudie (Zürich, Schweiz)

In einer erfolgreichen X-CGD Gentherapiestudie wurden CD34+ Zellen zweier Patienten *ex vivo* mit einem gammaretroviralen Vektor transduziert, der das therapeutische Gen *gp91phox* über einen SFFV Promoter im LTR exprimiert (SF71gp91phox). Nach einer nicht-myeloablativen Konditionierung mit Busulfan wurden die transduzierten Zellen den Patienten rücktransplantiert. Für diese Gentherapiestudie wurde das gleiche Protokoll und der gleiche gammaretrovirale Vektor verwendet wie für die in Frankfurt durchgeführte X-CGD Gentherapiestudie (Ott et al., 2006). Den Patienten wurde sukzessiv peripheres Blut und Knochenmark entnommen. Für die Integrationsstellenanalyse wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Reinhard Seger Zellen aus dem peripheren Blut und Knochenmark sowie PBMC, mononukleäre Zellen (MNC, „Mononuclear Cells“) aus dem Knochenmark, Granulozyten und Monozyten (aus dem peripheren Blut und Knochenmark) zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden Einzelzell-(EZ) Kolonien aus dem Knochenmark (411 Tage nach Gentherapie) des zweiten Patienten untersucht. In dieser Arbeit wurden folgende Zeiträume untersucht: 24 Tage bis 1366 Tage nach Transplantation (Patient 1) und 10 Tage bis 549 Tage nach Transplantation (Patient 2).

Patientenmaterial einer onkoretroviralen X-CGD Getherapiestudie (Seoul, Korea)

Eine weitere X-CGD Getherapiestudie wurde in Seoul, Korea, durchgeführt. CD34+ Zellen zweier X-CGD Patienten wurden *ex vivo* mit einem MLV-basierenden gammaretroviralen Vektor, der die cDNA für das Transgen *gp91phox* enthält (MT-gp91), transduziert. Nach partieller myeloablativer Konditionierung mit einer Kombination aus Busulfan und Fludarabin wurden die transduzierten Zellen den Patienten rücktransplantiert. Den Patienten wurde regelmäßig zur Analyse Knochenmark entnommen. Prof. Dr. Sunyoung Kim stellte uns freundlicherweise Proben (Zellen aus dem Knochenmark) beider Patienten zur Verfügung. Die Integrationsstellenanalyse wurde für diese Arbeit innerhalb eines Zeitraumes von 4 bis 52 Wochen nach Transplantation für Patient 1 und Patient 2 durchgeführt. Weiterhin wurden von beiden Patienten Prätransplant-Proben untersucht.

Patientenmaterial einer onkoretroviralen WAS Getherapiestudie (Hannover, Deutschland)

In Hannover wurden insgesamt 8 Patienten, die an dem Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS) leiden durch *ex vivo* Transduktion CD34+ Zellen mit einem GALV pseudotypisierten CMMP Vektor, welcher die cDNA des therapeutischen Transgens *WASP* unter der Transkriptionskontrolle des MLV-LTRs enthielt und anschließender Reinfusion der Zellen, therapiert (Boztug et al., in Begutachtung bei NEJM 2010). Vorab wurde eine partielle myeloablative Konditionierung mit Busulfan durchgeführt. Den Patienten 1 und 2 wurde in einem Zeitraum von 2,5 Jahren regelmäßig peripheres Blut und Knochenmark entnommen, das uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Christoph Klein für die Integrationsstellenanalyse zur Verfügung gestellt wurde. Weiterhin wurden CD3+ Zellen, CD15+ Zellen und Lymphknotengewebe untersucht. Der Zeitraum der Untersuchung erstreckte sich für diese Arbeit für Patient 1 von Tag 25 bis Tag 985 nach Transplantation und für Patient 2 von Tag 21 bis Tag 891 nach Transplantation.

2.1.3 Oligonukleotide

Die für die Analysen verwendeten Oligonukleotide wurden teilweise am 5'-Ende mit Biotin ((**B**)) markiert. Im Falle des einzelsträngigen Linkers für die nrLAM-PCR (LC1rev) wurde das Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert und am 3'-Ende mit einem Didesoxynukleotid versehen. Die HPLC („High Pressure Liquid Chromatography“) aufgereinigten und lyophilisierten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen. (LV, lentiviraler HIV-1-abgeleiteter SIN-Vektor; RV, onkoretroviraler Vektor; LK, Linkerkassette; RT-PCR; Reverse

Transkriptase PCR; FP, Flankenprimer; FuP, Fusionsprimer; **(N)**₂₋₆, Erkennungssequenz für Pyrosequenzierung).

Standard-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
Myoglobin-PCR	Myo 461-439	5'-CTCCCAGTGGCACAGCAGTTAGG-3'
Myoglobin-PCR	Myo 122-143	5'-TGTGCCCCAGGTTTCTCATTTG-3'
Aktin-PCR	Actin-1	5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3'
Aktin-PCR	Actin-2	5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'
LTR-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
LTR-Test (LV)	SK LTR 1 bio	(B) 5'-GAGCTCTCTGGCTAACTAGG-3'
LTR-Test (LV)	SK LTR 9 rev	5'-GCTAGAGATTTTCCACACTG-3'
LTR-Test (LV)	SK LTR 2 bio	(B) 5'-GAACCCACTGCTTAAGCCTCA-3'
LTR-Test (LV)	SK LTR 8 rev	5'-CTAAAAGGGTCTGAGGGATC-3'
LTR-Test (RV-MLV)	LTR25	5'-GTGGTCTCGCTGTTCCCT-3'
LTR-Test (RV-MLV)	LTR25 nested	5'-GTCTCCTCTGAGTGATTGAC-3'
LTR-Test (RV-MLV)	LTR26	5'-CGC TCG ACA TCT TTC CAG T-3'
LTR-Test (RV-MLV)	LTR3 rev	5'-ACTTAAGGGAGTGGTAACAG-3'
LTR-Test (RV-SFFV)	SF71gp91phox 4a for	5'-GGACAGGAATCTCACCTTTC-3'
LTR-Test (RV-SFFV)	SF71gp91phox 4a rev	5'-GAGGCACAGCGTGATGACAA-3'
LTR-Test (RV-SFFV)	SF71gp91phox 5a for	5'-TGCTGCTCAACAAGAGTTTCG-3'
LTR-Test (RV-SFFV)	SF71gp91phox 5a rev	5'-TCAAAGTAAGACCTCCGGATGG-3'
RT-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
RT-PCR	CAMTA1 Ex5 for	5'-AAACTCAAGGTCCAGGGAGT-3'
RT-PCR	CAMTA1 Ex6 for	5'-GTACGGCTGCTATGTCCATT-3'
RT-PCR	CAMTA1 Ex8.1 rev	5'-GATCTGCTGCACCAGCTGTT-3'
RT-PCR	CAMTA1 Ex8.2 rev	5'-GGTCCACTTGATGCCATGGA-3'
RT-PCR	STAT3 Ex2.1 for	5'-TGGCCCAATGGAATCAGCTA-3'
RT-PCR	STAT3 Ex2.1 for	5'-TCTACAGTGACAGCTTCCCA-3'
RT-PCR	STAT3 Ex4.1 rev	5'-CAGTCTGTAGAAGGCGTGAT-3'
RT-PCR	STAT3 Ex4.2 rev	5'-CAATCCGGCAATCTCCATT-3'
RT-PCR	EVI1 Ex5 F2	5'-TGGAGAAACACATGCTGTCA-3'
RT-PCR	EVI1 Ex6 R2	5'-ATAAAGGGCTTCACA CTGCT-3'
RT-PCR	EVI1 Ex5 F3	5'-CATACTGAAGAGAGGGAATA-3'
RT-PCR	EVI1 Ex6 R3	5'-CGACGAAGTGGCAAACGTTT-3'
RT-PCR	MDS1 Ex2 F1	5'-GCCACATCCAGT GAAGCATT-3'
RT-PCR	EVI1 Ex2 R1	5'-TGAGCCAGCTTCCAACATCT-3'
RT-PCR	MDS1 Ex2 F2	5'-AGGAGGGTTCTCCTTACAAA-3'
RT-PCR	EVI1 Ex2 R2	5'-TGA CTGGCATCTATG CAGAA-3'

„Midrange“-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
„Midrange“-PCR	SF71gp91phox 3a rev	5'-CGATGCTGCAGCAGACAAGACG-3'
„Midrange“-PCR	SF71gp91phox 5a rev	5'-TCAAAGTAAGACCTCCGGATGG-3'
„Midrange“-PCR	SF71gp91phox 6a rev	5'-CTTCTTCATCTGTAGCTCGATGG-3'
„Midrange“-PCR	SF71gp91phox 7a rev	5'-GGCCAGACTCAGAGTTGGAGAT-3'
„Midrange“-PCR	SF71gp91phox 8a rev	5'-CCTCATGGAAGAGACAAGTTAG-3'
„Midrange“-PCR	5'-FP1 170524025 for	5'-TATCATGGCTGTCACAGCTG-3'
„Midrange“-PCR	5'-FP2 170524025 for	5'-GCTGTGGAACAAGGATGCAT-3'
„Midrange“-PCR	5'-FP3 170524025 for	5'-ACATTCAGGTCCTTTGGTGG-3'
„Tracking“-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
„Tracking“-PCR	5'-FP1 6766580 for	5'-TACAATGCCACCAGCACTTC-3'
„Tracking“-PCR	5'-FP2 6766580 for	5'-CCACACAAATCGTCAACATAGG-3'
„Tracking“-PCR	5'-FP3 6766580 for	5'-ATATTGTCCC GCCGTTGTTA-3'
„Tracking“-PCR	3'-FP1 170524025 rev	5'-TTGGGAGTTCCATGTGGTAG-3'
„Tracking“-PCR	3'-FP2 170524025 rev	5'-TTTGGTTGCACAGCCACTGG-3'
„Tracking“-PCR	3'-FP3 170524025 rev	5'-TGGAAGCACGTAGGCATTTG-3'
„Tracking“-PCR	5' 37727051 FP1 for	5'-CCAGATTT CAGCCCAGCATA-3'
„Tracking“-PCR	5' 37727051 FP2 for	5'-CAGTGTGCCAGATGGTCTGAA-3'G
„Tracking“-PCR	5' 37727051 FP3 for	5'-CTGCATGGGAGTATGGTTTACAC-3'
„Tracking“-PCR	5' 170545702 FP1 for	5'-CTTGGGTCAAACCTGTGGAGC-3'
„Tracking“-PCR	5' 170545702 FP2 for	5'-CCTATCCCCTGGAAGTCTTAGG-3'
„Tracking“-PCR	5' 170545702 FP3 for	5'-CTGCTTTACAAATACGCCAGAAGC-3'
„Tracking“-PCR	LTR SFFV bio	(B) 5'-GTTTGGCCCAACGTTAGCTATT-3'
„Tracking“-PCR	LTR II SFFV bio	(B) 5'-CGCCCTTGATCTGAACTTCTC-3'
„Tracking“-PCR	U5 V SFFV bio	(B) 5'-GGTACCCGATTTCCCAATA-3'
„Tracking“-PCR	U5 VI SFFV bio	(B) 5'-TCTTGCTGTTTGCATCCGAA-3'
„Realtime“-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
„Realtime“-PCR	CCND2 WAS1 4121935 1	5'-CTGAAATGTTGACCTGCAGATCC-3'
„Realtime“-PCR	CCND2 WAS1 4121935 3	5'-CCAAATGCAGACTCCTAGGTCAC-3'
„Realtime“-PCR	LTR II bio	(B) 5'-GACCTTGATCTGAACTTCTC-3'
„Realtime“-PCR	LTR IV	5'-CCTTGCAAAATGGCGTACT-3'
„Realtime“-PCR	LTR 25	5'-GTGGTCTCGCTGTTCCCTT-3'
„Realtime“-PCR	LTR3 rev	5'-ACTTAAGGGAGTGGTAACAG-3'
„Realtime“-PCR	LTR 25 nested	5'-GTCTCCTCTGAGTGATTGAC-3'
„Realtime“-PCR	SF71gp91phox 3a rev	5'-CGATGCTGCAGCAGACAAGA-3'

LAM-PCR/nrLAM-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; LV)	SK LTR 1bio	(B) 5'-GAGCTCTCTGGCTAACTAGG-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; LV)	SK LTR 2bio	(B) 5'-GAACCCACTGCTTAAGCCTCA-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; LV)	SK LTR 3bio	(B) 5'-AGCTTGCCCTTGAGTGCTTCA-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; LV)	SK LTR 4	5'-AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT-3'
(nr)/LAM-PCR (5'-LTR; MLV RV)	LTRa bio	(B) 5'-TGCTTACCACAGATATCCTG-3'
(nr)/LAM-PCR (5'-LTR; MLV RV)	LTRb bio	(B) 5'-ATCCTGTTTGGCCCATATTC-3'
(nr)/LAM-PCR (5'-LTR; MLV RV)	LTR II bio	(B) 5'-GACCTTGATCTGAACTTCTC-3'
(nr)/LAM-PCR (5'-LTR; MLV RV)	LTR III	5'-TTCCATGCCTTGCAAAATGGC-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; MLV RV)	U5IVbio	(B) 5'-TCCGATTGACTGAGTCGC-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; MLV RV)	U5Vbio	(B) 5'-GGTACCCGTGTATCCAATA-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; MLV RV)	U5VI bio	(B) 5'-TCTTGCAGTTGCATCCGACT-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; MLV RV)	LTR25	5'-GTGGTCTCGCTGTTCCCTT-3'
(nr)/LAM-PCR (5'-LTR; SFFV RV)	LTR SFFV bio	(B) 5'-GTTTGGCCCAACGTTAGCTATT-3'
(nr)/LAM-PCR (5'-LTR; SFFV RV)	LTR II SFFV bio	(B) 5'-CGCCCTTGATCTGAACTTCTC-3'
(nr)/LAM-PCR (5'-LTR; SFFV RV)	LTR III	5'-TTCCATGCCTTGCAAAATGGC-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; SFFV RV)	U5 IV SFFV bio	(B) 5'-TCCGATTGACTGCGTCGC-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; SFFV RV)	U5 V SFFV bio	(B) 5'-GGTACCCGTATCCAATA-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; SFFV RV)	U5 VI SFFV bio	(B) 5'-TCTTGCCTGTTTGCATCCGAA-3'
(nr)/LAM-PCR (3'-LTR; SFFV RV)	LTR 25	5'-GTGGTCTCGCTGTTCCCTT-3'
(nr)/LAM-PCR (LK)	LCI	5'-GACCCGGGAGATCTGAATTC-3'
(nr)/LAM-PCR (LK)	LCII	5'-GATCTGAATTCAGTGGCACAG-3'
Fusionsprimer-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
Fusionsprimer-PCR	FuP A-LTR; LV	5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG(N) ₂₋₆ TGTGTGACTCTGGTAACTAG-3'
Fusionprimer-PCR	FuP A-LTR; RV	5'GCCTCCCTCGCGCCATCAG(N) ₂₋₆ GTCTCCTCTGAGTGATTGAC-3'
Fusionprimer-PCR	FuP B-LK	(B) 5'GCCTTGCCAGCCCCTCAGAGTGG CACAGCAGTTAGG-3'
Herstellung LK	Name	Sequenz (5'-3')
Herstellung LK	LC1	5'GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGGC ACAGCAGTTAGG-3'
Herstellung LK	LC3 (AATT)	5'AATTCCTAACTGCTGTGCCACTGAATT CAGATC-3'
Herstellung LK	LC3 (TA)	5'TACCTAACTGCTGTGCCACTGAAATCA GAT C-3'
Herstellung LK	LC3 (CATG)	5'CATGCCTAACTGCTGTGCCACTGAATT CAGATC-3'

nrLAM-PCR (LK)	LC1rev	(P)5' CCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCA GATCTCCCGGGTddC-3'
----------------	--------	---

2.1.4 DNA-Längenstandards, Enzyme und Kits

2.1.4.1 DNA-Längenstandard

100 bp Marker; New England Biolabs

2.1.4.2 Enzyme und Kits

Es wurden folgende Enzyme bzw. Kits verwendet:

Enzyme/Kits	Bezugsquelle
Fast-Link Ligation Kit	Epicentre
Genomiphi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Klenow Polymerase	Roche
Microcon -30, -50 Kit	Millipore
Mid Range PCR System	Peqlab
MS2RNA	Roche
QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Kit	Qiagen
QIAquick® PCR-Purification Kit	Qiagen
QiaShredder spin columns	Qiagen
RNase-free DNase Set	Qiagen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNeasy Kit	Qiagen
Spreadex Fertiggele, Typ EL1200	Elchrom Scientific
SYBRGREEN I Mix	Roche
T4 RNA-Ligase	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Qiagen/Genaxxon
Verso™ cDNA Kit	Thermo Scientific

2.1.5 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsquelle
Agarose LE	Sigma
Aqua ad iniectabilia	Braun
β -Mercaptoethanol	Sigma
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
Ethanol	VWR
Ethidiumbromidlösung 0,07%	Appllichem
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Appllichem
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN
Glutamin	Invitrogen
Glycerin	Sigma
Guanidinhydrochlorid	Sigma
Hexamin- CoCl_2	Fluka
Hexanukleotidgemisch (10x)	Roche
Humane genomische DNA	Roche
Lithiumchlorid	Sigma
Loading Buffer 5x	Elchrom Scientific
Magnetische Partikel: Dynabeads M-280 Streptavidin	Dynal
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka
PCR Grade Water	Roche
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phosphoethylenglycol (PEG) 8000	Genaxxon
Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,4)	Gibco
Polyprene	Sigma
Proteinase K	Roche/Qiagen
RNase/DNase freies H_2O	Ambion
Tris-Acetat-Essigsäure (TAE) Buffer 40x	Elchrom Scientific
Tris-Borat-Essigsäure (TBE) Buffer 10x	Amresco
Trizma HCl	Appllichem

2.1.6 Sonstige Materialien

Materialien	Bezugsquelle
0,5 ml , 1 ml, 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
0,5 ml, 1 ml, 2 ml RNase/DNase freie Reaktionsgefäße	Ambion
2-50 ml Zellkulturpipetten	BD Beckton Dickinson
6 well Platten Zellkultur	BD Beckton Dickinson
96 well Platten	Greiner bio-one
96 well Platten für Gelbeladung	Greiner bio-one
96 well Platten für LightCycler LC480	Roche
96 well Platten Zellkultur	BD Beckton Dickinson
Abdeckfolie	VWR
Abdeckfolie für LightCycler LC480	Roche
Deckel für 96 well Platten	Greiner bio-one
Pipettierspitzen	Starlab GmbH
Pipettierspitzen für LightCycler LC480	Starlab GmbH
Zellkulturflaschen	Nunc Brand Products

2.1.7 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Substanz	Endkonzentration
Denaturierungslösung	NaOH	0,1 N
Ladepuffer (5x)	Tris-HCl (pH 7)	25 mM
	EDTA (pH 8)	150 mM
	Bromphenol-Blau	0,05%
	Glycerol	25%
Inkubationslösung für magentische Partikel		
Waschlösung	PBS (pH 7,4)	
	BSA	0,1%
3M LiCL Lösung	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
	EDTA	1 mM
	LiCl	3 M
6M LiCL Lösung	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
	EDTA	1 mM
	LiCl	6 M
PEG 8000		50 %
Hexamin-CoCl ₂		10 mM

2.1.8 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Autoklav	Systemec GmbH
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese Power Supply	Pharmacia/Elchrom Scientific
Feinwaage	Sartorius
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Sanyo
Gel-Dokumentationssystem	Peqlab
Gelelektrophoresekammer	Biometra
Inkubatoren (37°C)	Binder Lifescience
Kreisschüttler (KS 250B)	IKA Labortechnik
Kühlschränke	Liebherr
LightCycler LC480	Roche
Magnetische Separationseinheit MPC-E-1	Dynal
Magnetische Separationseinheit MPC 96	Dynal
Mehrkanalpipette	Eppendorf
Mikroskop	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Mikrowellengerät	Siemens
NanoDrop Spektrophotometer	Thermo Scientific
PCR Gerät (Personal Cycler)	Biometra
Picofuge	Stratagene
Pipetten (Pipetman P2, P10, P200, P1000)	Eppendorf
Pipettierhilfe	Integra Bioscience Pipetboy acu
Stickstofftank	Thaylor-Wharton
Thermomixer	Eppendorf
Vortexer (MS1)	IKA Labortechnik
Waage	Sartorius
Wasserbad	Thermo Electron Corporation
Zellkultur-Hood	Heraeus
Zentrifugen	Eppendorf

2.1.9 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramme und Datenbanken	Bezugsquelle
Lasergene	DNA Star
LightCycler LC480 Software	Roche
Office 2007 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
Photoshop CS2	Adobe
Acrobat 8 Professional	Adobe
R 2.7.1	cran.r-project.org
BLAST Search	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
BLAT Search	genome.ucsc.edu/

2.1.10 Fotomaterial

Fotomaterial	Bezugsquelle
Videoprinter	Mitsubishi
Printerfilme VM 65 H	Mitsubishi

2.2 Methoden

2.2.1 Transduktion von HeLa-Zellen

1×10^5 HeLa-Zellen wurden in einer 6 well Platte ausgesät und in DMEM versetzt mit 10% FBS, 2mM Penicillin/Streptomycin und 2mM Glutamin kultiviert. Die Zellen wurden für 24 Stunden in Anwesenheit von 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene mit einem SIN lentiviralen Vektor, der das Transgen *eGFP* von einem internen SFFV-Promoter exprimiert, transduziert. Es wurde eine MOI von 2 verwendet. Zur Generierung von Einzelzellklonen wurden die Zellen auf 2 Zellen/100 μl verdünnt und in einer 96 well Platte ausgesät. Einige Stunden nach dem Aussäen wurden die Wells markiert, in denen sich nur eine Zelle befindet. Nach 10-wöchiger Kultivierung der Einzelzellklone wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops die GFP positiven Zellen ausgesucht und von diesen DNA isoliert.

Die Transduktion der weiteren in dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgte in Kooperation mit anderen Gruppen (siehe 2.1 Material).

2.2.2 DNA-Isolation aus Zellen

Die DNA-Isolation aus Zellen wurde mit dem „High Pure PCR Template Preparation Kit“ von Roche durchgeführt. Das Zellpellet (1×10^6 Zellen) wurde in 200 μ l PBS aufgenommen und 200 μ l Binde-Puffer und 40 μ l Proteinase K dazugegeben. Anschließend wurde die Probe bei 70°C für 10 min inkubiert. Danach wurde 100 μ l Isopropanol dazugegeben und die Probe gut gemischt. Nach dem Laden der Probe auf die DNA-Säulen wurden diese bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert. Die darauffolgenden Schritte beinhalten das Waschen der Säule mit 500 μ l „Inhibitor Removal“-Puffer und 2-mal 500 μ l Wasch-Puffer. Nach jedem Waschschrift wurde die Säule für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die Zentrifugation der Säule für 10 sek bei höchster Geschwindigkeit sollte gewährleisten, dass restliches Ethanol noch gewaschen wird. Die Elution der DNA erfolgte 3-mal in 50 μ l dH₂O. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3 DNA-Isolation aus Blut/Knochenmark

Die Isolation der DNA aus Blut oder Knochenmark erfolgte mit dem „QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Kit“ von Qiagen. 2 ml Blut oder Knochenmark wurden mit 200 μ l Protease und 2,4 ml Puffer AL gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde 2 ml Ethanol zur Probe gegeben, gut gemischt und die Probe auf eine DNA-Säule überführt. Die Zentrifugation der Säule erfolgte bei 1850 x g für 3 min. Der Waschschrift mit 2 ml Puffer AW1 wurde bei 4500 x g für 1 min und der anschließende Waschschrift mit 2 ml Puffer AW2 bei 4500 x g für 15 min durchgeführt. Die Elution erfolgte 3-mal mit 300 μ l dH₂O. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.4 DNA Vervielfältigung mittels „GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit“

Da bei einigen Proben die DNA-Menge für die nachfolgende Analyse nicht ausreichend war, wurde diese mithilfe des „GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit“ von GE Healthcare vervielfältigt. Hierfür wurde zunächst 1 μ l DNA mit 9 μ l Proben-Puffer gemischt und für 3 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe auf 4°C wurde diese mit 9 μ l Reaktions-Buffer und 1 μ l Enzym-Mix versetzt und für 1,5 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte bei 65°C für 10 min. Die amplifizierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.5 RNA-Isolation aus Zellen

Für die RNA-Isolation aus Patientenmaterial wurde das „RNeasy Kit“ von Qiagen verwendet. Die Zellen ($\sim 1 \times 10^6$) wurden zunächst in 350 μ l Puffer RLT versetzt mit β -Mercaptoethanol resuspendiert. Zur Homogenisierung des Lysats wurde die Probe auf eine Qiashreder-Säule geladen und bei höchster Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend mit 350 μ l Ethanol versetzt und auf eine RNA-Säule geladen. Die Zentrifugation der Säule erfolgte für 30 sek bei 8000 x g. Das Waschen der Säule erfolgte mit 350 μ l Puffer RW1 und der Zentrifugation für 30 sek bei 8000 x g. Für den DNase Verdau wurden 10 μ l DNase I Lösung mit 70 μ l Puffer RDD gemischt und das Gemisch (insgesamt 80 μ l) auf die Säule geladen. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurden abermals 350 μ l Puffer RW1 auf die Säule geladen und anschließend die Säule für 30 sek bei 8000 x g zentrifugiert. Die anschließenden Waschschrte mit 2-mal 500 μ l Puffer RPE wurden bei 8000 x g für 30 sek bzw. 2 min durchgeführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 min bei höchster Geschwindigkeit wurde die RNA in 30 μ l RNase-freiem dH₂O eluiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.6 cDNA-Synthese

Für die Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR wurde die isolierte RNA mit dem „Verso™ cDNA Kit“ von Thermo Scientific in cDNA umgeschrieben. In **Tabelle 2.1** sind die benötigten Reagenzien angegeben.

Tabelle 2.1: Reagenzien für die cDNA-Synthese.

dH ₂ O	7 μ l
cDNA Synthesepuffer (5x)	4 μ l
dNTP (500 μ M)	2 μ l
Oligo-dt-Primer (500 ng/ μ l)	1 μ l
Verso Enzym-Mix	1 μ l
RNA	5 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 42°C inkubiert und anschließend das Enzym bei 95°C für 2 min inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung der DNA, RNA und cDNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA, RNA und cDNA erfolgte zum einen mit einem NanoDrop Spektrophotometer, zum anderen mithilfe der Myoglobin bzw. Aktin-PCR. Die Myoglobin-Primer liegen innerhalb von Introns und wurden zur Abschätzung der DNA-Konzentration verwendet. Die Aktin-Primer dagegen liegen innerhalb von Exons und wurden zur Bestimmung der cDNA-Konzentration verwendet. Die **Tabellen 2.2 und 2.3** zeigen die benötigten Reagenzien für die Myoglobin- bzw. Aktin-PCR. In **Tabelle 2.4** ist das verwendete PCR-Programm dargestellt. Als Standard für beide PCR Reaktionen wurde eine Verdünnungsreihe (100 ng - 0,01 ng) einer humanen DNA verwendet, deren Konzentration bekannt ist.

Tabelle 2.2: Reagenzien für die exponentielle Myoglobin-PCR Reaktion (humane Proben).

dH ₂ O	42,5-x µl
10x PCR Puffer (Qiagen)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Myo 461-439 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
Myo 122-143 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA	x
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.3: Reagenzien für die exponentielle Aktin-PCR Reaktion (humane Proben).

dH ₂ O	42,5-x µl
10x PCR Puffer (Qiagen)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Aktin-1 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
Aktin-2 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA	x
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.4: Programmparameter der Myoglobin- bzw. Aktin-PCR.

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	
Annealing	58°C	1 min	30 Zyklen
Extension	72°C	1 min	
Termination	72°C	10 min	

2.2.8 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Zur Analyse der Genexpression wurde mit der cDNA eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden 3-5 ng cDNA eingesetzt. Für die Analyse der *MDS1-EVI1* Expression wurde neben den Proben zusätzlich eine Verdünnungsreihe (10^{10} - 10^1 Kopien) eines Plasmids, das die *MDS1-EVI1* cDNA enthält und eines Plasmids, das die *EVI1* cDNA enthält, als Positivkontrolle verwendet. Für die Analyse der *CAMTA1*- und *STAT3*-Expression stand uns keine Positivkontrolle zur Verfügung. Die benötigten Reagenzien und das verwendete PCR-Programm sind in den **Tabellen 2.5** und **2.6** zusammengefasst. Es wurden jeweils zwei exponentielle PCR Reaktionen durchgeführt. In die zweite exponentielle PCR wurde 1 μ l PCR-Produkt aus der ersten exponentiellen PCR eingesetzt.

Tabelle 2.5: Reagenzien für die exponentiellen RT-PCR Reaktionen.

dH ₂ O	42,5-x μ l
10x PCR Puffer (Qiagen)	5 μ l
dNTP (10 mM)	1 μ l
RT-Primer 1 (16,7-50 pmol/ μ l)	0,5 μ l
RT-Primer 2 (16,7-50 pmol/ μ l)	0,5 μ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/ μ l)	0,5 μ l
DNA	x
Gesamtvolumen	50 μ l

Tabelle 2.6: Programmparameter der RT-PCR Reaktionen.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 sek	
Annealing	54°C	45 sek	36 Zyklen
Extension	72°C	1 min	
Termination	72°C	5 min	

2.2.9 Bestimmung der Transduktionseffizienz

Die Transduktionseffizienz verschiedener lentiviral und gammaretroviral transduzierter Proben wurde mithilfe einer exponentiellen PCR, die einen Teil des LTR oder einen Teil des im Vektor enthaltenen Transgens amplifiziert, bestimmt. Da der Anteil an genmarkierten Zellen oftmals sehr gering war, wurden jeweils zwei exponentielle PCR Reaktionen durchgeführt. In die zweite PCR Reaktion wurde 1 µl PCR-Produkt der ersten exponentiellen PCR eingesetzt. Neben den Proben wurde als Standard eine Verdünnungsreihe (100 ng - 0,01 ng) einer Probe mit bekannter Markierungseffizienz verwendet. **Tabelle 2.7** und **2.8** zeigen die verwendeten Reagenzien und das PCR-Programm.

Tabelle 2.7: Reagenzien für die exponentiellen LTR-Test PCR Reaktionen.

dH ₂ O	42,5-x µl
10x PCR Puffer (Qiagen)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
LTR-Primer 1 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
LTR-Primer 2 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA	x
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.8: Programmparameter der exponentiellen LTR-Test PCR Reaktionen.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 sek	
Annealing	58°C	45 sek	35 Zyklen
Extension	72°C	1 min	
Termination	72°C	5 min	

2.2.10 Amplifikation spezifischer Integrationsstellen – „Tracking“-PCR

Die Amplifikation spezifischer Integrationsstellen wurde unter Verwendung von Primern, die zum einen im LTR des Vektors und zum anderen in der genomischen DNA binden, durchgeführt (siehe **Kapitel 7, Abbildungen 7.7-7.11**). 1 µl PCR-Produkt der ersten exponentiellen Reaktion wurde jeweils für eine zweite exponentielle PCR verwendet. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm sind in den **Tabellen 2.9** und **2.10** dargestellt. Für die „Tracking“-PCR wurde zum größten Teil DNA von Einzelzellklonen verwendet, die vorab mit dem „GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit“ vervielfältigt wurde (siehe **Abschnitt 2.2.4**).

Tabelle 2.9: Reagenzien für die exponentiellen „Tracking“-PCR Reaktionen.

dH ₂ O	42,5-x µl
10x PCR Puffer (Qiagen)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
„Tracking“-Primer 1 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
„Tracking“-Primer 2 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA	x
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.10: Programmparameter der exponentiellen „Tracking“-PCR Reaktionen.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 sek	
Annealing	58°C	45 sek	35 Zyklen
Extension	72°C	1 min	
Termination	72°C	5 min	

2.2.11 Amplifikation langer DNA-Fragmente – „Midrange“-PCR

Die Amplifikation von langen DNA-Fragmenten erfolgte mittels des „Mid Range PCR Systems“ von Peqlab. Das Experiment diente ebenfalls dazu, eine spezifische Integrationsstelle zu amplifizieren. Allerdings wurden hierfür Primer verwendet, die zum einen innerhalb des Vektors binden (nicht in der LTR-Region) und zum anderen in der genomischen DNA. Da der Verdacht einer LTR-Deletion bestand, wurden keine Primer benutzt, die im LTR binden, wie es für die „Tracking“-PCR üblich ist (siehe **Abschnitt 2.2.10**). Das „Mid Range PCR System“ kann für die Amplifikation von DNA-Fragmenten von einer Größe bis zu 12 kb verwendet werden. Die **Tabellen 2.11** und **2.12** zeigen die verwendeten Reagenzien und die Reaktionsbedingungen.

Tabelle 2.11: Reagenzien für die exponentielle „Midrange“-PCR Reaktion.

dH ₂ O	36,25 µl
10x PCR Puffer	5 µl
dNTP (10 mM)	1,75 µl
„Midrange“-Primer 1 (10 pmol/µl)	2 µl
„Midrange“-Primer 2 (10 pmol/µl)	2 µl
„Midrange“ PCR Enzym (5U/µl)	2 µl
DNA	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.12: Programmparameter der exponentiellen „Midrange“-PCR Reaktion.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 sek	
Annealing	58°C	30 sek	35 Zyklen
Extension	68°C	1 min	
Termination	68°C	7 min	

2.2.12 Lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR)

Die Integrationsstellenanalyse wurde vorwiegend mithilfe der von Dr. Manfred Schmidt und Prof. Dr. Christof von Kalle etablierten LAM-PCR durchgeführt (Schmidt et al. 2002; Schmidt et al. 2007; Schmidt et al. 2009). Die LAM-PCR beginnt mit der linearen Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge. Hierbei besteht die Möglichkeit die Amplifikation vom 5'-LTR (5'-LAM-PCR) oder vom 3'-LTR (3'-LAM-PCR) aus zu starten. Nach dem Binden der Fragmente an magnetische „Beads“ wird der zweite Strang generiert, die Fragmente mit einem Restriktionsenzym geschnitten und an das unbekannte genomische Ende der Fragmente eine bekannte Linkersequenz ligiert. Danach werden die Fragmente von den „Beads“ gelöst und nochmals exponentiell amplifiziert. Eine detaillierte Darstellung der einzelnen Schritte ist in **Kapitel 1 Abbildung 1.4** zu finden. Die Lage der LAM-PCR Primer ist in **Kapitel 7 Abbildungen 7.2-7.6** dargestellt.

1. Herstellung der Linkerkassette

Für die Herstellung der Linkerkassetten wurden jeweils zwei Oligonukleotide verwendet, die nach ihrer Hybridisierung einen Überhang bilden. Dabei ist ein Oligonukleotid immer spezifisch für das jeweilige in der LAM-PCR verwendete Restriktionsenzym. Da jedes Restriktionsenzym einen anderen Überhang produziert, muss die dazu entsprechende Linkerkassette generiert werden (siehe auch **Kapitel 7, Abbildung 7.1**). **Tabelle 2.13** zeigt die benötigten Reagenzien. Nach dem Mischen der Reagenzien wurden diese für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und der Reaktionsmix Ü.N. im Heizblock stengelassen. Am nächsten Tag wurde der Reaktionsmix mit dH₂O auf 500 µl aufgefüllt und auf eine Microcon-30 Säule pipettiert. Nach Zentrifugation der Säule bei 12600 rpm für 12 min wurde die Säule umgedreht in ein frisches Reaktionsgefäß gestellt und bei 3600 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde auf 80 µl mit dH₂O aufgefüllt und die Linkerkassette anschließend aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2.13: Reagenzien zur Herstellung der Linkerkassette.

LC1 (100pmol/µl)	40 µl
LC3 (100pmol/µl)	40 µl
250 mM Tris pH 7,5	110 µl
100 mM MgCl ₂	10 µl
Gesamtvolumen	200 µl

2. Lineare PCR

Für die lineare Amplifikation wurde im Rahmen dieser Arbeit 1 ng - 100 ng DNA verwendet. Die Verdünnung der DNA auf 10 ng und 1 ng sollte dabei helfen, mögliche dominante Integrationsklone sichtbar machen zu können. Die Amplifikation wurde sowohl an dem 5'-LTR als auch an dem 3'-LTR gestartet. Nach 50 Zyklen wurde erneut 0,5 µl *Taq* Polymerase zu den PCR-Produkten dazugegeben und eine weitere Amplifikation von 50 Zyklen durchgeführt. In **Tabelle 2.14** und **2.15** sind die Reagenzien und das PCR-Programm dargestellt. Für die lineare Amplifikation werden biotinylierte Primer verwendet. Für gammaretroviral transduzierte Proben wurde eine Annealing-Temperatur von 58°C, für lentiviral transduzierte Proben eine Annealing-Temperatur von 60°C verwendet.

Tabelle 2.14: Reagenzien für die linearen PCR Reaktionen.

dH ₂ O	43,25-x µl
10x PCR Puffer	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer 1 (0,17 pmol/µl)	0,25 µl
Primer 2 (0,17 pmol/µl)	0,25 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,25 µl
DNA	x
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.15: Programmparameter der linearen PCR Reaktionen.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 sek	
Annealing	58°C/60°C	45 sek	2x50 Zyklen
Extension	72°C	1 min	
Termination	72°C	5 min	

3. „Magnetic Capture“

Die amplifizierte einzelsträngigen Fragmente wurden über eine Biotin-Streptavidin Bindung an magnetische „Beads“ gebunden. Hierfür mussten die „Beads“ zunächst gewaschen werden. Pro PCR Reaktion wurden 200 µg magnetische „Beads“ 60 sek einem Magnetischen Feld (MF) exponiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Partikel einmal mit 40 µl PBS/1%

BSA pro PCR Reaktion gewaschen, am MF exponiert und der Überstand verworfen. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt. Danach wurde mit 20 μl 3M LiCl Waschlösung pro Reaktion gewaschen. Die „Beads“ wurden schließlich in 50 μl 6M LiCl Waschlösung pro PCR Reaktion aufgenommen. Diese Suspension wurde im Verhältnis 1:1 (50 μl :50 μl) zu jedem linearen PCR-Produkt gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation auf dem Kreisschüttler bei 300 rpm und Raumtemperatur Ü.N..

4. „Hexanukleotidpriming“

An der Festphase wurde am nächsten Tag mithilfe des Klenow-Enzyms der zweite DNA-Strang gebildet. Zunächst wurden die Proben in 96 well Platten überführt und gegen ein MF exponiert. Der Überstand wurde verworfen, die „Beads“ mit 100 μl dH₂O gewaschen und anschließend in dem in **Tabelle 2.16** dargestellten Reaktionsmix resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37°C.

Tabelle 2.16: Reagenzien für die „Hexanukleotidpriming“ Reaktion.

dH ₂ O	16,5 μl
10x Hexanukleotidmix	2 μl
dNTP (200 μM)	0,5 μl
Klenow-Polymerase (2U/ μl)	1 μl
Gesamtvolumen	20 μl

5. Restriktionsverdau

Nach der Zugabe von 80 μl dH₂O zu den Proben und der Exponierung gegen ein MF wurde der Überstand verworfen und die Proben einmal mit 100 μl dH₂O gewaschen. Anschließend wurden sie in dem Reaktionsmix für den Restriktionsverdau resuspendiert (**Tabelle 2.17**). Für den Restriktionsverdau wurden ausschließlich Restriktionsenzyme mit einem 4 bp Restriktionsmotif verwendet. Die Proben wurden für 1 Stunde bei der für das jeweilige Restriktionsenzym spezifischen Temperatur inkubiert. Bei einigen Enzymen wurde zusätzlich 0,2 μl BSA (100 x) zugegeben.

Tabelle 2.17: Reagenzien für den Restriktionsverdau.

dH ₂ O	17,6 µl-x
10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym (5U/µl)	0,4 µl
optional BSA (100 x)	0,2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

6. Ligation

Die Ligation der Linkerkassette erfolgte mit dem „Fast Link Ligation Kit“ von Epicentre. Die Proben wurden zunächst mit 80 µl dH₂O aufgefüllt und gegen ein MF exponiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben mit 100 µl dH₂O gewaschen. Nach der Resuspension der Proben in dem Ligations-Mix (**Tabelle 2.18**) wurden diese für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie auf 4°C überführt und mit dH₂O auf 100 µl aufgefüllt.

Tabelle 2.18: Reagenzien für die Ligation der Linkerkassette.

dH ₂ O	5 µl
10x „Fast Link Ligation“ Puffer	1 µl
ATP (10 mM)	1 µl
Linkerkassette	2 µl
„Fast Link“ Ligase (2 U/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

7. Denaturierung

Die Proben wurden gegen ein MF exponiert, der Überstand verworfen und mit 100 µl dH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Proben in 5 µl 0,1N NaOH resuspendiert und für 10 min auf einem Kreisschüttler bei 300 rpm inkubiert. Nach erneuter Exponierung gegen ein MF wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Denaturierungsprodukt wurde bei -20°C gelagert.

8. Erste und zweite exponentielle PCR

2 µl des Denaturierungsproduktes wurde für die erste exponentielle PCR verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend nochmals mittels Bindung an magnetische „Beads“ aufgereinigt und von dem zweiten Denaturierungsprodukt wurde 1 µl in die zweite exponentielle PCR

eingesetzt. Das Pipettierschema und das PCR-Programm der exponentiellen PCR Reaktionen sind in **Tabelle 2.19** und **Tabelle 2.20** dargestellt. Für gammaretroviral transduzierte Proben wurde eine Annealing-Temperatur von 58°C, für lentiviral transduzierte Proben eine Annealing-Temperatur von 60°C verwendet.

Tabelle 2.19: Reagenzien für die exponentiellen PCR Reaktionen

dH ₂ O	41 µl/42 µl
10x PCR Puffer	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer 1 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA	2 µl/1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.20: Programmparameter der exponentiellen PCR Reaktionen.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 sek	
Annealing	58°C/60°C	45 sek	35 Zyklen
Extension	72°C	1 min	
Termination	72°C	5 min	

9. „Magnetic Capture“ der ersten exponentiellen PCR

Das Waschen der „Beads“ wurde wie in **Schritt 3** der LAM-PCR durchgeführt. Die „Beads“ wurden allerdings in 20 µl 6M LiCl Waschlösung pro PCR Reaktion resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl „Beads“ zu 20 µl PCR-Produkt gegeben (1:1 Verhältnis) und die Proben für 1 Stunde auf einem Kreisschüttler bei 300 rpm inkubiert. Nach der Zugabe von 60 µl dH₂O wurden die Proben gegen ein MF exponiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden 2-mal mit 100 µl dH₂O gewaschen und anschließend in 10 µl 0,1N NaOH resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf dem Kreisschüttler (300 rpm) wurden die Proben erneut gegen ein MF exponiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung des Denaturierungsproduktes erfolgte bei -20°C.

2.2.13 Nicht-restriktive lineare amplifikationsmedierte PCR (nrLAM-PCR)

Die nrLAM-PCR wurde basierend auf der LAM-PCR im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit Richard Gabriel und Cynthia Bartholomä etabliert. Sie erlaubt das Umgehen des Restriktionsverdau, indem nach linearer Amplifikation an das unbekannte genomische Ende der Fragmente ein einzelsträngiger Linker ligiert wird. Die detaillierte Darstellung der einzelnen Schritte ist in **Abschnitt 3, Abbildung 3.7** zu finden.

1. Lineare PCR

Für die lineare PCR wurde 100 ng - 1 µg DNA verwendet. Nach 50 Zyklen wurde 0,5 µl *Taq* Polymerase zu jeder Probe gegeben und eine weitere Amplifikation von 50 Zyklen durchgeführt. Der Reaktionsansatz und das verwendete PCR-Programm sind den **Tabellen 2.21** und **2.22** zu entnehmen. Für gammaretroviral transduzierte Proben wurde eine Annealing-Temperatur von 58°C, für lentiviral transduzierte Proben eine Annealing-Temperatur von 60°C verwendet. Um die Entstehung von sehr langen Fragmenten zu verhindern, wurde die Elongationszeit auf 5 sek verkürzt, es wurde keine finale Elongation durchgeführt und es wurde eine dNTP-Konzentration von 0,5 mM verwendet.

Tabelle 2.21: Reagenzien für die lineare nrLAM-PCR Reaktion.

dH ₂ O	42,5-x µl
10x PCR Puffer	5 µl
dNTP (0,5 mM)	1 µl
Primer 1 (0,17 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (0,17 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA	x
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.22: Programmparameter der linearen nrLAM-PCR Reaktionen.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 sek	
Annealing	58°C/60°C	45 sek	2x50 Zyklen
Extension	72°C	5 sek	

2. „Magnetic Capture“

Um kurze Fragmente zu entfernen, wurden die linearen PCR-Produkte mittels Microcon-50 (Millipore) aufgereinigt. Das Volumen jedes PCR-Produktes wurde mit dH₂O auf 500 µl eingestellt, auf einen Microcon-50 Filter pipettiert, für 12 min bei 12600 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 10 µl dH₂O auf die Filteroberfläche und 2 min Inkubation wurde das PCR-Produkte aus dem invertierten Filter bei 3600 rpm für 3 min in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert und mit dH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Das Binden der aufgereinigten Fragmente an „Beads“ wurde wie bei der LAM-PCR (**Schritt 3**) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte allerdings nicht Ü.N. sondern für 2 Stunden.

3. Ligation einer einzelsträngigen Linkerkassette

Die Ligation der Linkerkassette erfolgte an der Festphase. Die Proben wurden zunächst gegen ein MF exponiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen mit 100 µl dH₂O wurden die Proben in 10 µl Ligationsansatz (**Tabelle 2.23**) resuspendiert und anschließend Ü.N. auf einem Kreisschüttler bei 300 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit dH₂O auf 100 µl aufgefüllt, gegen ein MF exponiert und der Überstand verworfen. Nach dem Waschen mit 100 µl dH₂O wurden die Proben in 5-10 µl dH₂O resuspendiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.23: Reagenzien für die T4-RNA-Ligase Reaktionen.

dH ₂ O	1 µl
T4 RNA-Ligase	1 µl
LC1-rev (10 pmol/µl)	1 µl
10x Puffer	1 µl
50% PEG 8000	5 µl
Hexamin-CoCl ₂ (10 mM)	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

4. Erste und zweite exponentielle PCR

2 - 4 µl des nrLAM-PCR-Produktes wurden für die erste exponentielle PCR Reaktion verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch „Magnetic Capture“ angereichert und 2 µl des Denaturierungsproduktes in die zweite exponentielle PCR eingesetzt. Die Durchführung des „Magnetic Capture“ kann dem Protokoll der LAM-PCR (**Schritt 9**) entnommen werden. **Tabelle**

2.24 und 2.25 zeigen die für die exponentiellen PCR Reaktionen verwendeten Reagenzien und das PCR-Programm. Für gammaretroviral transduzierte Proben wurde eine Annealing-Temperatur von 58°C, für lentiviral transduzierte Proben eine Annealing-Temperatur von 60°C verwendet. Um weiterhin die Entstehung von sehr langen Fragmenten zu vermeiden wurde für beide exponentielle PCR Reaktionen die Elongation auf 5 sek reduziert. Bei der ersten PCR wurde keine finale Elongation (Termination) durchgeführt, nur bei der zweiten exponentiellen PCR beinhaltete das PCR-Programm eine Termination von 2 min.

Tabelle 2.24: Reagenzien für die exponentiellen PCR Reaktionen.

dH ₂ O	40,5-x µl
10x PCR Puffer	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer 1 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (16,7 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA	2-4 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.25: Programmparameter der exponentiellen PCR Reaktionen.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 sek	
Annealing	58°C/60°C	45 sek	10 Zyklen
Extension	72°C	5 sek	
Denaturierung	90°C	2 min	
Denaturierung	90°C	45 sek	
Annealing	58°C/60°C	45 sek	25 Zyklen
Extension	72°C	5 sek	
Termination	72°C	2 min	Nur für die 2. exp. PCR

2.2.14 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mithilfe 2%iger Agarosegele und hochauflösender Kunststoffgele (Spreadex EL 1200). Die Kunststoffgele wurden von der Firma Elchrom erworben. Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wurden 2g Agarose und 100 ml 1x TBE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde nach Abkühlen des Gemisches 7,5 µg Ethidiumbromid dazugegeben und die Lösung in einen Gelträger gegossen. Die Laufbedingungen in 1x TBE-Puffer betragen 5 V/cm Elektrodenabstand der verwendeten Elektrophoresekammer. Die Kunststoffgele erhalten kein Ethidiumbromid und wurden somit nach dem Lauf für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg EtBr/ml dH₂O) gefärbt. Es wurde jeweils 10 µl PCR-Produkt geladen.

2.2.15 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung unter Verwendung des „QIAquick® PCR Purification Kit“ von Qiagen aufgereinigt. Hierfür wurden die Proben mit dem 5-fachen Volumen an Puffer PB vermischt und auf eine Säule geladen. Die Zentrifugation der Säule erfolgte für eine 1 min bei 13000 rpm. Anschließend wurde die Säule 2-mal mit 750 µl 35%iger Guanidinhydrochlorid-Lösung und einmal mit 750 µl PE Puffer gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte für die Waschschrte ebenfalls für 1 min bei 13000 rpm. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wurde die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. 30 µl dH₂O wurden auf die Säule pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 min bei 13000 rpm). Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

2.2.16 Fusionsprimer-PCR

Die Fusionsprimer-PCR wurde durchgeführt, um an beide Enden der PCR-Amplikons die für die Pyrosequenzierung (GS FLX) benötigten Adaptoren anzuhängen. An die Linkersequenz wurde ein biotinylierter Adaptor angehängt, der es ermöglicht die Fragmente an „Beads“ zu binden. An die LTR-Sequenz wurde ein Adaptor angehängt, der es wiederum ermöglicht die Sequenzierung zu starten. Der für die LTR-Sequenz verwendete Oligonukleotid enthält weiterhin eine für jede Probe spezifische Erkennungssequenz von 2-6 bp, die es ermöglicht mehrere Proben parallel sequenzieren zu können. 40 ng aufgereinigtes PCR-Produkt (sowohl LAM-PCR als auch nrLAM-PCR) wurde für die Fusionsprimer-PCR verwendet. Die verwendeten

Fusionsprimer (FuP) setzten sich aus der von der Firma Roche publizierten Sequenz für den FuP A (5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG-3') und FuP B (5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3') (Margulies et al. 2005) und einer Sequenz des 3'-lentiviralen LTR (FuP A-LTR LV) oder 5'- bzw. 3'-onkoretroviralen LTR (FuP A-LTR-RV) bzw. der Linkerkassette (FuP B-LK) zusammen. Die Sequenz der Fusionsprimer ist in **Abschnitt 2.1.3** zu finden. Das Pipettierschema und die Reaktionsbedingungen sind in den **Tabellen 2.26** und **2.27** dargestellt. Für gammaretroviral transduzierte Proben wurde eine Annealing-Temperatur von 58°C, für lentiviral transduzierte Proben eine Annealing-Temperatur von 60°C verwendet.

Tabelle 2.26: Reagenzien für die Fusionsprimer-PCR.

dH ₂ O	42,5-x µl
10x PCR Puffer	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
FuP A-LTR (10 pmol/µl)	0,5 µl
FuP B-LK (10 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA (40 ng)	x µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.27: Parameter des PCR Programmes der Fusionsprimer PCR.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 sek	
Annealing	58°C/60°C	45 sek	12 Zyklen
Extension	72°C	5 sek	
Termination	72°C	5 min	

Die Produkte der Fusionsprimer-PCR wurden wie in **Abschnitt 2.2.15** beschrieben aufgereinigt und die Konzentration mithilfe eines Nanodrop Spektrophotometer bestimmt. Für jede Kammer der zur Sequenzierung benutzten Pikotiterplatte wurden die unterschiedlich markierten Proben zusammengemischt.

2.2.17 Sequenzierung

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Integrationsstellen wurden mithilfe der Pyrophosphat-Sequenzieretechnologie (GS FLX) sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) oder in der Abteilung „Genomics and Proteomics Core Facilities“ des Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte automatisiert über ein in unserer Gruppe etabliertes bioinformatisches Programm. Die Sequenzen, die keine LTR-Sequenz oder einen LTR-Anteil < 20 bp aufweisen, wurden nicht weiterbearbeitet. Bei den restlichen Sequenzen wurde der LTR- und der Linker-Anteil entfernt („Trimmen“) und die Sequenz der genomischen DNA weiterbearbeitet. Gleiche Sequenzen wurden zusammengefasst und mithilfe der frei zugänglichen „BLAST Like Alignment Tool“ (BLAT) Software (<http://genome.ucsc.edu/>) der University of California, Santa Cruz (UCSC) mit dem jeweiligen Genom abgeglichen. Hierfür müssen die Sequenzen mindestens 20 bp lang sein. Für die in dieser Arbeit analysierten humanen Sequenzen wurde die Genomversion März 2006, für die murinen Sequenzen die Genomversion Juli 2007 verwendet. Nur Sequenzen, welche eindeutig dem entsprechenden Genom zugeordnet werden konnten (mindestens 95% Identität), wurden in den weiteren Analysen berücksichtigt. Die genaue Integrationsstelle befindet sich am ersten genomischen Nukleotid, welches an die Vektor-LTR Region angrenzt. Für Sequenzen, die mehrfache Übereinstimmungen mit dem jeweiligen Vergleichs-genom zeigten („Multiple Hit“) wurde kein Integrationsort angegeben. Die bioinformatische Auswertung lieferte Informationen über die genaue Lokalisation des Integrationsortes, die Orientierung des Vektors im Genom, den Abstand zum nächstgelegenen RefSeq Gen (bei Integrationen in oder stromaufwärts eines Gens der Abstand zu dessen Transkriptionsstartpunkt, bei Integrationen stromabwärts des Gens zu dessen Transkriptionseende), die Entfernung zur nächstgelegenen CpG-Insel und den Abstand zum nächstgelegenen repetitiven Element sowie die Art des Elements. Diese Informationen wurden zu weiteren Analysen in eine Excel Tabelle exportiert.

2.2.18 „Realtime“-PCR

Die quantitative Analyse des Beitrags einzelner Integrationsklone wurde mithilfe der „Realtime“-PCR durchgeführt (absolute Quantifizierung). Hierfür wurde zunächst durch spezifische Amplifikation eines Fragmentes und anschließender Aufreinigung ein Standard hergestellt. Eine Verdünnungsreihe des Standards und die zu untersuchenden Proben wurden für die „Realtime“-PCR verwendet. Nachfolgend werden die einzelnen Schritte beschrieben.

1. Exponentielle PCR zur Erstellung des Standards

Die benötigten Reagenzien und die Reaktionsbedingungen sind dem **Abschnitt 2.2.10** zu entnehmen. Es wurden 2-mal 100 ng DNA einer Patientenprobe für die PCR Reaktion verwendet. Die zu untersuchende Integrationsstelle wurde durch Verwendung eines LTR-Primers und einem Primer, der in der genomischen DNA bindet, amplifiziert. Das Fragment diente als Standard für die „Realtime“-PCR. Für die nachfolgende „Realtime“-PCR wurden genestete Primer verwendet, die ebenfalls die zu untersuchende Integrationsstelle amplifizieren.

2. Aufreinigung des amplifizierten Fragmentes

Das restliche PCR-Produkt wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels eines 2%igem Agarosegels (**Abschnitt 2.2.14**) anschließend durch Verwendung des „High Pure PCR-Produkt Purification Kit“ von Roche aufgereinigt. Hierfür wurden die beiden Reaktionsansätze zusammenpipettiert und mit dH₂O auf 100 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 500 µl Binde-Puffer zu der Probe wurde diese auf eine Säule pipettiert und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte durch pipettieren von 500 µl bzw. 200 µl Wasch-Puffer auf die Säule und Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Durchfluss verworfen. Für die Elution wurden 30 µl Elutions-Puffer auf die Säule pipettiert und diese für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe kurz gevortext, erneut bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert.

3. Verdünnung des Standards und der Proben

Die exakte Kopienzahl des Standards wurde mithilfe der Fragmentlänge und der Konzentration (gemessen mithilfe eines NanoDrop Spektrophotometers) bestimmt und eine Verdünnungsreihe von 2×10^{10} bis 2×10^{-1} angesetzt. Der Standard wurde weiterhin auf 1×10^0 verdünnt. Die

Verdünnung erfolgte in MS2RNA+dH₂O. Die MS2RNA fungierte als „Carrier“ und diente dazu, dasselbe Milieu zu schaffen, das auch bei den zu untersuchenden Proben vorlag. Die Proben wurden auf 4ng/μl mit dH₂O verdünnt.

4. Absolute Quantifizierung mittels „SYBRGREEN I“

Für die absolute Quantifizierung des Beitrags einzelner Integrationsklone wurde der „SYBRGREEN I“ Mix von Roche verwendet. **Tabelle 2.28** zeigt die Reaktionsbedingungen. In eine 96 well Platte wurde zunächst 15 μl des Reaktionsmixes vorgelegt. Anschließend wurden 5 μl des Standards (angefangen mit der Verdünnung 2x10⁵ bis 2x10⁻¹, abschließend 1x10⁰) in die Wells pipettiert, so dass eine Verdünnungsreihe von 1x10⁶ bis 1x10⁰ und zusätzlich 5x10⁰ vorliegt. Von den verdünnten Proben wurden ebenfalls 5 μl für die „Realtime“-PCR verwendet, dies entsprach einer DNA-Menge von 20 ng. Sowohl der Standard als auch die Proben wurden repetitiv analysiert. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und für 2 min bei 1500 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die „Realtime“-PCR mithilfe des „LightCycler LC480“ Gerätes von Roche. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem LC480-Programm von Roche. **Abbildung 2.1** zeigt das Pipettierschema der 96 well Platte.

Tabelle 2.28: Reagenzien für die „Realtime“-PCR.

dH ₂ O	400 μl
LC-Primer 1 (10 pmol/μl)	50 μl
LC-Primer 2 (10 pmol/ml)	50 μl
„SYBRGREEN I“ Mix	1000 μl
Gesamtvolumen	1500 μl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	H ₂ O	1x10 ⁶			1x10 ⁵			1x10 ⁴					
B	1x10 ³						1x10 ²						
C	1x10 ¹								1x10 ⁰				
D	1x10 ⁰				5x10 ⁰								
E	Probe				Probe				Probe				
F	Probe				Probe				Probe				
G	Probe				Probe				Probe				
H	Probe				Probe								H ₂ O

Abbildung 2.1: Beladungsschema der 96 well Platte für die „Realtime“-PCR. Zunächst wurde der Standard (1x10⁶-5x10⁰ Kopien) repetitiv und anschließend die Proben ebenfalls repetitiv (4-mal jede Probe) aufgetragen. Als Negativkontrollen dienten zweimal 5 µl H₂O, die am Anfang und am Ende der Platte pipettiert wurden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Genomische Zugänglichkeit der Integrationsstellenanalyse und Weiterentwicklung der LAM-PCR

Integrationsstellenanalysen sind in präklinischen und klinischen Gentherapiestudien zentraler Bestandteil zur Bestimmung der Sicherheit der verwendeten Vektorsysteme und zur Untersuchung der Geweberegeneration mit genkorrigierten Zellen. Die LAM-PCR stellt hierfür die sensitivste und effektivste Methode dar (Schmidt et al., 2007; Schmidt et al., 2009). Die Verwendung von Restriktionsenzymen aller zur Verfügung stehender Verfahren zur Integrationsstellenanalyse führt zu einem Restriktionslängenpolymorphismus, da jedes amplifizierte Fragment eine für sich spezifische Länge aufweist. Diese Länge hängt von der Entfernung des nächstgelegenen Restriktionsmotifs zur Integrationsstelle ab.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein mathematisches Modell entworfen werden, um die Detektierbarkeit der Integrationsstellen im humanen Genom in Abhängigkeit vom verwendeten Restriktionsenzym berechnen zu können. Weiterhin sollte eine Methode für die Integrationsstellenanalyse etabliert werden, die es ermöglicht den Restriktionsverdau und somit den Restriktionslängenpolymorphismus zu umgehen (nicht-restriktive (nr) LAM-PCR).

3.1.1 Die Erstellung eines mathematischen Modells zur Abschätzung des für die LAM-PCR zugänglichen humanen Genoms

In Zusammenarbeit mit der Firma Genomining (Montrouge, Frankreich) wurde ein mathematisches Modell erstellt, das die Zugänglichkeit des humanen Genoms für die Integrationsstellenanalyse unter Verwendung der LAM-PCR bestimmen kann. Mithilfe dieses Modells konnte die Abhängigkeit der Detektierbarkeit von Integrationsstellen vom jeweilig verwendeten Restriktionsenzym untersucht und die für die LAM-PCR effizientesten Enzyme und Enzym-Kombinationen bestimmt werden.

3.1.1.1 Die Bestimmung der genomischen Zugänglichkeit der Integrationsstellenanalyse

Im ersten Schritt dieses Projektes wurde zunächst der Anteil des zugänglichen Genoms für die Integrationsstellenanalyse bestimmt. Das humane Genom enthält zum Teil nicht analysierbare repetitive Sequenzen, die keiner definierten Position im humanen Genom zugeordnet werden können. Der analysierbare Anteil des humanen Genoms beträgt ~93% (Lander et al., 2001; Bovee et al., 2008). Das analysierbare humane Genom kann man weiter unterteilen in den amplifizierbaren und den nicht-amplifizierbaren Anteil. Die Amplifizierbarkeit der Integrationsstellen ist abhängig von der nächstliegenden Erkennungssequenz des verwendeten Restriktionsenzym. Der 1 kb Radius um eine Integrationsstelle kann näherungsweise als effizient amplifizierbar angesehen werden. Von den amplifizierbaren DNA-Fragmenten kann wiederum nur ein Teil eindeutig einer Position im humanen Genom zugeordnet werden (zuordenbares Genom). Zu dem nicht-zuordenbaren Genom zählen beispielsweise Fragmente die eine Länge < 20 bp aufweisen. Das analysierbare, amplifizierbare und zuordenbare Genom bildet schließlich den Anteil, der für die Integrationsstellenanalyse zugänglich ist (zugängliches Genom) (Abbildung 3.1).



Abbildung 3.1: Darstellung des für die Integrationsstellenanalyse zugänglichen humanen Genoms. Retrovirale Integrationsstellen, die amplifiziert, sequenziert und einer eindeutigen Position zugeordnet werden können, stellen das zugängliche humane Genom dar. bp, Basenpaare. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

3.1.1.2 Die Zugänglichkeit des Genoms für die Integrationsstellenanalyse wird beeinflusst durch das Restriktionsenzym und die Amplifikationslänge

Als nächstes wurde die Verteilung der Erkennungssequenzen von den am häufigsten in der LAM-PCR verwendeten Restriktionsenzymen ermittelt. Alle Restriktionsenzyme weisen ein 4 bp Restriktionsmotif auf („4 bp cutters“). Die Analyse zeigte deutliche Unterschiede bei der Häufigkeitsverteilung der Restriktionsmotive im humanen Genom. So kommen Motive ohne die Basen CG mit einer durchschnittlichen Distanz zwischen zwei Motiven von 133-566 bp viel

häufiger im humanen Genom vor verglichen mit CG-Motiven, bei denen der durchschnittliche Abstand 1246-3941 bp beträgt (**Tabelle 3.1**).

Tabelle 3.1: Die Verteilung der 4 bp-Erkennungsmotive der am häufigsten verwendeten Restriktionsenzyme („4 bp cutters“). bp, Basenpaare. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Restriktionsenzym	Erkennungsmotiv	Mittelwert des Abstandes zwischen zwei aufeinander folgenden Motiven [bp]	Standardabweichung [bp]
<i>Tsp509I</i>	AATT	133,32	181,11
<i>MseI</i>	TTAA	150,17	213,8
<i>NlaIII</i>	CATG	208,93	224,91
<i>MaeI</i>	CTAG	368,08	389,59
<i>MboI</i>	GATC	401,35	419,68
<i>RsaI</i>	GTAC	566,75	606,12
<i>HpaII</i>	CCGG	1246,19	2199,15
<i>HpyCH4IV</i>	ACGT	1330,49	1441,09
<i>HinPII</i>	GCGC	1728,91	3148,72
<i>TaqI</i>	TCGA	1893,08	2088,65
<i>FmnDII</i>	CGCG	3941,91	8721,09

Die Bestimmung der durch die LAM-PCR erzielbaren effektiven Amplifikationslänge erfolgte mithilfe der Verwendung eines Datensatzes von 7340 eindeutig zuordenbaren Integrationsstellen einer polyklonalen Untersuchungsprobe. Diese konnten durch die LAM-PCR Analyse transduzierter T-Zellen mit den Restriktionsenzymen *MseI*, *HinPII* und *HpyCH4IV* detektiert werden. Die durchschnittliche Amplikon-Länge (inklusive LTR- und Linkeranteil) bei diesem Datensatz betrug 185,5 bp. Aus diesem Grund wurde die maximale Fragmentlänge, die effizient amplifiziert und sequenziert werden kann, in unserer Analyse auf 200 bp (exklusive LTR- und Linkeranteil) festgelegt.

In **Abbildung 3.2** ist die genomische Zugänglichkeit der Integrationsstellenanalyse für eine DNA-Region von 250 bp dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit der Detektion einer Integration steigt mit einer Distanz zur Restriktionsstelle von > 20 bp stark an und erreicht ein Plateau bei einer Distanz zwischen 31 und 200 bp. Ist der Abstand zu der Restriktionsschnittstelle > 200 bp, so ist die Integration mit der LAM-PCR in einer polyklonalen Probe nicht amplifizierbar und nachweisbar. Bei einer DNA-Länge < 20 bp ausgehend von der Schnittstelle ist dieses Fragment nicht zuordenbar, d.h. diese Fragmente sind für die Integrationsstellenanalyse ebenfalls nicht zugänglich.

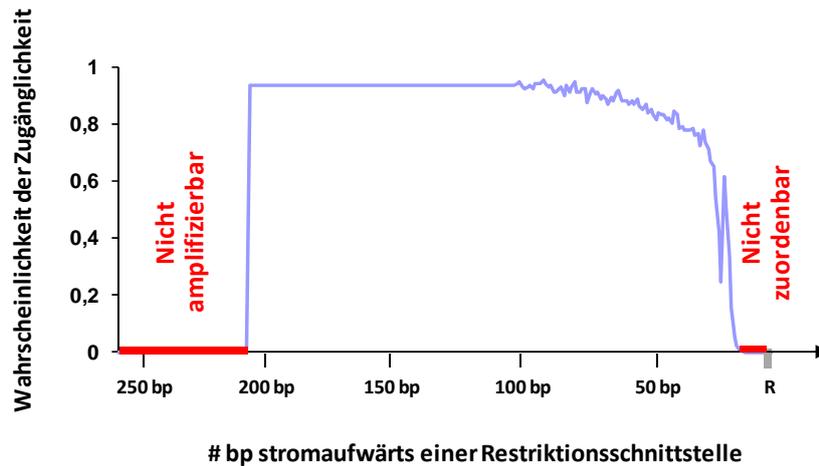


Abbildung 3.2: Das für die Integrationsstellenanalyse zugängliche Genom am Beispiel einer 250 bp langen DNA-Region. Die blaue Kurve stellt innerhalb einer DNA-Region von 250 bp den amplifizierbaren Anteil dar (1-200 bp). Fragmente < 20 bp können im Genom nicht eindeutig zugeordnet werden, Fragmente > 200 bp sind nicht mehr effizient amplifizierbar. Innerhalb des amplifizierbaren Bereiches steigt die Wahrscheinlichkeit der Zugänglichkeit zunächst an (20-30 bp) und erreicht dann ein Plateau (31-200 bp). bp, Basenpaare; R, Restriktionsschnittstelle. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Die Berechnung des für die Integrationsstellenanalyse zugänglichen Genoms für die Restriktionsenzyme mit einem 4 bp Erkennungsmotiv (**Tabelle 3.1**) zeigte, dass die häufig vorkommenden nicht CG-Motive bei der Integrationsstellenanalyse einen weitaus größeren Teil des Genoms abdecken verglichen mit den CG-Motiven. Das effizienteste nicht-CG Restriktionsmotiv AATT erzielt eine genomische Zugänglichkeit von 54,5%, wohingegen das effizienteste CG Restriktionsmotiv lediglich eine Zugänglichkeit von 11,2% erreicht (**Abbildung 3.3**).

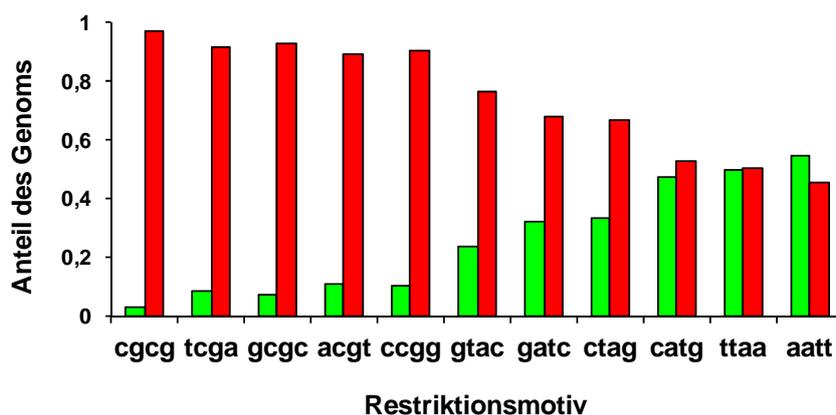


Abbildung 3.3: Modellierung des für die Integrationsstellenanalyse zugänglichen Genoms für die am häufigsten verwendeten 4 bp Restriktionsenzyme („4 bp cutters“). Die genomische Zugänglichkeit für CG-Motive liegt nur zwischen 2,9% und 11,2%, wohingegen die Verwendung von nicht CG-Motiven zu einer Abdeckung des humanen Genoms von 23,5%-54,5% führt. ‚Rot‘ unterlegt stellt den Anteil des nicht zugänglichen Genoms und ‚grün‘ den Anteil des zugänglichen Genoms dar. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Die Kombination von mehreren Restriktionsenzymen mit einem nicht CG-Erkennungsmotiv konnte die Detektierbarkeit der Integrationsstellen von 54% bei der Verwendung eines Enzyms auf 74% bis 86% unter der Verwendung von zwei bis vier Enzymen steigern. Die Verwendung der fünf effizientesten nicht CG-Motive erhöhte den zugänglichen Anteil des humanen Genoms für die Integrationsstellenanalyse auf 88,7% (**Abbildung 3.4**).

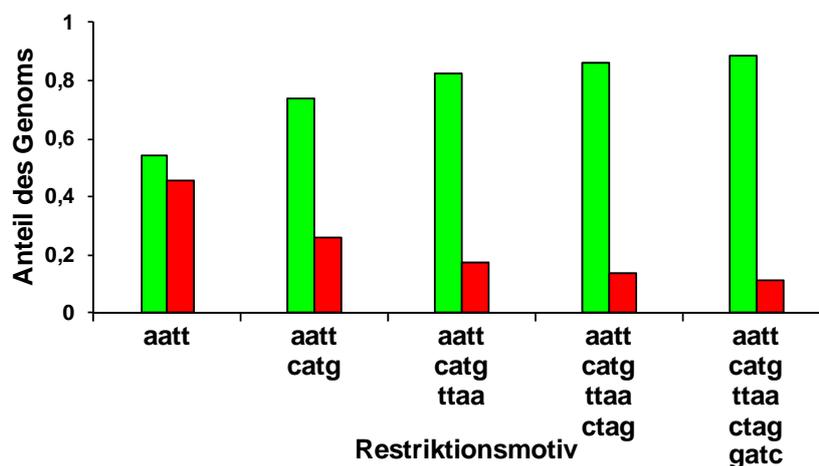


Abbildung 3.4: Modellierung des für die Integrationsstellenanalyse zugänglichen Genoms unter Verwendung von bis zu fünf nicht CG-Motiven. Die Kombination von zwei, drei, vier oder fünf verschiedenen Restriktionsenzymen mit einem nicht CG-Motiv für die Integrationsstellenanalyse kann den Anteil des zugänglichen Genoms von 54% bei der Verwendung eines nicht CG-Motives auf 74%, 82%, 86% bzw. 88% steigern. ‚Rot‘ unterlegt stellt den Anteil des nicht zugänglichen Genoms und ‚grün‘ den Anteil des zugänglichen Genoms dar. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Im nächsten Schritt dieses Projektes wurde das für die Integrationsstellenanalyse zugängliche Genom in Abhängigkeit der Amplifikationslänge berechnet. Für die Amplifikationslänge wurde eine Spanne zwischen 200 bp und 1000 bp gewählt. **Abbildung 3.5 a** zeigt die genomische Zugänglichkeit der Integrationsstellen bei verschiedenen Amplifikationslängen für das Restriktionsmotiv CTAG. Die Analysen ergaben, dass mit zunehmender Amplifikationslänge der Anteil des zugänglichen Genoms ebenfalls ansteigt. Bei einer Amplifikationslänge von 200 bp konnten wir für das CTAG-Motiv 33,1%, bei einer Amplifikationslänge von 500 bp 63,2% und bei einer Amplifikationslänge von 1000 bp 81,6% der Integrationsstellen detektieren. Die Abhängigkeit der genomischen Zugänglichkeit von der Amplifikationslänge konnte ebenfalls für die anderen in dieser Studie untersuchten 4 bp Restriktionsmotive und für die Kombination der Restriktionsmotive CTAG und CATG beobachtet werden (**Abbildung 3.5 b**).

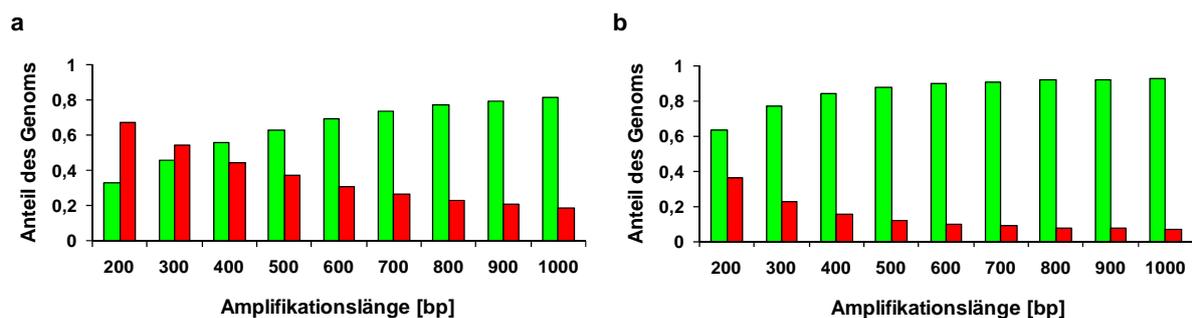


Abbildung 3.5: Darstellung der für die Integrationsstellenanalyse genomischen Zugänglichkeit in Abhängigkeit der Amplifikationslänge für das Restriktionsmotiv CTAG (a) und für die Kombination der Motive CTAG und CATG (b). Sowohl für das Restriktionsmotiv CTAG (a) als auch für die Kombination der Motive CTAG und CATG (b) führt die Steigerung der Amplifikationslänge ebenfalls zu einem Anstieg der genomischen Zugänglichkeit. bp, Basenpaare. ‚Rot‘ unterlegt stellt den Anteil des nicht zugänglichen Genoms und ‚grün‘ den Anteil des zugänglichen Genoms dar. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

3.1.1.3 Die Validierung des mathematischen Modells

Die Validierung des mathematischen Modells wurde mit präklinischen und klinischen Datensätzen durchgeführt. Die Daten der präklinischen Proben wurden durch Integrationsstellenanalysen lentiviral transduzierter HeLa-Zellen unter der Verwendung des Restriktionsenzym *HpyCH4IV* mit der CG-Erkennungssequenz ACGT gewonnen. Der präklinische Datensatz beinhaltete 182 Integrationsstellen detektiert mit Sanger Sequenzierung und 1981 Integrationsstellen detektiert mit der Pyrosequenzierung (GS FLX). Die klinischen Datensätze stammen von der Analyse der Patientenproben aus einer gammaretroviralen X-SCID und einer gammaretroviralen ADA-SCID Gentherapiestudie. Für diese Analysen wurde das Enzym *HinPII*, das die Erkennungssequenz GCGC aufweist, verwendet. Die Analyse der X-SCID Proben erbrachte 1155, die Analyse der ADA-SCID Proben 1215 Integrationsstellen. In beiden Studien wurden die Integrationsstellen mithilfe der Pyrosequenzierung (GS FLX) detektiert.

Bei allen für die Validierung verwendeten Datensätzen wurde die Integrationsstellenanalyse mit Restriktionsenzymen durchgeführt, deren Erkennungssequenz ein CG-Motiv darstellt. CG-Motive treten durchschnittlich nur alle 1246 bp bis 3941 bp im Genom auf und erbrachten in den vorherigen Analysen eine niedrige genomische Zugänglichkeit für die Integrationsstellenanalyse. Für die Validierung unseres mathematischen Modells wurde zum einen die tatsächliche Verteilung der Amplikonlängen, zum anderen die erwartete Verteilung der Amplikonlängen entsprechend der Verteilung der verwendeten Restriktionsmotive im Genom berechnet. Für alle Datensätze lagen 85%-94% der amplifizierten Fragmente innerhalb von 500 bp und davon ~

63% innerhalb von 200 bp. Die erwartete Verteilung der Fragmentlängen zeigte diese Verschiebung zu kürzeren Fragmenten nicht (**Abbildung 3.6**).

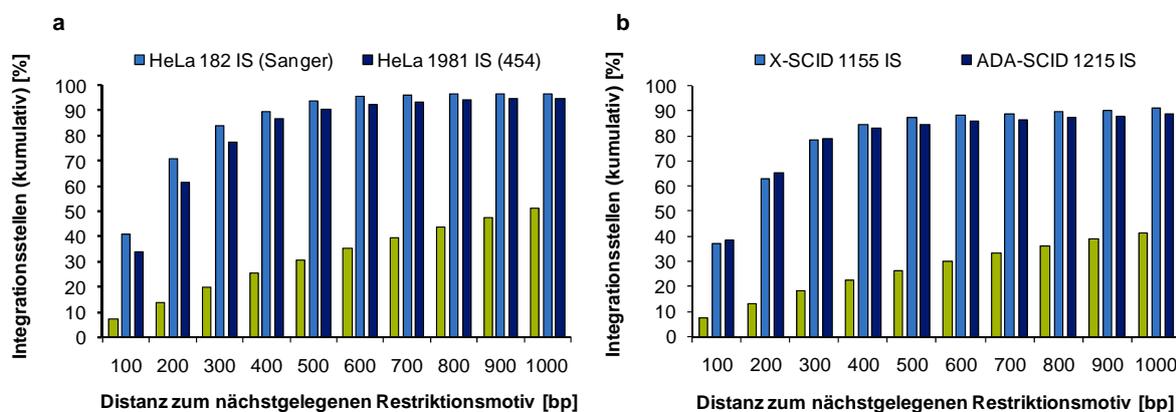


Abbildung 3.6: Validierung des mathematischen Modells. (a) Die präklinischen HeLa-Daten wurden durch Verwendung des Restriktionsenzym *HpyCH4IV* gewonnen. 182 Integrationsstellen konnten mithilfe der Sanger Sequenzierung, 1981 mittels der Pyrosequenzierung (GS FLX) detektiert werden. (b) Die klinischen Datensätze stammen von der Analyse der Patientenproben aus einer X-SCID und einer ADA-SCID Gentherapiestudie mit dem Restriktionsenzym *HinPII*. 1155 Integrationsstellen aus der X-SCID und 1215 Integrationsstellen aus der ADA-SCID Gentherapiestudie, alle detektiert mithilfe der Pyrosequenzierung (GS FLX), wurden für die Validierung verwendet. Die blauen Balken zeigen die Verteilung der experimentell gewonnenen Fragmente und die grünen Balken die theoretisch erwartete Verteilung der Fragmentlängen. Der Vergleich zwischen den theoretisch erwarteten und den experimentell erzielten Fragmentlängen zeigt, dass eine bevorzugte Amplifikation kleinerer Fragmente in allen verwendeten Datensätzen vorliegt. IS, Integrationsstellen; Sanger, Sanger Sequenzierung; 454, Pyrosequenzierung (GS FLX); bp, Basenpaare; X-SCID, „Severe Combined Immunodeficiency“; ADA-SCID, „Adenosin Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

3.1.2 Etablierung einer nicht restriktiven (nr) LAM-PCR

Unser mathematisches Modell zeigte, dass der detektierbare Anteil der Integrationsstellen stark vom verwendeten Restriktionsenzym abhängt. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass bevorzugt kürzere Fragmente (≤ 200 bp) amplifiziert werden. Um eine effiziente Integrationsstellenanalyse durchführen zu können, müssen mehrere Restriktionsenzyme verwendet werden. Die Verwendung mehrere Enzyme ist sehr zeit- und kostenaufwendig, da die Durchführung der LAM-PCR einen Zeitraum von 3 Tagen in Anspruch nimmt.

Die Etablierung einer nicht-restriktiven LAM-PCR im Rahmen dieser Arbeit ermöglichte erstmals die umfassende Analyse der Integrationsstellen ohne Verwendung eines Restriktionsenzym. Sowohl LAM-PCR als auch nrLAM-PCR starten mit einer linearen Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge unter der Verwendung biotinylierter Vektor-Primer. Anschließend werden die biotinylierten Fragmente mithilfe paramagnetischer „Beads“ angereichert. Während der LAM-PCR wird nun der komplementäre DNA-Strang über „Hexanukleotidpriming“ gebildet und mit einem Restriktionsenzym verdaut. Nach der Ligation einer unidirektionalen doppelsträngigen Linker-Sequenz mittels T4 DNA-Ligase an das

unbekannte Ende der genomischen DNA werden die Fragmente von den „Beads“ gelöst und in einer genesteten PCR Reaktion exponentiell amplifiziert. Die nrLAM-PCR dagegen ermöglicht das Umgehen der Doppelstrangsynthese und des Restriktionsverdau. Mithilfe der T4 RNA Ligase wird ein einzelsträngiger Linker an die einzelsträngigen DNA-Fragmente ligiert und anschließend können die Fragmente durch Verwendung genesteter Primer exponentiell amplifiziert werden (**Abbildung 3.7**).

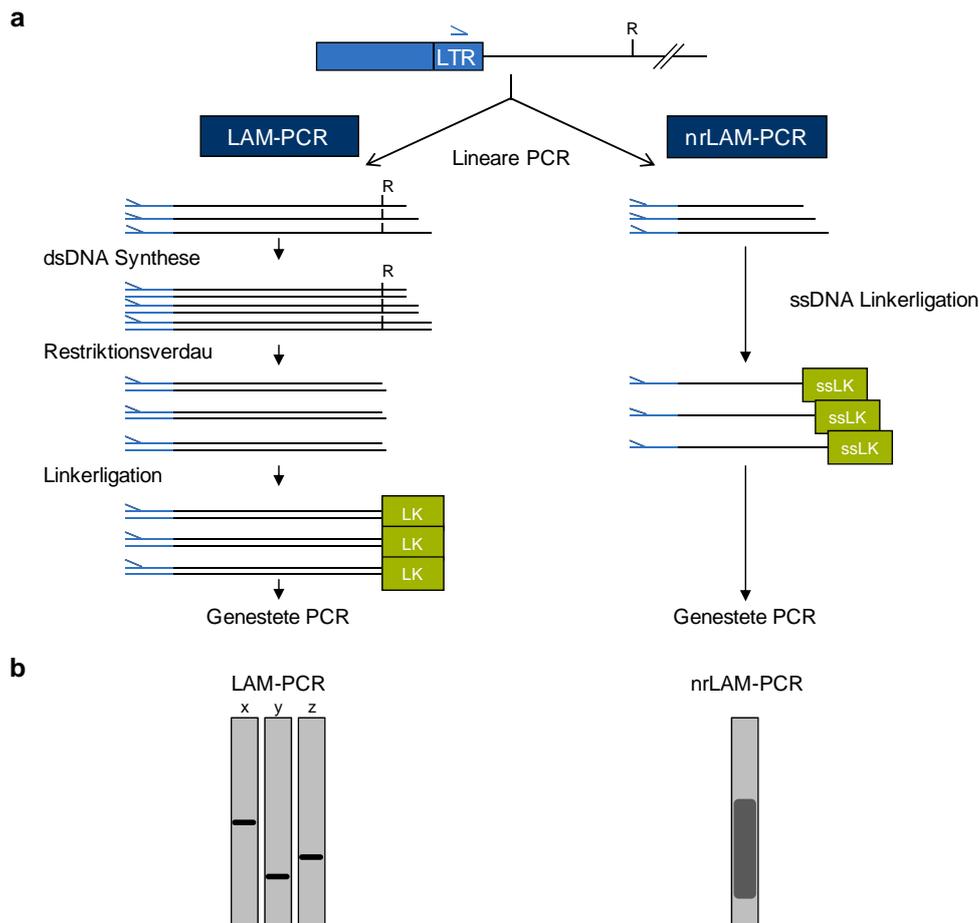


Abbildung 3.7: Vergleich der linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR und der nicht-restriktiven (nr) LAM-PCR. (a) Beide Methoden beginnen mit der linearen Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge unter der Verwendung biotinylierter Primer. Die amplifizierten Fragmente werden anschließend über eine Biotin-Streptavidin Bindung an magnetische „Beads“ gebunden. Bei der LAM-PCR wird an dieser Festphase der zweite DNA-Strang generiert, der Restriktionsverdau durchgeführt und abschließend eine bekannte Linker-Sequenz an das unbekannte Ende des Fragments ligiert. Nach dem Ablösen der Fragmente von den „Beads“, können diese durch genestete PCR exponentiell amplifiziert werden. Die nrLAM-PCR erlaubt das Umgehen der Doppelstrangsynthese und des Restriktionsverdau durch direkte Ligation eines einzelsträngigen Linkers an die einzelsträngigen DNA-Fragmente mithilfe der T4 RNA Ligase. Die Fragmente können anschließend ebenfalls durch Verwendung genesteter Primer exponentiell amplifiziert werden. (b) Der Restriktionsverdau bei der LAM-PCR führt dazu, dass jede Integrationsstelle eine für sich spezifische Fragmentlänge aufweist und dadurch bekommt man definierte Banden auf dem Agarosegel. Bei der nrLAM-PCR dagegen werden für jeden Vektor-Genom-Übergang Fragmente unterschiedlicher Länge generiert, was zu der Entstehung eines „Schmier“ bei der Gelelektrophorese führt. LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; nrLAM-PCR, nicht-restriktive LAM-PCR; LTR, „Long Terminal Repeat“; R, Restriktionsschnittstelle; ds, doppelsträngig; ss, einzelsträngig („single-stranded“); LK, Linkerkassette. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Für die Einzelstrang-Ligation wurde die Linkerkassette am 5'-Ende mit einem Phosphatrest und am 3'-Ende mit einem Didesoxyribonukleotid (Didesoxycytidin) versehen. Das Didesoxyribonukleotid verhindert, dass Linkermoleküle konkatenieren.

Die LAM-PCR führt durch die Verwendung von Restriktionsenzymen dazu, dass jede Integrationsstelle eine für sich spezifische Fragmentlänge aufweist. Daher sind auf einem Agarosegel definierte Banden zu erkennen, die jeweils einer Integrationsstelle entsprechen. Bei der nrLAM-PCR allerdings erhält man für jeden Vektor-Genom-Übergang Fragmente unterschiedlicher Länge die zu einem „Schmier“ auf dem Agarosegel führen (**Abbildung 3.7**).

Um die Fragmentlänge möglichst kurz zu halten (≤ 200 bp) wurde die Elongationszeit auf 5 sek verkürzt, die dNTP-Konzentration für die lineare PCR auf 0,5 mM verringert und für die exponentiellen PCR Reaktionen eine Denaturierungstemperatur von 90°C verwendet (**siehe auch Abschnitt 2.2.13**). **Abbildung 3.8** stellt den Einfluss dieser Veränderungen auf Fragmente unterschiedlicher Länge dar.

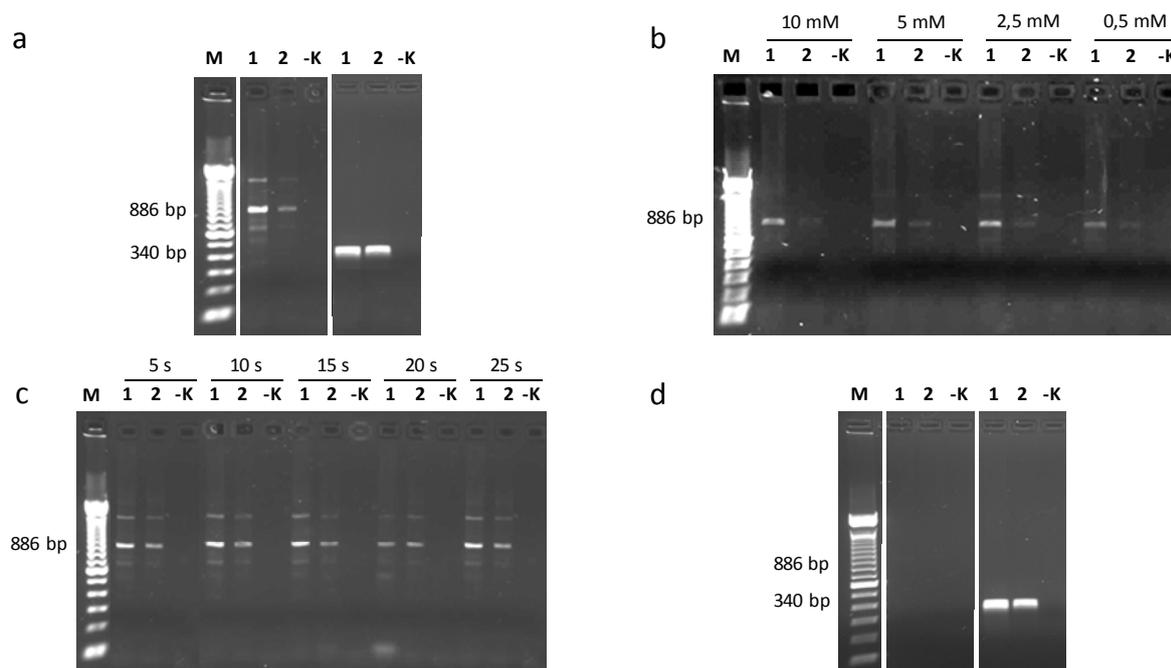


Abbildung 3.8: Einfluss der Elongationszeit, dNTP-Konzentration und Denaturierungstemperatur auf die Amplifikation längerer Fragmente. (a) Eine Denaturierungstemperatur von 95°C ermöglicht die Amplifikation von Fragmenten zwischen 300 bp und 800 bp. (b) Eine Reduktion der dNTP-Konzentration von 10 mM auf 0,5 mM erlaubt weiterhin die Amplifikation von Fragmenten > 800 bp. (c) Die Verwendung einer Elongationszeit zwischen 5 sek und 25 sek erlaubt ebenfalls weiterhin die Amplifikation längerer Fragmente. (d) Bei der Verwendung einer Denaturierungstemperatur von 90°C dagegen werden lange Fragmente (> 800 bp) nicht mehr amplifiziert. M, 100 bp Marker; 1, 100 ng DNA verwendet; 2, 10 ng DNA verwendet; -K, Negativkontrolle; s, Sekunden; mM, millimolar; bp, Basenpaare; dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat.

Die Sequenzierung der nrLAM-PCR Amplikons erfolgte mittels der Pyrosequenzierung (GS FLX). Hierfür wurden die Amplikons in einer weiteren exponentiellen PCR (Fusionsprimer-PCR, **siehe Abschnitt 2.2.16**) mit Fusionsprimern, die die für die nachfolgende Sequenzierung benötigten Sequenzen beinhalten, amplifiziert. Diese Fusionsprimer binden zum einen an den vektorspezifischen (A-LTR) und zum anderen an den linkerspezifischen Teil (B-LK) der Fragmente (**siehe auch Abschnitt 2.1.3**).

Um eine gleichzeitige Sequenzierung mehrerer Fragmente zu gewährleisten, wurde eine individuelle Erkennungssequenz von 2-6 bp in den vektorspezifischen Fusionsprimer eingefügt. **Abbildung 3.9** zeigt eine schematische Darstellung eines Amplifikationsproduktes. Eine vergleichende Analyse zwischen LAM-PCR und nrLAM-PCR und weitere Sequenzierungen mittels nrLAM-PCR sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.



Abbildung 3.9: Schematische Darstellung eines Amplifikationsproduktes der Fusionsprimer-PCR. Für die Pyrosequenzierung (GS FLX) der nrLAM-PCR Fragmente wurde eine Fusionsprimer-PCR durchgeführt. Hierfür wurden ein vektorspezifischer und ein linkerspezifischer Fusionsprimer verwendet, die jeweils einen Teil Vektor- bzw. LTR-Sequenz und einen für die Sequenzierung benötigten Sequenzteil beinhalten. Um die parallele Analyse verschiedener Fragmente zu ermöglichen, wurde in den vektorspezifischen Fusionsprimer eine Erkennungssequenz von 2-6 bp eingebaut. LTR, „Long Terminal Repeat“; nrLAM-PCR, nicht-restriktive lineare amplifikationsmedierte PCR; LK, Linkerkassette; bp, Basenpaare.

3.1.2.1 Vergleichende Analyse lentiviral transduzierter HeLa-Klone mit LAM-PCR und nrLAM-PCR

Die vergleichende Integrationsstellenanalyse von LAM-PCR und nrLAM-PCR wurde an drei HeLa-Einzelzellklonen durchgeführt, die mit einem SIN-lentiviralen Vektor transduziert wurden, der das Transgen *eGFP* unter der Kontrolle eines internen SFFV Promoters exprimiert. Die LAM-PCR wurde mit den Enzymen *MseI* (nicht CG-Motiv) und *HinPII* (CG-Motiv) durchgeführt (**Abbildung 3.10**).

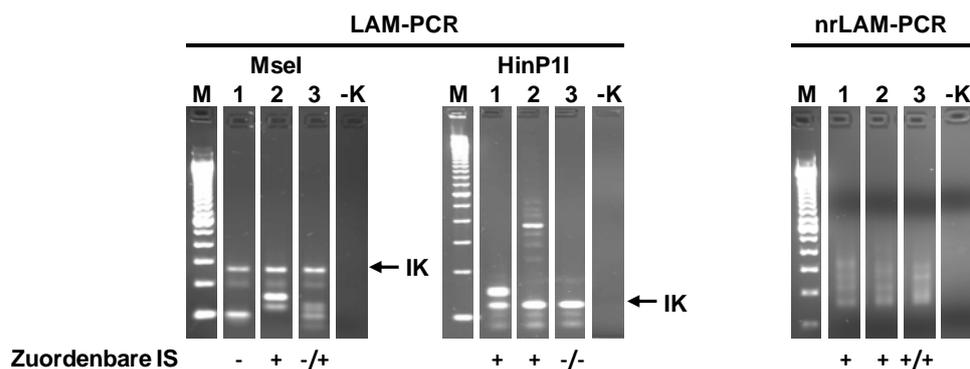


Abbildung 3.10: Vergleichende Analyse lentiviral transduzierter HeLa-Einzelzellklone mit der linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR und der nicht-restriktiven (nr) LAM-PCR. Die LAM-PCR wurde mit den Enzymen *MseI* und *HinPII* durchgeführt. Mithilfe beider PCR-Ansätze konnte jeweils eine Integrationsstelle pro Einzelzellklon detektiert werden. Bei der nrLAM-PCR Analyse konnte zudem noch eine zusätzliche Integrationsstelle für Klon 3 sequenziert werden. Diese Integrationsstelle konnte unter der Verwendung zweier Restriktionsenzyme für die LAM-PCR nicht detektiert werden. Dagegen war ein einziger nrLAM-PCR Ansatz ausreichend alle in den Einzelzellklonen vorhandenen Integrationsstellen darzustellen. LAM-PCR; lineare amplifikationsmedierte PCR; nrLAM-PCR, nicht-restriktive LAM-PCR; M, 100 bp Marker; 1-3; Klone 1-3; -K; untransduzierte humane genomische DNA; IK, internes Vektorkontrollfragment; IS, Integrationsstelle; +, Integrationsstelle konnte amplifiziert, sequenziert und dem humanen Genom zugeordnet werden; -, Integrationsstelle konnte nicht amplifiziert, sequenziert und dem humanen Genom zugeordnet werden. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Mithilfe der LAM-PCR konnte für jeden Einzelzellklon eine Integration detektiert werden. Die Analyse der Klone mit der nrLAM-PCR ermöglichte ebenfalls die Detektion der 3 Integrationsstellen, die mit der LAM-PCR gefunden wurden. Zusätzlich konnte eine weitere Integrationsstelle für Klon 3 detektiert werden, die bei der Analyse der LAM-PCR Ergebnisse nicht auftrat (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Darstellung der lentiviralen Integrationsstellen in HeLa-Einzelzellklonen, die mithilfe der linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR und der nicht-restriktiven (nr) LAM-PCR detektiert wurden. Chr, Chromosom; IS, Integrationsstelle; bp, Basenpaare. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Klon	Chr	IS	Nächstgelegenes RefSeq Gen	Entfernung der IS zum Restriktionsmotiv[bp]		Länge der zuordenbaren nrLAM-PCR Amplikons
				<i>MseI</i>	<i>HinPII</i>	
1	1	150269771	S100A11	5	29	40–308
2	4	74231096	ANKRD17	145	257	22–239
3	6	98199943	C6orf167	5	5993	52–488
3	3	159662801	RSRC1	23	1596	23–445

3.1.2.2 Die Verwendung der nrLAM-PCR in Kombination mit der Pyrosequenzierung (GS FLX) zur Analyse präklinischer und klinischer Proben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene präklinische und klinische Proben mit der nrLAM-PCR analysiert. In Kooperation mit Prof. Dr. Fulvio Mavilio wurden lentiviral transduzierte T-Zellklone von gesunden Probanden hinsichtlich ihrer Integrationsstellen untersucht. Die Analyse der Klone mithilfe der nrLAM-PCR führte zu der Detektion von 5-13 Integrationsstellen (Abbildung 3.11 a).

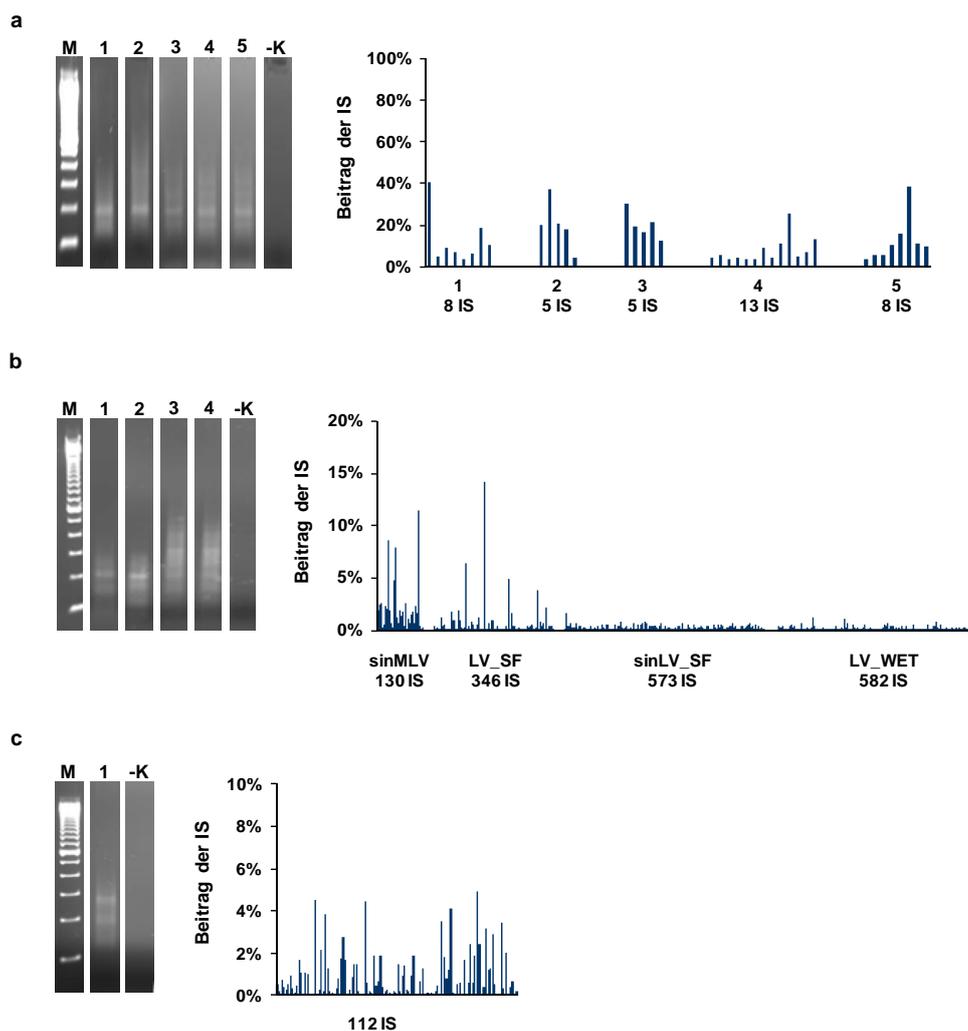


Abbildung 3.11: Die Analyse präklinischer und klinischer Proben mithilfe der nicht-restriktiven (nr) linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR. (a) Bei der Integrationsstellenanalyse lentiviral transduzierter T-Zellklone konnten 5-13 Integrationsstellen detektiert werden. 1-5 stellen die 5 analysierten Klone dar (b) Die Analyse retroviral transduzierter HeLa-Zellen und lentiviral transduzierter *lin*-Zellen erbrachte 130-582 Integrationsstellen. 1 stellt die analysierte HeLa-Probe, 2-4 stellen die analysierten *lin*-Zellen dar. (c) Mithilfe der nrLAM-PCR konnten in einer klinischen X-SCID Patientenprobe 112 Integrationsstellen detektiert werden. 1 stellt die klinische Probe dar. M, 100 bp Marker; -K, untransduzierte humane genomische DNA; IS, Integrationsstellen; sinMLV, „selfinactivating“ (SIN) retroviraler Vektor mit einem internen MLV Promoter; LV_SF, lentiviraler Vektor mit einem SFFV Promoter im LTR; sinLV_SF, SIN lentiviraler Vektor mit einem internen SFFV Promoter; LV_WET, lentiviraler Vektor mit einem synthetischen ET Promoter im LTR; X-SCID, „X-linked Severe Combined Immunodeficiency“. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Die Analyse weiterer präklinischer Proben erbrachte 130-582 eindeutig zuordenbare Integrationsstellen (**Abbildung 3.11 b**). In Kooperation mit Prof. Dr. Odile Cohen-Haguener wurde zum einen die Analyse von HeLa-Zellen, transduziert mit einem SIN onkoretroviralen Vektor, der über einen internen MLV Promoter das Transgen *eGFP* exprimiert und im LTR zusätzlich eine Insulatorsequenz enthält (sinMLV), durchgeführt. Zum anderen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Luigi Naldini transduzierte *lin*- Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit einem lentiviralen Vektor, der das Transgen *eGFP* und einen SFFV-Promoter im LTR enthält (LV_SF), mit einem SIN lentiviralen Vektor, der über einen internen SFFV-Promoter *eGFP* exprimiert (sinLV_SF) und mit einem lentiviralen Vektor, der im LTR den synthetischen ET-Promoter und ebenfalls *eGFP* als Transgen enthält (LV_WET), transduziert. Die Analyse einer polyklonalen Patientenprobe aus einer klinischen X-SCID Gentherapiestudie führte zu der Detektion von 112 Integrationsstellen (**Abbildung 3.11 c**).

3.1.2.3 Die Analyse klonaler Dominanz in einer retroviralen Gentherapiestudie

Im Rahmen der erfolgreichen X-SCID Gentherapiestudie in London wurden 10 Patienten behandelt. Einer der Patienten entwickelte 2 Jahre nach Gentherapie eine akute lymphatische Leukämie (Howe et al., 2008). In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Adrian Thrasher sollten die Integrationsstellen zum Zeitpunkt des Auftretens der Leukämie detektiert und die molekularen Ursachen der Erkrankung untersucht werden. Hierfür wurde DNA aus PBMC von Tag 717 nach Transplantation mithilfe der LAM-PCR unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme analysiert.

Für die LAM-PCR Reaktionen, die vom 5'-Ende ausgehend die Integrationsstellen amplifizieren, wurden die Enzyme *Tsp509I* (AATT) und *HinPII* (GCGC) verwendet. Für die Amplifikation der 3'-Vektor-Genom-Übergänge wurde ebenfalls das Enzym *Tsp509I* (AATT) und das Enzym *MseI* (TTAA) verwendet. Es wurde repetitiv 100 ng, 10 ng und 1 ng DNA in die LAM-PCR eingesetzt. Die Verdünnung der Patienten-DNA sollte dabei helfen mögliche dominante Integrationsklone sichtbar zu machen.

In **Abbildung 3.12** ist das Ergebnis der 5'-LAM-PCR mit dem Enzym *HinPII* und der 3'-LAM-PCR mit dem Enzym *Tsp509I* dargestellt. Bei der Verwendung des Enzyms *HinPII* konnten trotz Verdünnung der Patienten-DNA keine Zeichen eines dominanten Klons entdeckt werden. Wohingegen die Verwendung des Enzyms *Tsp509I* für die Integrationsstellenanalyse bereits bei

einer Input-DNA von 100 ng eine deutliche starke Bande auf der Höhe von 280 bp aufzeigte, die auf einen dominanten Klon hinweist. Die Sequenzierung der LAM-PCR Fragmente führte zur Detektion einer sehr starken Integrationsstelle, die 35 kb stromaufwärts der TSS des Protoonkogens *LMO2* liegt. Die Fragmentgröße der Integrationsstelle stimmte mit der Größe der starken Bande, die bei der 3'-LAM-PCR mit *Tsp509I* sichtbar wurde, überein. Dieser dominante *LMO2*-Klon konnte nur bei der 3'-LAM-PCR mit den Enzymen *Tsp509I* und *MseI*, die beide ein nicht CG-Erkennungsmotiv aufweisen, detektiert werden. Die Verwendung von *Tsp509I* und *HinP1I* für die 5'-LAM-PCR erlaubte die Sequenzierung des dominanten Integrationsklons nicht.

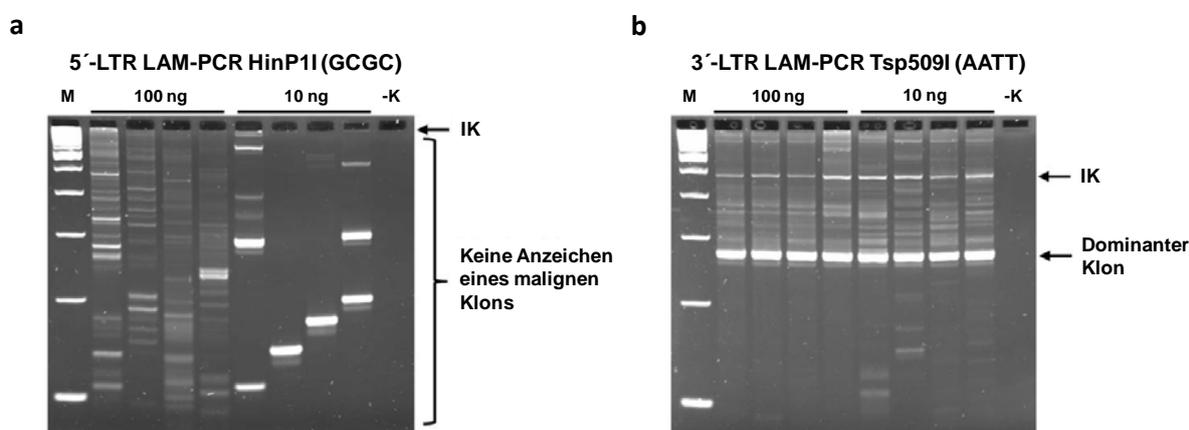


Abbildung 3.12: Integrationsstellenanalyse einer leukämischen X-SCID Patientenprobe mittels der linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR. Um die Integrationsstellen einer leukämischen X-SCID Patientenprobe zu bestimmen, wurde eine 5'-LAM-PCR mit dem Enzym *HinP1I* (a) und eine 3'-LAM-PCR mit dem Enzym *Tsp509I* (b) durchgeführt. Nur die Analyse der Probe mittels 3'-LAM-PCR und dem Enzym *Tsp509I* ermöglichte die Detektion eines dominanten Klons, der eine Integrationsstelle 35 kb stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle des Protoonkogens *LMO2* („LIM Domain Only 2“) trägt. LAM, lineare amplifikationsmedierte PCR; M, 100 bp Marker; 100 ng bzw. 10 ng; 100 ng und 10 ng DNA wurde für die Analyse verwendet; -K, untransduzierte humane genomische DNA; IK, internes Vektorkontrollfragment, X-SCID; „X-linked Severe Combined Immunodeficiency“. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Die Detektion einer Integrationsstelle ist nur möglich, wenn das nächstgelegene Restriktionsmotiv des verwendeten Enzyms innerhalb eines Radius von 1 kb um die Integrationsstelle herum liegt. Die Darstellung der Verteilung der Restriktionsmotive um die *LMO2*-Integration herum, zeigte, dass für die 3'-LAM-PCR mit den Enzymen *Tsp509I* und *MseI* das Erkennungsmotiv innerhalb dieses Radius liegt, wohingegen für die 5'-LAM-PCR mit dem Enzym *HinP1I* die nächstgelegene Erkennungssequenz 1418 bp entfernt ist und somit die Detektion der Integrationsstelle nicht ermöglicht.

Es konnten insgesamt 22 Restriktionsmotive in der Nähe der Integrationsstelle gefunden werden (5'- und 3'-LAM-PCR), die zu 11 Restriktionsenzymen gehören. Von diesen 22 Motiven, können nur 15 für eine LAM-PCR verwendet werden, da die restlichen Motive innerhalb des Vektorbereiches liegen, in denen die LAM-PCR Primer binden. Nur 8 dieser möglichen Restriktionsmotive liegen nah genug an der Integrationsstelle um eine Detektion zu gewährleisten, 7 liegen dagegen außerhalb des 1 kb Radius und können die effiziente Amplifikation des Vektor-Genom-Übergangs nicht gewährleisten (**Abbildung 3.13**). Die Analyse der leukämischen Patientenprobe zeigte, dass die mögliche Detektion eines dominanten Integrationsklons stark abhängig ist vom verwendeten Restriktionsenzym. Obwohl an dem analysierten Zeitpunkt über 90% der Zellen den dominanten *LMO2*-Integrationsklon aufwiesen, konnte dieser in 2 von 4 Versuchsansätzen nicht detektiert werden.

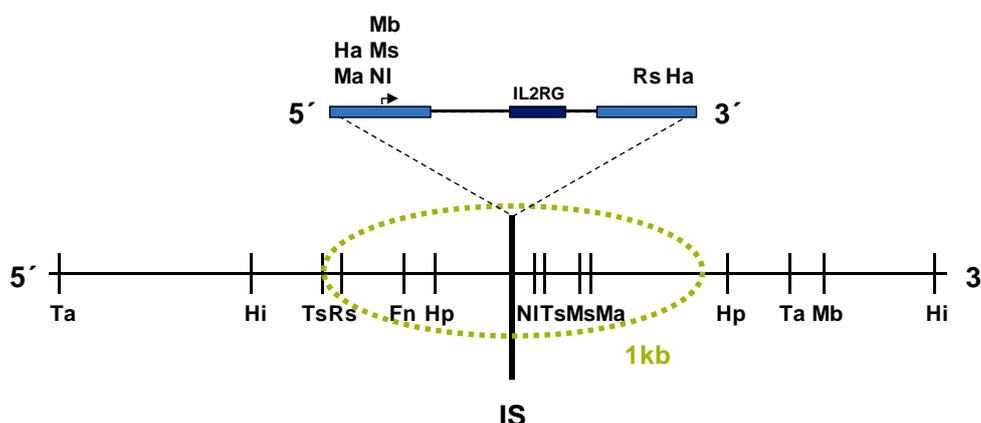


Abbildung 3.13: Limitierung der Integrationsstellenanalyse mittels linearer amplifikationsmediierter (LAM)-PCR durch Restriktionsmotive und Amplifikationslänge. Die Abbildung zeigt die Restriktionsmotive, die um die *LMO2* („LIM Domain Only 2“)-Integrationsstelle der leukämischen X-SCID Probe herum lokalisiert sind. Der grüne Kreis stellt einen 1 kb Radius um die Integrationsstelle dar. 7 der Restriktionsmotive können nicht verwendet werden, da sie innerhalb des Vektorbereichs liegen, in dem die LAM-PCR Primer binden (blaue Boxen). Nur 7 der dargestellten Restriktionsmotive (Rs, Fn, Hp, NI, Ts, Ms, Ma) liegen innerhalb des 1 kb Radius und können daher eine Detektion der Integrationsstelle gewährleisten. Die für die 3'-LAM-PCR verwendeten Enzyme *Tsp509I* (Ts) und *MseI* (Ms) liegen innerhalb dieses Radius, wohingegen die für die 5'-LAM-PCR verwendeten Enzyme *Tsp509I* (Ts) und *HinPII* (Hi) zu weit entfernt von der Integrationsstelle liegen. Ts, *Tsp509I* (AATT); Ms, *MseI* (TTAA); NI, *NlaIII* (CATG); Ma, *MaeI* (CTAG); Mb, *MboI* (GATC); Ha, *HpaII* (CCGG); Hi, *HinPII* (GCGC); Rs, *RsaI* (GTAC); Ta, *TaqI* (TCGA); Hp, *HpyCH4IV* (ACGT); Fn, *FnuDII* (CGCG); IL2RG, „Interleukin 2 receptor gamma“; IS, Integrationsstelle; kb, Kilobasenpaare; X-SCID, „X-linked Severe Combined Immunodeficiency“. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

Die nachfolgende Durchführung eines nrLAM-PCR Ansatzes in Kombination mit der Pyrosequenzierung (GS FLX) ermöglichte die sofortige Detektion der dominanten Integrationsstelle in 98% aller analysierten Zellen (**Abbildung 3.14**).

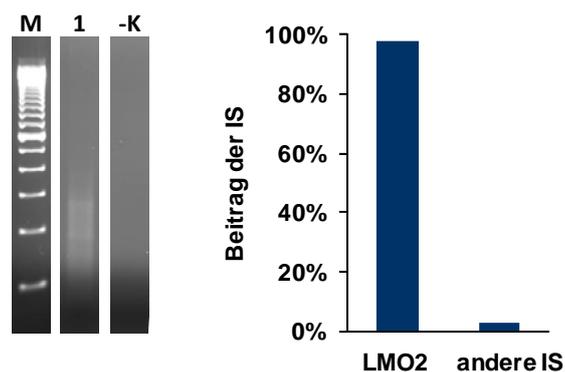


Abbildung 3.14: Analyse der leukämischen X-SCID Patientenprobe mithilfe der nicht-restriktiven (nr) linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR. Die nrLAM-PCR Analyse der leukämischen Patientenprobe erlaubte die Detektion des dominanten *LMO2*-Integrationsklons in 98% aller analysierten Zellen. Links ist die gelektrophoretische Auftrennung der Fragmente dargestellt und rechts die Ergebnisse der Pyrosequenzierung (GS FLX) dieser Fragmente. M, 100 bp Marker; 1, leukämische Patientenprobe; -K, untransduzierte humane genomische DNA; *LMO2*, „LIM Domain Only 2“; IS, Integrationsstellen; nrLAM-PCR, nicht restriktive lineare amplifikationsmedierte PCR; X-SCID, „X-linked Severe Combined Immunodeficiency“. Modifiziert aus Gabriel, Eckenberg, Paruzynski, Bartholomae et al., 2009.

3.2 Die Analyse gammaretroviraler Integrationsstellen in der klinischen Gentherapie

Sowohl in präklinischen als auch in klinischen Gentherapiestudien wurden bereits Nebenwirkungen bei der Verwendung gammaretroviraler Vektoren beobachtet. Daher ist es von größter Bedeutung die Klonalität der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation zu untersuchen und mögliche Auswirkungen der Vektorintegration frühzeitig zu erkennen.

In einer vergleichenden Integrationsstellenanalyse konnte erstmals das Integrationsverhalten gammaretroviraler Vektoren in 5 klinischen und 3 präklinischen Studien genauestens untersucht und verglichen werden. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit eine ausführliche Integrationsstellenanalyse in zwei X-CGD Gentherapiestudien, einer ADA-SCID Gentherapiestudie und einer WAS Gentherapiestudie durchgeführt. In allen Studien wurden gammaretrovirale Vektoren als Transfervehikel verwendet. Die Analysen sollten ermöglichen den Beitrag einzelner Integrationsklone zu den jeweiligen Zeitpunkten an der hämatopoetischen Repopulation zu untersuchen, bevorzugte Integrationsorte zu ermitteln und den möglichen Einfluss des integrierenden Vektors auf die Genexpression zu detektieren.

3.2.1 Vergleichende Integrationsstellenanalyse

Die vergleichende Analyse von 5 gammaretroviralen klinischen Gentherapiestudien (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Glimm et al., 2005; Gaspar et al., 2004; Ott et al., 2006; Aiuti et al., 2009) und 3 präklinischen Studien (Hematti et al., 2004; Kustikova et al., 2007; Cattoglio et al., 2007) sollte dabei helfen das Integrationsmuster gammaretroviraler Vektoren genauer zu studieren und Gemeinsamkeiten zwischen den Studien zu erkennen (Deichmann et al., eingereicht bei Blood 2010).

Für die Detektion bevorzugter Integrationsorte, sogenannte „Common Integration Sites“ (CIS) wurde für diese vergleichende Analyse wie auch für die Analysen in den nachfolgend beschriebenen klinischen Gentherapiestudien folgende Definition verwendet: 2 Integrationsstellen innerhalb von 30 kb bilden eine CIS 2.Ordnung, 3 innerhalb von 50 kb eine CIS 3. Ordnung, 4 innerhalb von 100 kb eine CIS 4.Ordnung und 5 oder mehr Integrationsstellen innerhalb von 200 kb eine CIS 5. oder höherer Ordnung. Die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen klinischen Studien waren nicht Gegenstand dieser vergleichenden Analyse.

Die Analysen zeigten, dass über 40% aller Integrationsstellen in Genloki lokalisiert sind, die weniger als 0,36% des Genoms ausmachen. Von den insgesamt 3441 retroviralen Integrationsstellen aus Prä- und Posttransplant-Proben (humane und Primatenproben) lagen 45% in CIS. Dies ist wesentlich höher als der erwartete Wert von 6,5%, würde man von einer zufälligen Verteilung der Integrationsstellen ausgehen. Hinsichtlich der Mausproben lagen 22% der Integrationsstellen in CIS.

Ein Vergleich zwischen Prä- und Posttransplant-Proben ergab, dass nach der Transplantation signifikant mehr Integrationsstellen in CIS liegen (37% im Vergleich zu 20% vor Transplantation) und CIS 4. und höherer Ordnung häufiger vorkommen (41% im Vergleich zu 11% vor Transplantation). Die Analyse der Genloki, in denen am häufigsten CIS auftreten, zeigte, dass nach der Transplantation bevorzugte Integrationsorte in oder in der Nähe der Protoonkogene *PRDM16*, *MDS1*, *EVII1*, *LMO2*, *CCND2* und *SETBP1* liegen (**Tabelle 3.3**).

Tabelle 3.3: Integrationsstellen in bekannten Protoonkogenen. CIS, „Common Integration Site“; PRDM16, „PR Domain Containing 16“; SETBP1, „SET Binding Protein 1“; LMO2, „LIM Domain Only 2“; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; EVI1, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; CCND2, „CCND2 Cyclin D2“; CML, chronische myeloide Leukämie; X-SCID, „X-linked Severe Combined Immunodeficiency“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“; ADA-SCID, „Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“; F, Frankreich; UK, „United Kingdom“; D, Deutschland; It, Italien. Modifiziert aus Deichmann et al., eingereicht bei Blood 2010.

CIS Lokus	CML	X-SCID F	X-SCID UK	X-CGD D	ADA-SCID It	Primaten-Modell	Maus-Modell
<i>PRDM16</i>				36			1
<i>MDS1-EVI1</i>		2		79	1	7	19
<i>LMO2</i>		5		2	5	1	
<i>CCND2</i>		9			3		
<i>SETBP1</i>	1			7		2	

Der Vergleich der verschiedenen Studien ergab weiterhin, dass die Integration des gammaretroviralen Vektors bevorzugt in oder in der Nähe von genkodierenden Bereichen stattfindet. Sowohl vor als auch nach der Transplantation wurden über 70% aller Integrationsstellen in Genen oder in einer Region ≤ 10 kb um das Gen detektiert. In **Tabelle 3.4** ist zusammenfassend das Integrationsstellenmuster der untersuchten Studien dargestellt.

Tabelle 3.4: Verteilung der Integrationsstellen in den verschiedenen präklinischen und klinischen Studien. RIS, retrovirale Integrationsstellen; prä, Prätransplant-Proben; post, Posttransplant-Proben; TSS, Transkriptionsstartstelle; CML, chronische myeloide Leukämie; X-SCID, „X-linked Severe Combined Immunodeficiency“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“; ADA-SCID, „Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“; F, Frankreich; UK, „United Kingdom“; D, Deutschland; It, Italien; CD34+, humane transduzierte CD34+ Zellen. Modifiziert aus Deichmann et al., eingereicht bei Blood 2010.

	CML	X-SCID F	X-SCID UK	X-CGD D	ADA-SCID It	CD34+	Primaten-Modell	Maus-Modell	Total
Zuordenbare RIS	40	554	560	722	671	589	305	422	3863
RIS prä	-	96	265	-	202	589	-	-	1152
RIS post	40	458	295	722	469	-	305	422	2711
RIS im Gen prä	58%	42%	46%	57%	43%	-	55%	45%	49%
RIS im Gen post	-	57%	52%	-	50%	55%	-	-	53%
RIS in gene +/- 10 kb prä	73%	68%	70%	77%	71%	-	73%	73%	73%
RIS in gene +/- 10 kb post	-	75%	76%	-	68%	75%	-	-	74%
RIS TSS prä	23%	33%	33%	29%	39%	-	27%	39%	34%
RIS TSS post	-	28%	37%	-	28%	33%	-	-	33%

Genexpressionsanalysen zeigten, dass die Integration bevorzugt in oder in der Nähe von exprimierten Genen, allerdings nicht in den am höchsten exprimierten Genen stattfindet. Weiterhin konnte durch „Gene Ontology“ und „Ingenuity Pathway“ Analysen beobachtet werden, dass in Posttransplant-Proben Gene überwiegend von der Integration betroffen sind, die an der Regulation von zellulären Prozessen und an der Regulation von Zelltod beteiligt sind oder Proteinkinase-Aktivität aufweisen. Dies konnte bei den Prätransplant-Proben nicht beobachtet werden. Sowohl vor als auch nach der Transplantation waren weiterhin bevorzugt Gene getroffen, die an der Bildung des hämatopoetischen Systems beteiligt sind. Weitere bevorzugte Genkategorien in Posttransplant-Proben waren Genexpression, Zellwachstum und Zellteilung, Zelltod und Zellzykluskontrolle.

3.2.2 Retrovirale Gentherapie der X-gekoppelten Septischen Granulomatose (X-CGD)

Im Rahmen einer schweizer Gentherapiestudie konnten zwei Kinder im Alter von 5 und 8 Jahren, die an X-CGD leiden, durch *ex vivo* Transduktion CD34+ Zellen mit einem gammaretroviralen Vektor, der unter dem Einfluss eines SFFV Promoters das therapeutische Gen *gp91phox* exprimiert und anschließender autologer Rücktransplantation therapiert werden. Die Patienten wurden vor der Rücktransplantation der autologen Zellen einer Konditionierung mit Busulfan unterzogen. Zu Beginn der Gentherapie lag der Anteil der genkorrigierten Zellen bei Patient 1 bei > 5%, sank allerdings nach einigen Monaten auf 0,1% ab. Trotz dieser niedrigen Genmarkierung, zeigte die Gentherapie über den kompletten beobachteten Zeitraum einen Erfolg. An den späteren analysierten Zeitpunkten kam es wieder zu einem Anstieg auf > 5%. Bei Patient 2 wurden zu Beginn ~ 15% genkorrigierte Zellen detektiert. 3 Monate nach Gentherapie stieg der Anteil an und blieb bis zum letzten analysierten Zeitpunkt bei ~ 90%.

Eine weitere X-CGD Gentherapiestudie wurde in Korea durchgeführt. CD34+ Zellen zweier Patienten im Alter von 9 und 18 Jahren wurden *ex vivo* mit einem MLV-basierenden gammaretroviralen Vektor durchgeführt und nach einer Konditionierung mit Busulfan und Fludarabin den Patienten reinfundiert. Zu Beginn der Gentherapie konnten bei Patient 1 6%-8,3% und bei Patient 2 11,7%-14,7% genkorrigierte Zellen detektiert werden. Innherhalb eines Jahres nach Gentherapie sank der Anteil allerdings auf 0,2%-1%.

In Kooperation mit Prof. Dr. Reinhard Seger und Prof. Dr. Sunyoung Kim haben wir für alle Patienten sukzessiv das klonale Inventar der hämatopoetischen Repopulation analysiert.

3.2.2.1 Klonalitätsanalyse der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation

Die Analyse der Integrationsstellen der schweizer X-CGD Gentherapiestudie

Von Patient 1 der schweizer X-CGD Gentherapiestudie wurden sowohl peripheres Blut und Knochenmark als auch Granulozyten und MNC (aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark) in einem Zeitraum von 24 Tage nach Transplantation bis 1366 Tage nach Transplantation analysiert. Für Patient 2 wurden peripheres Blut, Monozyten, Granulozyten und MNC (aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark) 11 Tage bis 549 Tage nach Transplantation untersucht. Um die größtmögliche genomische Zugänglichkeit für die Integrationsstellenanalyse zu gewährleisten, wurden für die Untersuchungen mit der LAM-PCR jeweils 4 verschiedene Ansätze unter Verwendung von Restriktionsenzymen mit einem nicht CG-Motiv durchgeführt. Da für die meisten Zeitpunkte nur sehr wenig DNA zur Verfügung stand, konnte eine umfangreiche Analyse zusätzlich mit der nrLAM-PCR bisher nur bei einem Zeitpunkt des Patienten 2 durchgeführt werden.

Die Kombination von LAM-PCR/nrLAM-PCR und Pyrosequenzierung (GS FLX) erbrachte für Patient 1 insgesamt 1837 und für Patient 2 2767 eindeutig zuordenbare Integrationsstellen. Die elektrophoretische Auftrennung der Integrationsstellen von Patient 1 zeigte zu Beginn eine polyklonale Repopulation der Hämatopoese. Allerdings konnte an den späteren Zeitpunkten deutlich eine Veränderung hin zu einer oligoklonalen-monoklonalen Situation beobachtet werden. Es war durchgehend bei allen analysierten Zeitpunkten eine starke Bande bei ~198 bp zu erkennen, die auch bei einer Verdünnung der DNA auf 10 ng und 1 ng noch deutlich vorhanden war und zusätzlich dazu führte, dass das interne Vektorkontrollfragment (~150 bp) durch kompetitive Amplifikation der beiden Fragmente nicht mehr detektiert werden konnte (**Abbildung 3.15**).

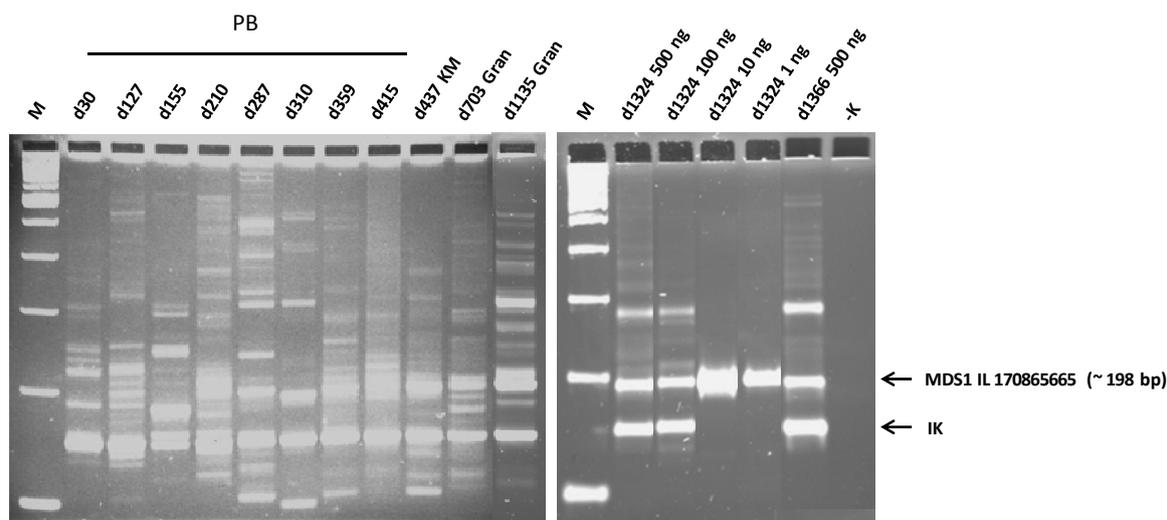


Abbildung 3.15: Integrationsstellenanalyse unter Verwendung der 5'-linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR mit dem Enzym *Tsp509I* des Patienten 1 der schweizer X-CGD Genterapiestudie. Proben zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mittels der linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR angeschaut (1-500 ng DNA) und 10 μ l des PCR-Produktes auf ein hochauflösendes Spreadex-Gel geladen. Zu sehen ist eine polyklonale Repopulation der Hämatopoese bis Tag 1135 nach Transplantation. Bei späteren Zeitpunkten ist ein deutlicher Rückgang der verschiedenen Integrationsstellen zu sehen und bei einer Verwendung von 1-10 ng DNA 1324 Tage nach Transplantation konnte nur noch ein starker Klon detektiert werden. Dieser starke Klon ist auch in früheren Zeitpunkten schon sichtbar und Sequenzierungen zeigten, dass die Integration stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (TSS) des Protoonkogens *MDS1* liegt. M, 100 bp Marker; d, Tage nach Transplantation; PB, peripheres Blut; KM, Knochenmark; Gran, Granulozyten; -K, untransduzierte humane genomische DNA; *MDS1*, „Myelodysplastische Syndrome 1“; IL, Integrationslokus; bp, Basenpaare; IK, internes Vektorkontrollfragment.

Die Sequenzierung erlaubte die Detektion einer sehr starken Integration 1497 bp stromaufwärts der TSS des Protoonkogens *MDS1*. Die Darstellung der Verteilung der Integrationsstellen über die Zeit ergab, dass der starke *MDS1*-Klon zunimmt und am zuletzt analysierten Zeitpunkt (Tag 1366 nach Transplantation) der Beitrag bei über 80% liegt. Wir konnten ebenfalls Integrationsstellen in oder in der Nähe der Protoonkogene *EVI1*, *PRDM16* und *SETBP1* und weitere Integrationsstellen in *MDS1* detektieren, allerdings sank der Beitrag dieser Integrationsklone über die Zeit (**Abbildung 3.16**). Eine weitere Analyse von Einzelzellklonen, wie sie im nachfolgenden für Patient 2 beschrieben wird, war bei Patient 1 leider nicht möglich, da es bei einer Genmarkierung von $\sim 5\%$ sehr schwierig war, genügend genkorrigierte Einzelzellklone zu bekommen.

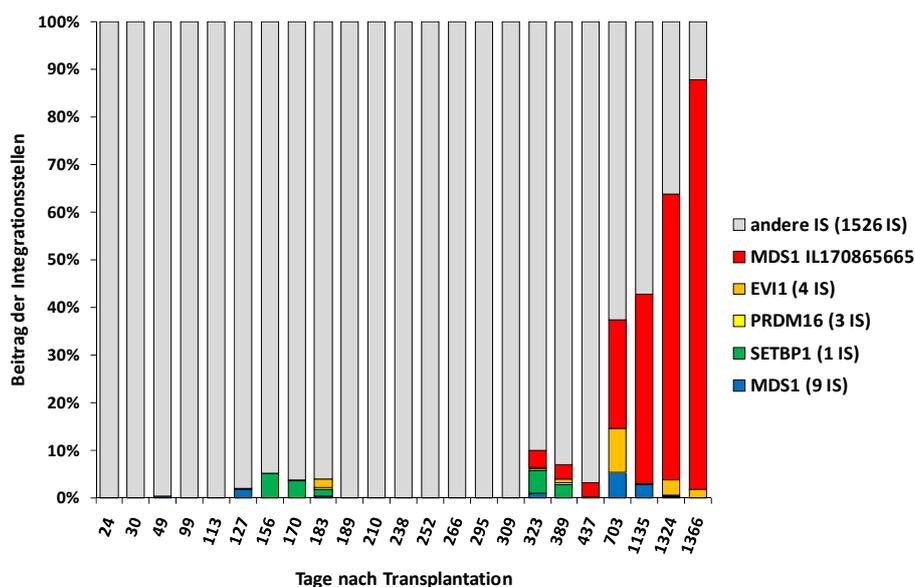


Abbildung 3.16: Beitrag des dominanten *MDS1*-Integrationsklons zur humanen Hämatoese des Patienten 1 über die Zeit. Die starke Integration in der Nähe der Transkriptionsstartstelle (TSS) von *MDS1* konnte erstmals 323 Tage nach Transplantation mit einem Beitrag von ~4% mithilfe der Pyrosequenzierung (GS FLX) detektiert werden (in ‚rot‘ dargestellt). 437 Tage nach Gentherapie war der Beitrag noch gleich, er stieg allerdings danach stetig an und erreichte 86% an Tag 1366 nach Transplantation. Es konnten ebenfalls Integrationen in den Protoonkogenen *EVI1*, *PRDM16*, *SETBP1* und weitere Integrationsstellen in *MDS1* detektiert werden, allerdings nahm deren Beitrag an dem zuletzt analysierten Zeitpunkt ab. IS, Integrationsstellen; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; IL, Integrationslokus; EVI1, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; PRDM16, „PR Domain Containing 16“; SETBP1, „SET Binding Protein 1“.

Die Untersuchungen bei Patient 2 erbrachten die Detektion mehrerer starker Integrationsklone, die Integrationsstellen in oder in der Nähe der Gene *MAP3K5* („Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 5“), *SSBP3* („Single Stranded DNA Binding Protein 3“), *STAT3* („Signal Transducer and Activator of Transcription 3“), *CAMTA1* („Calmodulin-Binding Transcription Activator 1“) und *NUCB2* („Nucleobinding-2“) tragen.

Die meisten dieser Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren und sind somit an der Regulation der Genexpression beteiligt. MAP3K5 fungiert als Kinase und spielt bei der Aktivierung mittels Phosphorylierung eine Rolle. Neuere Untersuchungen zeigten, dass STAT3 sowohl als Protoonkogen als auch als Tumorsuppressorgen in Glioblastoma fungieren kann (de la Iglesia et al., 2008). Weiterhin konnten zwei starke Integrationsstellen in Intron 2 des Protoonkogens *MDS1* detektiert werden (Integrationslokus 170524025 und 170545702) (**Abbildung 3.17**). Integrationsstellen in weiteren Protoonkogenen wie *EVI1*, *PRDM16* und *SETBP1* konnten ebenfalls beobachtet werden, allerdings sank der Beitrag dieser an den zuletzt analysierten Zeitpunkten auf 0,34%-1,97%.

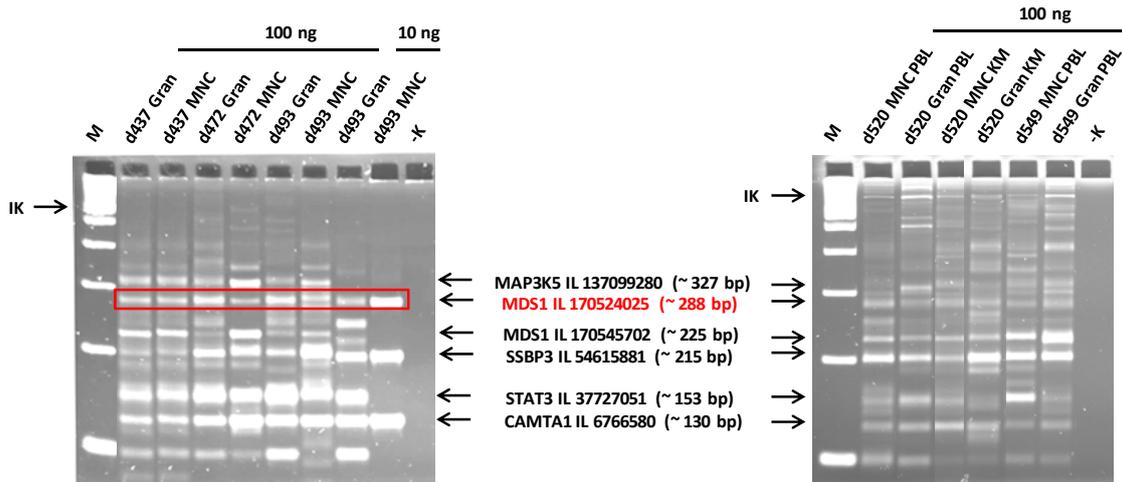


Abbildung 3.17: Darstellung der Integrationsstellen des Patienten 2, die mithilfe der 3'-linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR mit dem Restriktionsenzym *NlaIII* detektiert werden konnten. 10-100 ng DNA des Patienten 2 wurden mithilfe der LAM-PCR analysiert. Es konnten einige starke Integrationsklone detektiert werden, die Integrationen in oder in der Nähe der Gene *MAP3K5*, *MDS1*, *SSBP3*, *STAT3* und *CAMTA1* tragen. Der in „rot“ markierte *MDS1*-Klon konnte nur mittels 3'-LAM-PCR, nicht jedoch mittels 5'-LAM-PCR detektiert werden. M, 100 bp Marker; d, Tage nach Transplantation; Gran, Granulozyten; MNC, mononukleäre Zellen; PBL, peripheres Blut; KM, Knochenmark; -K, untransduzierte humane genomische DNA; IK, internes Vektorkontrollfragment; MAP3K5, „Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 5“; SSBP3, „Single Stranded DNA Binding Protein 3“; STAT3, „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“; CAMTA1, „Calmodulin-Binding Transcription Activator 1“; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“.

Die LAM-PCR Analyse von Einzelzellkolonien aus dem Knochenmark (411 Tage nach Gentherapie) des Patienten 2 und eine nachfolgende spezifische Amplifikation des *CAMTA1*-, *STAT3*- und der *MDS1*-Klone ergaben, dass jeweils die Doppelintegrationen *MDS1*(170524025)-*CAMTA1* und *MDS1*(170545702)-*STAT3* vorliegen (**Abbildung 3.18**).

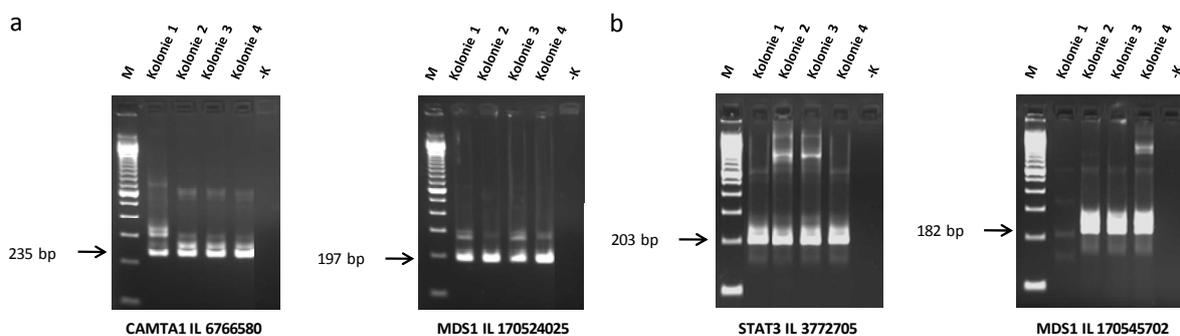


Abbildung 3.18: Spezifische Amplifikation individueller Integrationsstellen. Die spezifische Amplifikation der Integrationsklone *CAMTA1*, *STAT3* und *MDS1* (Integrationslokus 170524025 und 170545702) in Einzelzellkolonien zeigte, dass diejenigen Kolonien, die die *CAMTA1* bzw. *STAT3*-Integration tragen, auch jeweils eine der starken *MDS1*-Integrate tragen (*CAMTA1*-*MDS1* 170524025 und *STAT3*-*MDS1* 170545702). M, 100 bp Marker; bp, Basenpaare; CAMTA1, „Calmodulin-Binding Transcription Activator 1“; STAT3, „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; IL, Integrationslokus; -K, untransduzierte humane genomische DNA.

Abbildung 3.19 zeigt die 10 stärksten Integrationsklone an den analysierten Zeitpunkten. Die Doppelintegrate konnten erstmals am d89 nach Gentherapie unter den stärksten Klonen detektiert werden. Auch an den darauffolgenden Zeitpunkten zählten diese beiden Klone zu den

10 stärksten und am letzten analysierten Zeitpunkt (549 Tage nach Gentherapie) stellen sie mit einem Beitrag von 17%-22% die stärksten Integrationsklone dar. Die Klone, die Integrationen in oder in der Nähe der Gene *SSBP3*, *MAP3K5* und *NUCB2* tragen, konnten ebenfalls an mehreren Zeitpunkten unter den 10 stärksten Integrationsstellen detektiert werden. Auch am letzten analysierten Zeitpunkt zählen sie noch zu den stärksten Klonen. Weiterhin wurden stärkere Klone detektiert, die Integrationen in oder in der Nähe der Protoonkogene *EV11*, *PRDM16* und *SETBP1* tragen.

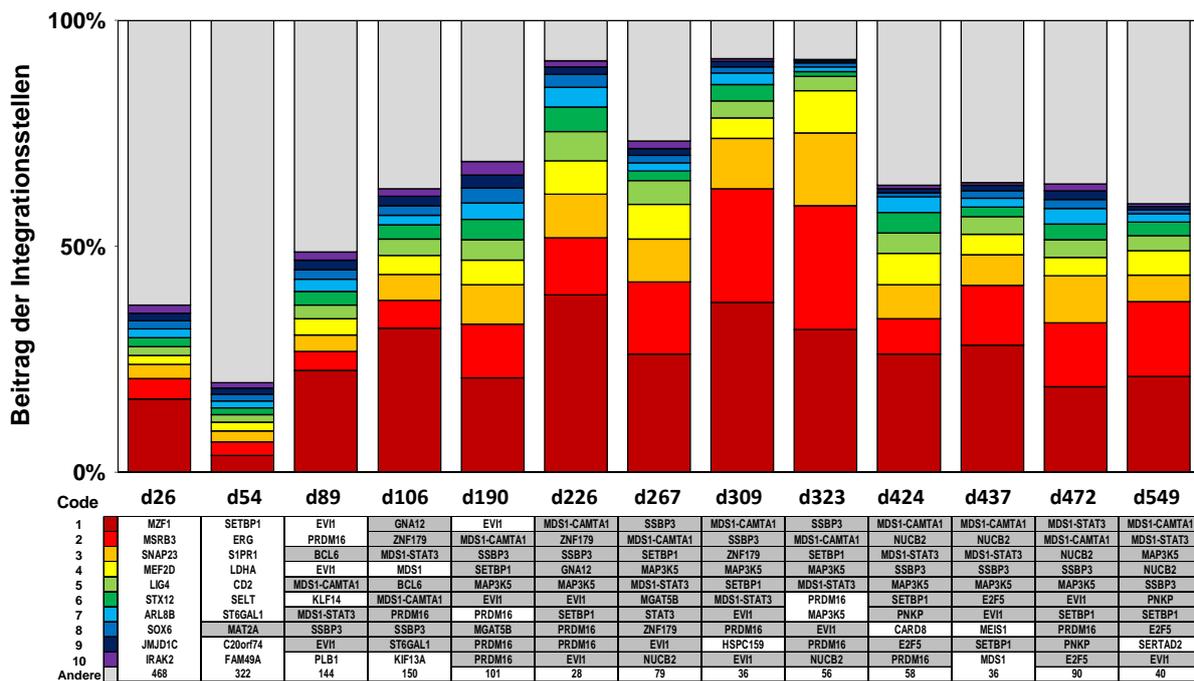


Abbildung 3.19: Beitrag der stärksten Integrationsklone an den analysierten Zeitpunkten des Patienten 2. Dargestellt sind die 10 stärksten Integrationsstellen an jedem Zeitpunkt, ‚rot‘ unterlegt stellt hierbei die stärkste und ‚lila‘ unterlegt die schwächste Integrationsstelle dar. In ‚grau‘ markiert sind die Integrationsstellen, die an mehreren Zeitpunkten unter die 10 stärksten Klone fallen. Die starken Klone mit den Doppelintegrationen *MDS1-CAMTA1* und *MDS1-STAT3* konnten erstmals am Tag 89 nach Gentherapie unter den 10 stärksten Integrationsklonen detektiert werden. An den zuletzt analysierten Zeitpunkten stellten diese die beiden stärksten Integrationsklone dar. Die Integrationsklone *SSBP3*, *MAP3K5* und *NUCB2* konnten ebenfalls an mehreren Zeitpunkten unter den 10 stärksten Klonen detektiert werden. d, Tage nach Transplantation; STAT3, „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“; CAMTA1, „Calmodulin-Binding Transcription Activator 1“; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; MAP3K5, „Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 5“; SSBP3, „Single Stranded DNA Binding Protein 3“; NUCB2, „Nucleobinding-2“.

Die Analyse der Proben 424 Tage nach Gentherapie mithilfe der nrLAM-PCR bestätigte, dass die Klone mit den Doppelintegrationen und die *SSBP3*-, *MAP3K5*- bzw. *NUCB2*-Klone an diesem Zeitpunkt zusammen mit 5 weiteren Integrationsklonen den höchsten Beitrag zur hämatopoetischen Repopulation leisten (**Abbildung 3.20**).

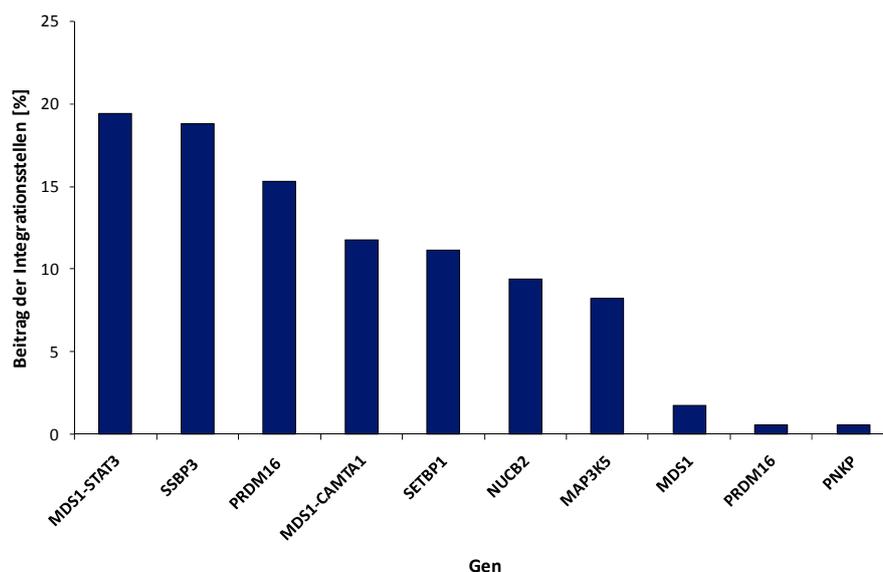


Abbildung 3.20: Darstellung der 10 stärksten Integrationsklone 424 Tage nach Genterapie des Patienten 2 mithilfe der nicht-restriktiven linearen amplifikationsmedierten PCR (nrLAM-PCR). Die Ermittlung der stärksten Integrationsklone an Tag 424 nach Genterapie mittels der nrLAM-PCR zeigte, dass die Klone mit den Doppelintegrationen *MDS1-CAMTA1* und *MDS1-STAT3* sowie Klone, die Integrationen in oder in der Nähe der Gene *SSBP3*, *MAP3K5* und *NUCB2* tragen zusammen mit weiteren 5 Integrationsstellen den stärksten Beitrag zur Hämatopoese leisten. *STAT3*, „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“; *CAMTA1*, „Calmodulin-Binding Transcription Activator 1“; *MDS1*, „Myelodysplastic Syndrome 1“; *MAP3K5*, „Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 5“; *SSBP3*, „Single Stranded DNA Binding Protein 3“; *NUCB2*, „Nucleobinding-2“; *PRDM16*, „PR Domain Containing 16“; *SETBP1*, „SET Binding Protein 1“; *PNKP*, „Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase“.

Analyse der Detektierbarkeit der starken *MDS1*-Integration 170524025 mittels LAM-PCR

Eine der starken *MDS1*-Integrationen (170524025) bei Patient 2 konnte nur unter Verwendung der 3'-LAM-PCR detektiert werden, nicht aber mithilfe der 5'-LAM-PCR (siehe **Abbildung 3.17**, ‚rot‘ markierter Integrationsklon). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die amplifizierten Fragmente zu kurz oder zu lang für die Pyrosequenzierung (GS FLX) sind. Um dies zu überprüfen, wurde zum einen eine 5'-nrLAM-PCR durchgeführt und die Fragmentgrößen mit der LAM-PCR untersucht.

Bei der Verwendung des Enzyms *Tsp509I* für die 5'-LAM-PCR sollte ein Fragment von 28 bp (ohne LTR- und Linkersequenzen) amplifiziert werden, das auf jeden Fall mithilfe der Pyrosequenzierung (GS FLX) dem Genom zugeordnet werden kann. Auch die Analyse der Proben mit der 5'-nrLAM-PCR ermöglichte nicht die Detektion der *MDS1*-Integration. Dies zeigte, dass die nicht mögliche Detektierung via 5'-LAM-PCR nicht auf dem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus basiert.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Deletion des 5'-LTR dar. Um dies zu erörtern wurde eine „Midrange“-PCR für Fragmente bis zu 12 kb durchgeführt. Für diese PCR wurden zum einen Primer, die innerhalb des Vektors und nicht im LTR lokalisiert sind und zum anderen Primer die innerhalb der *MDS1*-Sequenz liegen, gewählt.

Es wurden 6 verschiedene Primerkombinationen verwendet und 2 Einzelzellkolonien aus dem Knochenmark (411 Tage nach Gentherapie), die die starke *MDS1*-Integrationsstelle tragen, analysiert. Alle verwendeten Primerkombinationen zeigten, dass die amplifizierten Fragmente ~ 400 bp kürzer sind, als die erwarteten Fragmentgrößen (**Abbildung 3.21**).

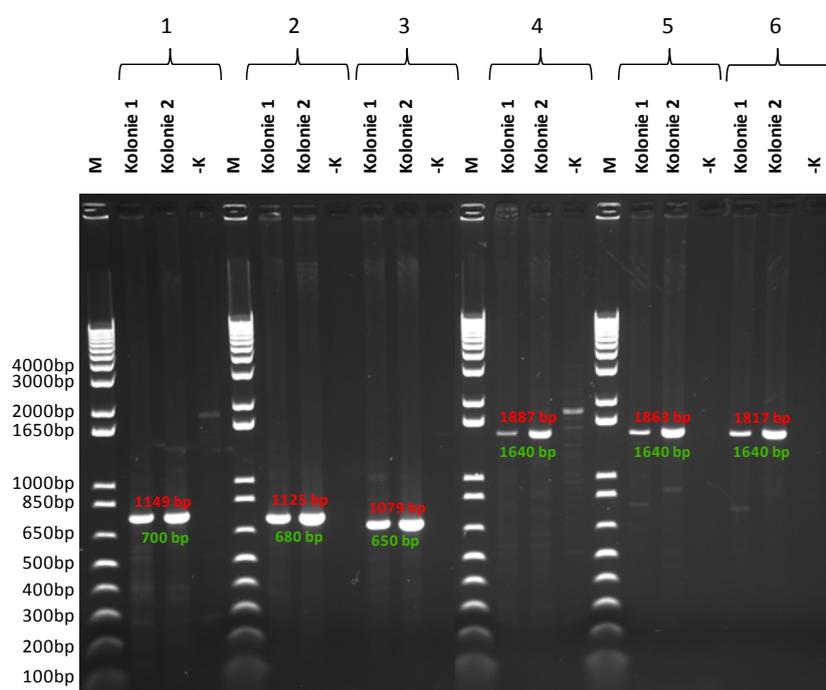


Abbildung 3.21: „Midrange-PCR“ zur Detektion einer möglichen 5'-LTR („Long Terminal Repeat“) Deletion der starken *MDS1*-Integration des Patienten 2. Um eine mögliche Deletion des 5'-LTR der starken *MDS1*-Integration (170524025) nachweisen zu können, wurde eine „Midrange“-PCR durchgeführt mit Primern, die zum einen im Vektor (nicht im LTR) und zum anderen in der genomischen DNA von *MDS1* lokalisiert sind. Es wurden Einzelzellkolonien mit 6 verschiedenen Primerkombinationen (1-6) analysiert, die das starke *MDS1*-Integrat tragen. Alle amplifizierten Fragmente waren ~ 400 bp kürzer als die erwartete Fragmentlänge. Die roten Zahlen zeigen die erwarteten, die grünen Zahlen die tatsächlich erhaltenen Fragmentlängen. M, 100 bp Marker; -K, untransduzierte humane genomische DNA; bp, Basenpaare; *MDS1*, „Myelodysplastic Syndrome 1“.

Die Sequenzierung der Fragmente bestätigte, dass bei dem starken *MDS1*-Klon eine Deletion der U3- und der R-Region im 5'-LTR vorliegt. Daher konnten die Primer für die 5'-LAM-PCR, die in der U3-Region lokalisiert sind, nicht mehr binden und die Amplifikation der Integrationsstelle nicht gewährleisten.

Die Analyse der Integrationsstellen der koreanischen X-CGD Gentherapiestudie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Integrationsstellen einer weiteren klinischen X-CGD Gentherapiestudie analysiert, die in Korea durchgeführt wurde. In Kooperation mit Prof. Dr. Sunyoung Kim wurde DNA aus dem Knochenmark der Patienten 4 bis 52 Wochen nach Gentherapie hinsichtlich Integrationsstellen untersucht. Weiterhin wurden Prätransplantations-Proben analysiert. Für die Analyse konnte aufgrund der zur Verfügung stehenden geringen DNA-Mengen keine nrLAM-PCR durchgeführt werden. Für die LAM-PCR wurden um die bestmögliche Analyse zu gewährleisten, verschiedene Enzyme verwendet. Bei beiden Patienten konnte bis 1 Jahr nach Gentherapie eine polyklonale hämatopoetische Repopulation beobachtet werden (**Abbildung 3.22**). Für Patient 1 wurden insgesamt 402 und für Patient 2 1371 eindeutig zuordenbare Integrationsstellen im Rahmen dieser Arbeit detektiert.

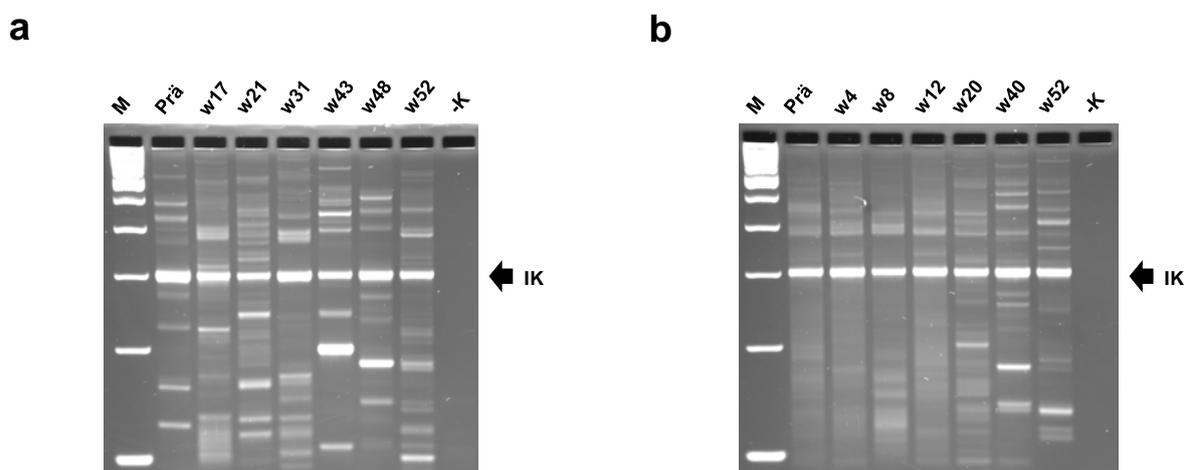
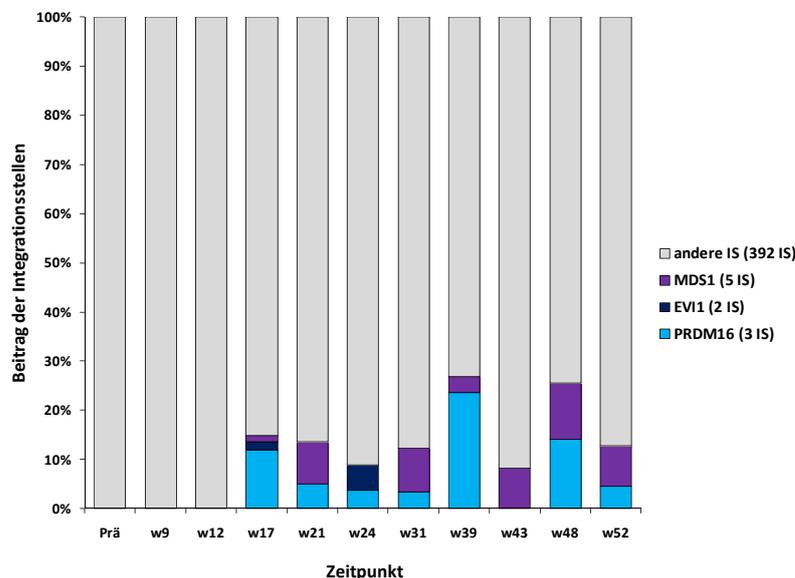


Abbildung 3.22: Analyse der Patientenproben der koreanischen X-CGD Gentherapiestudie mittels linearer amplifikationsmediierter PCR (LAM-PCR) mit dem Restriktionsenzym *Tsp509I*. Die Analyse der Proben der Patienten 1 (a) und 2 (b) der koreanischen X-CGD Gentherapiestudie zeigte bis zum letzten analysierten Zeitpunkt (52 Wochen nach Gentherapie) eine polyklonale Repopulation. Für die Analyse wurde 100 ng-1µg DNA verwendet. M, 100 bp Marker; Prä, Prätransplantations-Proben; w, Wochen nach Gentherapie; -K, untransduzierte humane genomische DNA; IK, internes Vektorkontrollfragment; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“.

In beiden Patienten konnten Integrationsstellen in den bekannten Protoonkogenen *PRDM16*, *MDS1* und *EVI1* detektiert werden, die ebenfalls an mehreren Zeitpunkten auftauchten. In Patient 2 traten zusätzlich 2 Integrationsstellen stromaufwärts des Gens *CCND2* auf. Der Beitrag dieser Integrationsstellen erstreckte sich bei Patient 1 von 1,34%-11,39% für den *MDS1*-Lokus, 1,68%-5,06% für den *EVI1*-Lokus und 3,8%-23,70% für den *PRDM16*-Lokus. Für Patient 2 lag der Beitrag für die *MDS1*-Klone zwischen 0,15% und 39,9%, für den *EVI1*-Klon bei 0,03%, der Beitrag der *PRDM16*-Klone betrug 0,8%-2,22% und der zwei *CCND2*-Integrationen 0,27% und 4,93%. Sowohl bei Patient 1 als auch bei Patient 2 konnten die Integrationsstellen in oder in der

Nähe von Protoonkogenen in den Prätransplantations-Proben nicht detektiert werden (Abbildung 3.23).

a



b

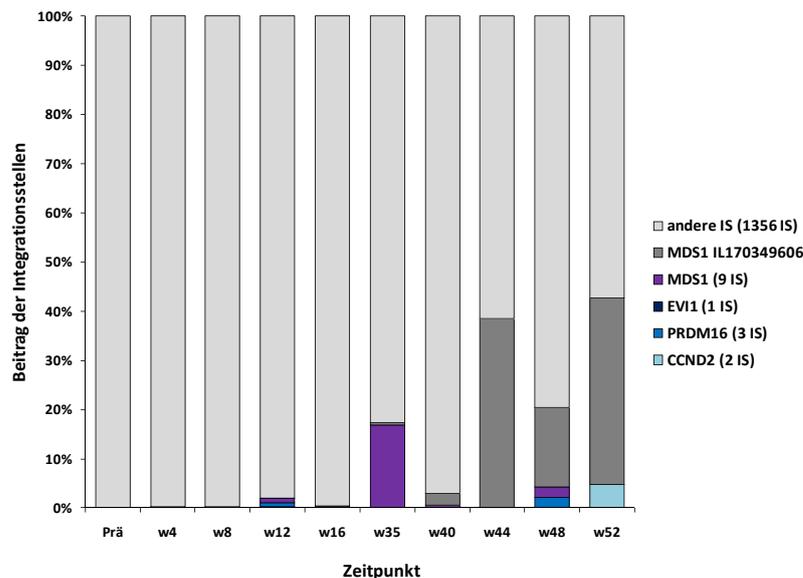


Abbildung 3.23: Beitrag der Integrationsstellen in bekannten Protoonkogenen zur hämatopoetischen Repopulation. (a) Bei Patient 1 konnten Integrationsstellen in oder in der Nähe der bekannten Protoonkogene *MDS1*, *EVI1* und *PRDM16* detektiert werden, die einen gemeinsamen Beitrag zur hämatopoetischen Repopulation zeigten von 1,34%-11,39% für *MDS1*, 1,68%-5,06% für *EVI1* und 3,8%-23,7% für *PRDM16*. (b) Für Patient 2 konnten ebenfalls Integrationsstellen in den bekannten Protoonkogenen gefunden werden. Zusätzlich wurden zwei Integrationen in dem Protoonkogen *CCND2* detektiert. Der Beitrag der Integrationsstellen an den verschiedenen Zeitpunkten lag zwischen 0,15% und 39,9% für *MDS1*, 0,8% und 2,22% für *PRDM16*, 0,27% und 4,93% für *CCND2*. Ein *EVI1*-Klon leistete einen Beitrag von 0,03% 4 Wochen nach Transplantation. Besonders auffällig ist der Beitrag eines *MDS1*-Klons, der von 0,35% auf 39,9% am letzten analysierten Zeitpunkt anstieg. IS, Integrationsstellen; IL, Integrationslokus; Prä, Prätransplantations-Proben; w, Wochen nach Genterapie; *MDS1*, „Myelodysplastic Syndrome 1“; *EVI1*, „Ectropic Viral Integration Site“; *PRDM16*, „PR Domain Containing 16“; *CCND2*, „CCND2 Cyclin D2“.

An dem letzten analysierten Zeitpunkt (52 Wochen nach Gentherapie) konnten bei Patient 1 noch 3 Integrationsstellen in dem *MDS1*-Lokus und 2 Integrationsstellen in dem *PRDM16*-Lokus nachgewiesen werden, deren Beitrag zur Hämatopoese zwischen 0,08% und 6,74% lag (**Abbildung 3.23 a**). Die stärkeren Klone am letzten Zeitpunkt tragen Integrationsstellen in oder in der Nähe der Gene *PTGS1* („Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1“) (Beitrag von 8,37%) und *C20orf74* („Chromosome 20 Open Reading Frame 74“) (Beitrag von 11,05%). Beide Integrationsstellen wurden auch an früheren Zeitpunkten bereits detektiert. Das Protein PTGS1 spielt eine wichtige Rolle bei der Prostaglandin-Synthese. *C20orf74* kodiert für ein Protein, das bei der durch GTPasen medierte Signaltransduktion eine Rolle spielt.

Integrationsstellen in oder in der Nähe der Genloki *TMEFF2* („Transmembrane Protein with EGF-like and Two Follistatin-like Domains 2“), *RFX2* („Regulatory Factor X 2“) und *TNFSF13B* („Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 13b“) wurden nur am letzten analysierten Zeitpunkt detektiert und leisteten ebenfalls einen stärkeren Beitrag zur Hämatopoese von 8,04%-14,87%. TMEFF2 ist ein membrangebundenes Signalmolekül, dem eine Rolle in verschiedenen Krebsarten zugesagt wird (Uchida et al., 1999; Quayle et al., 2006). Das Protein RFX2 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, TNFSF13B spielt eine wichtige Rolle bei dem Wachstum und der Differenzierung von B-Zellen. Der Beitrag weiterer Integrationsstellen in Patient 1 stieg zwar zwischenzeitlich auf 18%-52% an, allerdings nahm bei allen diesen Integrationsstellen der Beitrag am letzten Zeitpunkt wieder stark ab oder die Integrationsstelle konnte nicht mehr detektiert werden.

Für Patient 2 leistete am letzten analysierten Zeitpunkt noch eine Integrationsstelle in dem Protoonkogen *CCND2* einen Beitrag von 4,93% zur hämatopoetischen Repopulation. Weiterhin konnte ein *MDS1*-Klon detektiert werden, der einen Beitrag von 39,9% zeigte. Diese starke Integration konnte erstmals 16 Wochen nach Gentherapie detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt lag der Beitrag lediglich bei 0,35%. Danach stieg der Beitrag kontinuierlich bis zum letzten analysierten Zeitpunkt an (**Abbildung 3.23 b**). 52 Wochen nach Gentherapie konnte von Anfangs 10 nur noch dieser eine *MDS1*-Klon detektiert werden. Auffällig ist weiterhin, dass diese starke Integration in Exon 4 des *MDS1*-Lokus liegt. Ein weiterer stärkerer Klon trägt eine Integration stromaufwärts des *ZMYND8* („ZMYND8 Zinc Finger MYND-Type Containing 8“) - Lokus und leistete am letzten analysierten Zeitpunkt einen Beitrag von 14,78%. ZMYND8 fungiert als Transkriptionsfaktor und stellt weiterhin ein T-Zell Lymphoma assoziiertes Antigen dar (Eichmüller et al., 2001).

3.2.2.2 Charakterisierung bevorzugter Integrationsorte

Analyse der bevorzugten Integrationsorte in der schweizer X-CGD Gentherapiestudie

Bei beiden Patienten wurde eine Analyse bevorzugter Integrationsorte vorgenommen, an denen mehr als eine Integration stattfand („Common Integration Sites“, CIS). Bei beiden Patienten konnten CIS in bekannten Protoonkogenen detektiert werden. In Patient 1 wurde eine CIS 3. Ordnung in dem *EVII*-Lokus und eine CIS 6. Ordnung in dem *MDS1*-Lokus gefunden. Weiterhin bildeten 8 Integrationsstellen in dem *PTPRC* („Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C“) -Lokus eine CIS 8. Ordnung (**Abbildung 3.24**).

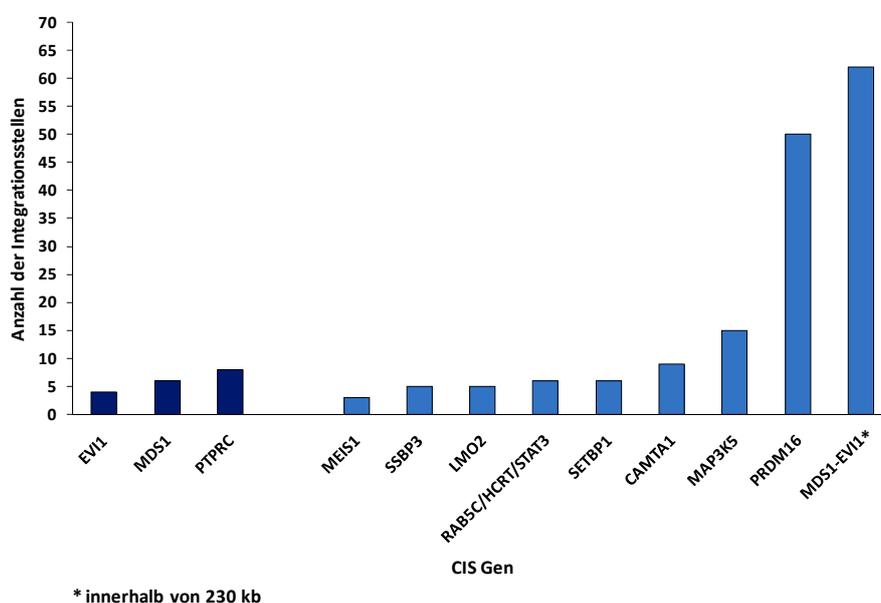


Abbildung 3.24: Darstellung der auffälligsten bevorzugten Integrationsorte beider Patienten der schweizer X-CGD Gentherapiestudie. Bei Patient 1 („dunkelblau“ unterlegt) konnten 3 auffällige CIS („Common Integration Site“) detektiert werden, die Integrate in den Protoonkogenen *EVII* (3 Integrationsstellen), *MDS1* (6 Integrationsstellen) und in dem *PTPRC*-Genlokus (8 Integrationsstellen) tragen. 3-5 Integrate konnten bei Patient 2 („hellblau“ unterlegt) in den Protoonkogenen *MEIS1* (3 Integrationsstellen), *LMO2* (5 Integrationsstellen), *SETBP1* (6 Integrationsstellen), und *PRDM16* (50 Integrationsstellen) und in den weiteren Genloki *SSBP3* (5 Integrationsstellen), *CAMTA1* (9 Integrationsstellen) und *MAP3K5* (15 Integrationsstellen) detektiert werden. Eine CIS 6. Ordnung erstreckte sich über die Genloki *RAB5C/HCRT/STAT3* und 62 Integrationsstellen lagen in den beiden Genloki *MDS1-EVI1* innerhalb von 230 kb. CIS, „Common Integration Site“; MAP3K5, „Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 5“; SSBP3, „Single Stranded DNA Binding Protein 3“; STAT3, „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“; CAMTA1, „Calmodulin-Binding Transcription Activator 1“; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; EVI1, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; PRDM16, „PR Domain Containing 16“; SETBP1, „SET Binding Protein 1“; MEIS1, „Meis Homeobox 1“; LMO2, „LIM Domain Only 2“; PTPRC, „Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C“; RAB5C, „Member RAS Oncogene Family“; *HCRT*, „Hypocretin Neuropeptide Precursor“; kb, Kilobasen; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“.

Das Protein, das von *PTPRC* kodiert wird, gehört zur Familie der Protein Tyrosin Phosphatasen. Die Proteine dieser Familie stellen Signalmoleküle dar, die an vielen zellulären Prozessen wie Zellwachstum und Differenzierung beteiligt sind. Unter anderem spielen sie auch eine Rolle bei der onkogenen Transformation einer Zelle.

Bei Patient 2 konnten CIS in den Genloki der Protoonkogene *MEIS1* („Meis Homeobox 1“) (3 Integrationsstellen), *LMO2* (5 Integrationsstellen), *SETBP1* (6 Integrationsstellen) und *PRDM16* (50 Integrationsstellen) detektiert werden. 62 Integrationsstellen lagen innerhalb von 230 kb und erstreckten sich über die beiden Genloki *MDS1-EVI1*. Weiterhin konnten ebenfalls CIS in den Genloki *SSBP3* (5 Integrationsstellen), *CAMTA1* (9 Integrationsstellen) und *MAP3K5* (15 Integrationsstellen) gefunden werden und eine CIS 6.Ordnung, die sich über die Genloki *RAB5C* („Member RAS Oncogene Family“)/*HCRT* („Hypocretin Neuropeptide Precursor“)/*STAT3* erstreckte (**Abbildung 3.24**).

Analyse der bevorzugten Integrationsorte in der koreanischen X-CGD Gentherapiestudie

Die Analyse möglicher bevorzugter Integrationsorte erlaubte die Detektion von CIS 2.-10. Ordnung. Für Patient 1 konnte neben einer CIS 3.Ordnung in dem Protoonkogen *PRDM16*, eine weitere CIS bestehend aus 3 Integrationsstellen in dem Genlokus *GFI1B* („Growth Factor Independent 1B Transcription Repressor“) nachgewiesen werden. Das GFI1B Protein stellt einen Transkriptions-Repressor dar. Neuere Untersuchungen zeigten, dass GFI1B möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung myeloider Leukämien und anderer myeloproliferativer Erkrankungen spielt (Vassen et al., 2009). 6 Integrationsstellen innerhalb von 250 kb wurden in den bekannten Protoonkogenen *MDS1-EVI1* detektiert.

Bei Patient 2 konnte eine CIS 3. Ordnung in dem *PRDM16* Locus detektiert werden. 10 Integrationsstellen lagen in den Genloki *MDS1-EVI1* in einem Abstand von 246 kb, darunter auch der starke *MDS1*-Klon. Die Analyse ergab ebenfalls, dass in den Prätransplantations-Proben vorwiegend CIS 2.Ordnung vorkommen und CIS höherer Ordnung ausschließlich in den Posttransplantations-Proben beobachtet werden können. In **Abbildung 3.25** sind die auffälligsten CIS beider Patienten dargestellt.

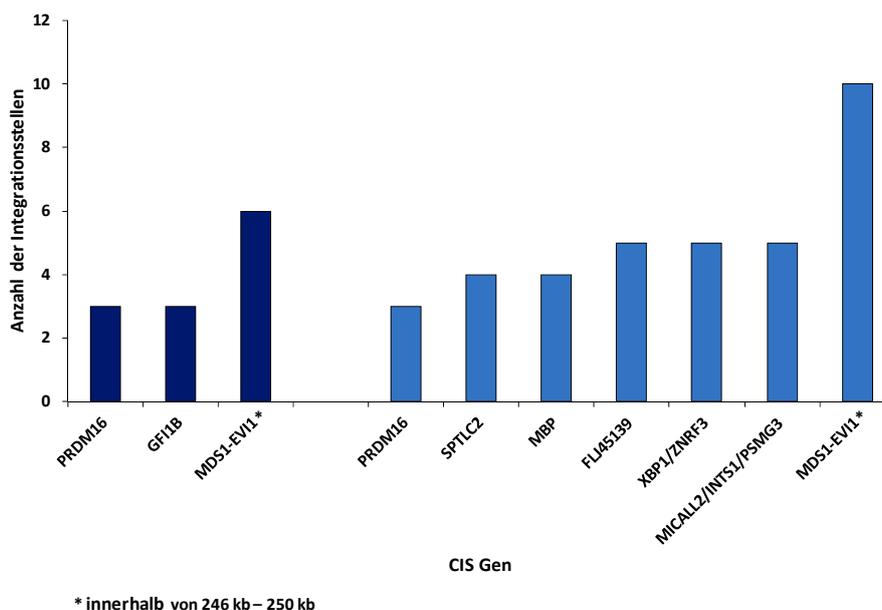


Abbildung 3.25: Darstellung der bevorzugten Integrationsorte beider Patienten der koreanischen X-CGD Gentherapiestudie. Sowohl bei Patient 1 („dunkelblau“ unterlegt) als auch bei Patient 2 („hellblau“ unterlegt) konnten bevorzugte Integrationsorte in oder in der Nähe bekannter Protoonkogene detektiert werden. Bei Patient 1 wurden die auffälligsten CIS von 3 Integrationsstellen in den Genen *PRDM16* und *GF11B* gebildet. Weiterhin konnten 6 Integrationsstellen in den Protoonkogenen *MDS1-EV11* innerhalb von 250 kb detektiert werden. Für Patient 2 wurden eine CIS 3. Ordnung in dem *PRDM16*-Lokus und 10 Integrationsstellen in den *MDS1-EV11* Loci innerhalb eines Abstandes von 246 kb detektiert. CIS, „Common Integration Site“; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; EV11, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; PRDM16, „PR Domain Containing 16“; GF11B, „Growth Factor Independent 1B Transcription Repressor“; kb, Kilobasen; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“.

3.2.2.3 Vergleich der *MDS1-EV11* Integrationsstellen der schweizer und koreanischen X-CGD Gentherapiestudie mit der deutschen Gentherapiestudie

In einer erfolgreichen deutschen X-CGD Gentherapiestudie wurden 2 Patienten im Alter von 25 und 27 Jahren behandelt. Die Transduktion autologer CD34+ Zellen mit einem Vektor, der über einen SFFV-Promoter im LTR das Transgen *gp91phox* exprimiert und die anschließende Reinfusion dieser Zellen in die Patienten führte zu einem Rückgang der mit der Krankheit verbundenen Nebenwirkungen.

Die in unserem Labor durchgeführte Integrationsstellenanalyse zeigte in beiden Patienten die beiden Genloki *MDS1-EV11* als stärkste bevorzugte Integrationsorte (Ott et al., 2006). Weiterhin kam es bei beiden Patienten zu einer *in vivo* Selektion von Klonen mit Integrationen in oder in der Nähe von *MDS1*. Diese *in vivo* Selektion führte zu der Überexpression der Protoonkogene *MDS1-EV11*, die in der Entstehung des Fusionstranskripts *MDS1-EV11* und des kürzeren Transkripts *EV11* resultierte. Die klonale Dominanz zusammen mit weiteren molekularen

Veränderungen führte zu der Entstehung eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) bei beiden Patienten, an dessen Folgen der erste Patient 820 Tage nach Gentherapie verstarb.

Die in dieser Arbeit beschriebene schweizer Gentherapiestudie verwendete das gleiche klinische Protokoll, das auch für die Behandlung in Deutschland verwendet wurde und den gleichen Vektor (Ott et al., 2006). Im Rahmen der Integrationsstellenanalyse der Proben aus der schweizer und koreanischen Studie konnten wir ebenfalls *MDS1-EVI1* als häufigste bevorzugte Integrationsorte detektieren. Es konnte weiterhin bei drei der insgesamt vier Patienten eine *in vivo* Selektion einzelner *MDS1*-Integrationsklone beobachtet werden.

Der Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit detektierten *MDS1* und *EVI1* Integrationsstellen mit den Integrationsstellen aus der deutschen X-CGD Studie, zeigte eine Ansammlung aller Integrationsstellen vorwiegend in Intron 2 des *MDS1*-Lokus innerhalb von ~ 250 kb (**Abbildung 3.26** und **Abbildung 3.27**).

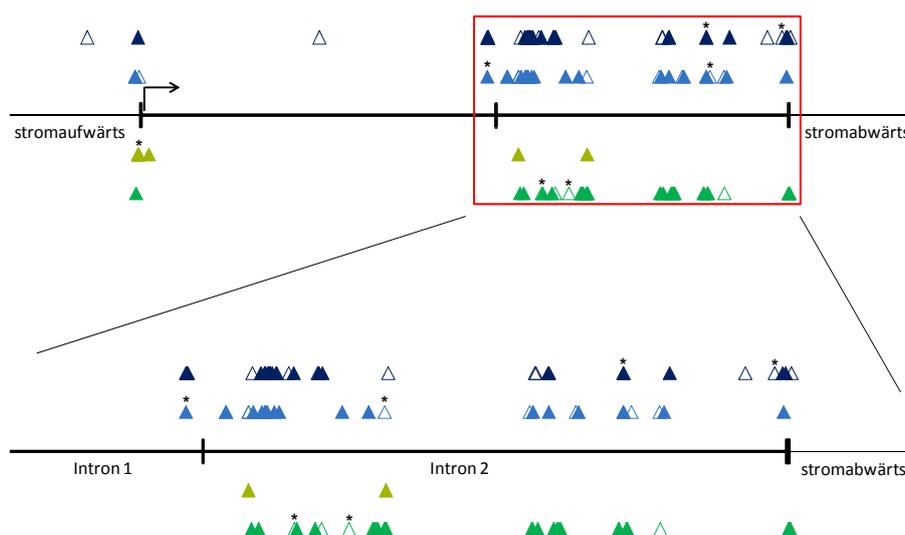


Abbildung 3.26: Verteilung der Integrationsstellen in oder in der Nähe des Protoonkogens *MDS1* in der deutschen und schweizer X-CGD Gentherapiestudie. In beiden Studien konnte eine Ansammlung der Integrationsstellen vorwiegend in Intron 2 detektiert werden innerhalb von 250 kb. ‚Hellblau‘, Patient 1 der deutschen Studie; ‚dunkelblau‘, Patient 2 der deutschen Studie; ‚hellgrün‘, Patient 1 der schweizer Studie; ‚dunkelgrün‘, Patient 2 der schweizer Studie; Sterne markieren die dominanten *MDS1*-Integrationen in der jeweiligen Studie; ausgefüllte Dreiecke, + Orientierung der Integration; nicht ausgefüllte Dreiecke, - Orientierung der Integration; *MDS1*, „Myelodysplastic Syndrome 1“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“; kb, Kilobasen.

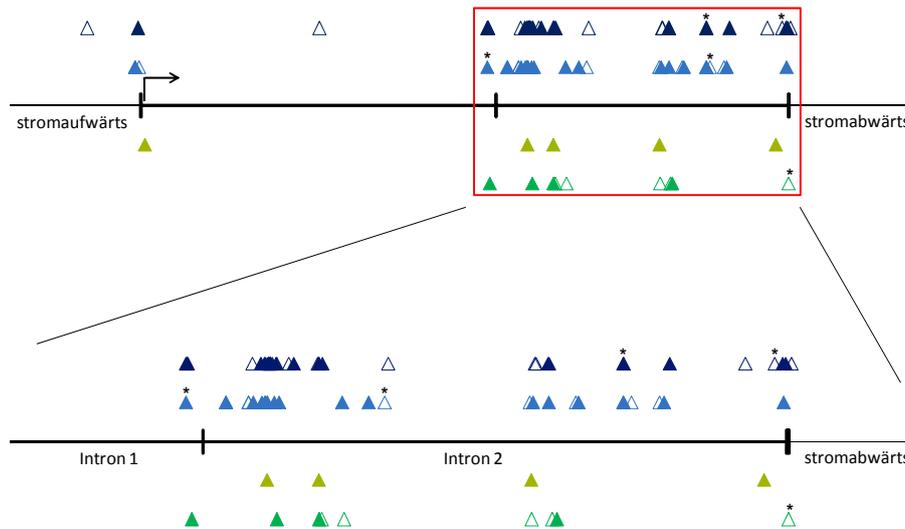


Abbildung 3.27: Verteilung der Integrationsstellen in oder in der Nähe des Protoonkogens *MDS1* in der deutschen und koreanischen X-CGD Genterapiestudie. In beiden Studien konnte eine Ansammlung der Integrationsstellen vorwiegend in Intron 2 detektiert werden innerhalb von 250 kb. ‚Hellblau‘, Patient 1 der deutschen Studie; ‚dunkelblau‘, Patient 2 der deutschen Studie; ‚hellgrün‘, Patient 1 der koreanischen Studie; ‚dunkelgrün‘, Patient 2 der koreanischen Studie; Sterne markieren die dominanten *MDS1*-Integrationen in der jeweiligen Studie; ausgefüllte Dreiecke, + Orientierung der Integration; nicht ausgefüllte Dreiecke, - Orientierung der Integration; *MDS1*, „Myelodysplastic Syndrome 1“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“; kb, Kilobasen.

In dem *EVII*-Lokus konnten die Integrationsstellen bevorzugt stromaufwärts der TSS sowie in Intron 1 und 2 detektiert werden innerhalb einer Spanne von ~ 20 kb (**Abbildung 3.28** und **Abbildung 3.29**).

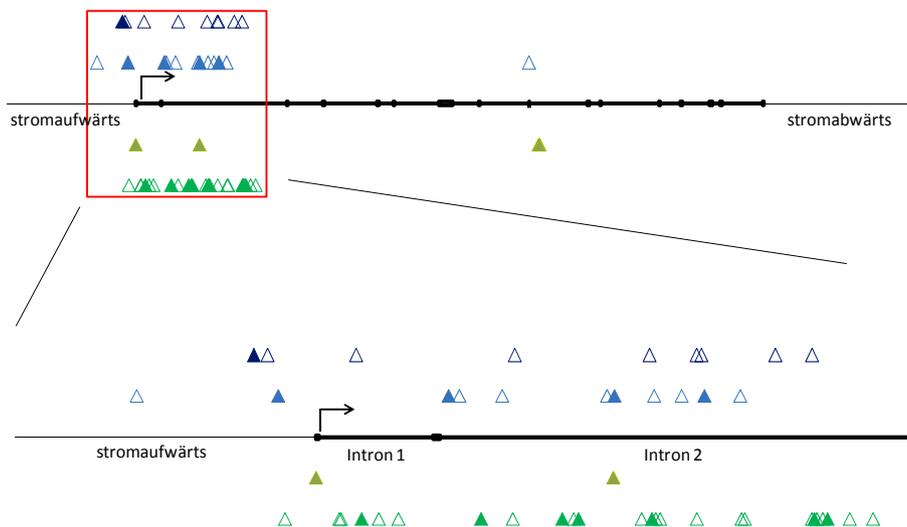


Abbildung 3.28: Verteilung der Integrationsstellen in oder in der Nähe des Protoonkogens *EVII* in der deutschen und schweizer X-CGD Genterapiestudie. In beiden Studien konnte eine Ansammlung der Integrationsstellen vorwiegend stromaufwärts der TSS sowie in Intron 1 und 2 detektiert werden innerhalb von 20 kb. ‚Hellblau‘, Patient 1 der deutschen Studie; ‚dunkelblau‘, Patient 2 der deutschen Studie; ‚hellgrün‘, Patient 1 der schweizer Studie; ‚dunkelgrün‘, Patient 2 der schweizer Studie; ausgefüllte Dreiecke, + Orientierung der Integration; nicht ausgefüllte Dreiecke, - Orientierung der Integration; *EVII*, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“; TSS, Transkriptionsstartstelle; kb, Kilobasen.

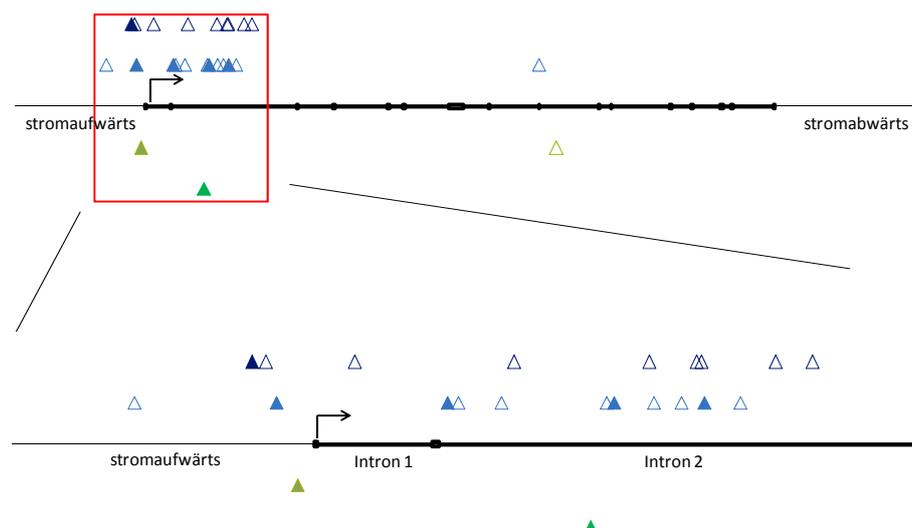


Abbildung 3.29: Verteilung der Integrationsstellen in oder in der Nähe des Protoonkogens *EVI1* in der deutschen und koreanischen X-CGD Gentherapiestudie. In beiden Studien konnte eine Ansammlung der Integrationsstellen vorwiegend stromaufwärts der TSS sowie in Intron 1 und 2 detektiert werden innerhalb von 20 kb. ‚Hellblau‘, Patient 1 der deutschen Studie; ‚dunkelblau‘, Patient 2 der deutschen Studie; ‚hellgrün‘, Patient 1 der koreanischen Studie; ‚dunkelgrün‘, Patient 2 der koreanischen Studie; ausgefüllte Dreiecke, + Orientierung der Integration; nicht ausgefüllte Dreiecke, - Orientierung der Integration; EVI1, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“; TSS, Transkriptionsstartstelle; kb, Kilobasen.

Die vergleichenden Untersuchungen ergaben bei allen Studien, dass eine starke Präferenz der Integration des gammaretroviralen Vektors in bestimmte Bereiche der beiden Protoonkogene *MDS1* und *EVI1* vorlag und die Verteilung der Integrationsstellen nicht über die kompletten Genloki erfolgte.

3.2.2.4 Genexpressionsanalysen in der schweizer Gentherapiestudie

Bei Patient 1 der schweizer Studie wurde ein sehr starker *MDS1*-Klon detektiert, der an den letzten analysierten Zeitpunkten in 80% der genkorrigierten Zellen zu finden war. Bei Patient 2 wurden ebenfalls zwei starke Klone detektiert, die Doppelintegrationen in *MDS1-CAMTA1* und *MDS1-STAT3* tragen. Bei Patient 2 der koreanischen Studie stieg der Beitrag eines *MDS1*-Klons von 0,35% auf 39,9% an.

Da die Integration des retroviralen Vektors ebenfalls zu einer Veränderung der Expression des betroffenen Gens führen kann, wurde in dieser Arbeit die Expression der Gene *MDS1-EVI1*, *CAMTA1* und *STAT3* mithilfe der RT- (Reverse Transkriptase) PCR untersucht. Die Genexpressionsanalysen konnten nur für Patient 2 der schweizer Studie durchgeführt werden, da von Patient 1 der schweizer Studie und von Patient 2 der koreanischen Studie leider keine RNA zur Verfügung stand. Die beiden Gene *MDS1* und *EVI1* liegen sehr nah beieinander und deren

Expression kann in den 3 Isoformen *MDS1*, *MDS1-EVI1* und *EVI1* resultieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Fusionstranskriptes *MDS1-EVI1* und des kurzen *EVI1*-Transkriptes untersucht. Hierfür wurden Einzelzellkolonien, die eines der starken *MDS1*-Integrate tragen, cDNA von peripheren Blutzellen 98 Tage nach Transplantation und cDNA von peripheren Blutzellen eines gesunden Probanden untersucht. Es wurden zwei verschiedene RT-PCR Reaktionen durchgeführt. Eine ermöglichte die Detektion beider Transkripte (*MDS1-EVI1* und *EVI1*) (**Abbildung 3.30 a**), die andere ermöglichte nur die Detektion des Fusionstranskriptes *MDS1-EVI1* (**Abbildung 3.30 b**). Bei allen analysierten Einzelzellkolonien und auch bei der Blutprobe konnte eine Expression des *EVI1* Transkriptes detektiert werden. Allerdings konnte nur bei einer der Kolonien eine Expression des *MDS1-EVI1* Transkriptes nachgewiesen werden. Eine Expression von *MDS1-EVI1* bzw. *EVI1* wurde bei der gesunden Kontrolle nicht detektiert.

Die Analyse der *CAMTA1*- und *STAT3*-Expression erfolgte ebenfalls mit Kolonien, die das jeweilige Integrat tragen, mit der Patientenprobe von Tag 98 nach Transplantation und mit einer gesunden Kontrollprobe. Eine *CAMTA1*-Expression konnte sowohl in den Patientenproben als auch in der Probe des gesunden Probanden nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 3.30 c**). Die RT-PCR zeigte allerdings, dass es durch die Integration des Vektors im *STAT3*-Gen zu einer Überexpression dieses Gens kommt. Die Expression war zwar in allen analysierten Proben vorhanden, allerdings in den Patientenproben wesentlich stärker verglichen mit der gesunden Kontrolle (**Abbildung 3.30 d**).

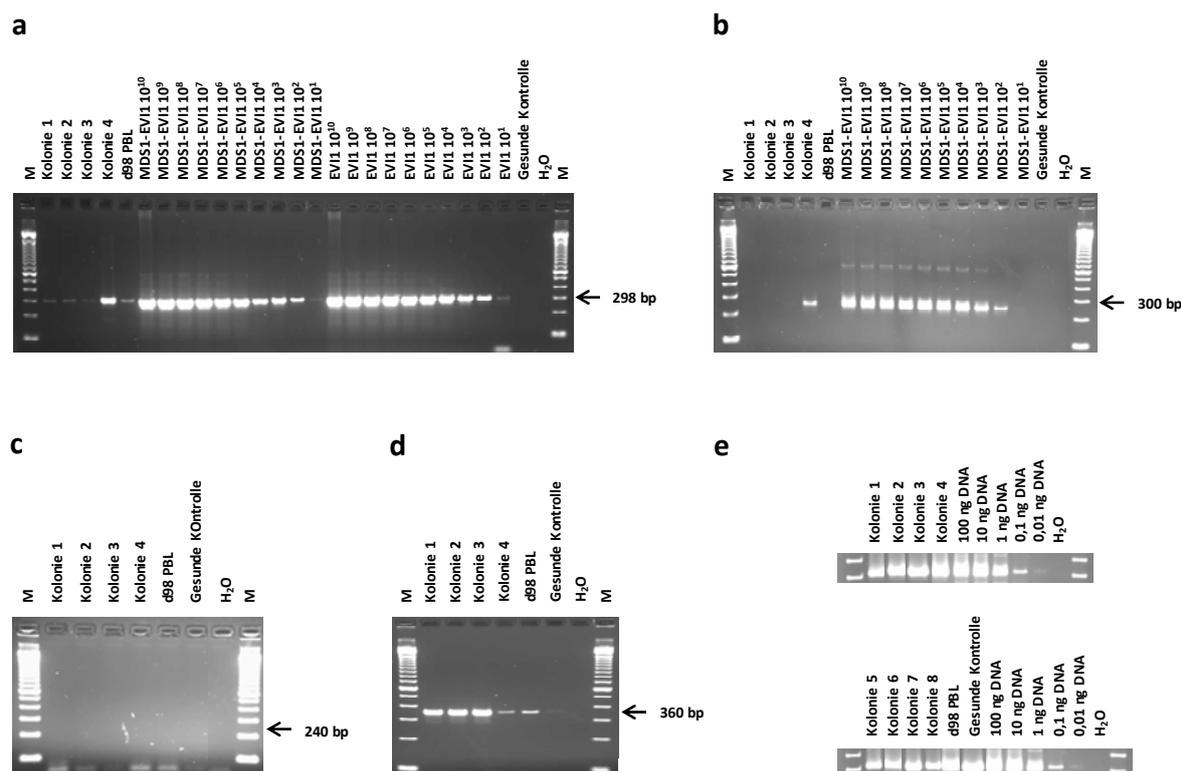


Abbildung 3.30: Expressionsanalysen der Gene *MDS1-EV11*, *CAMTA1* und *STAT3* in Patient 2 der schweizer X-CGD Gentherapiestudie. Es wurden bei allen durchgeführten Reverse Transkriptase (RT)-PCR Analysen Einzelzellkolonien, die die jeweilige starke Integration tragen, cDNA aus dem peripheren Blut 98 Tage nach Transplantation und eine gesunde Kontroll-cDNA analysiert. Für die Expressionsanalyse von *MDS1-EV11* wurden zwei RT-PCR Analysen durchgeführt, die es ermöglichten zum einen das Fusionstranskript *MDS1-EV11* und das kürzere Transkript *EV11* (a) und zum anderen nur das *MDS1-EV11* Transkript (b) zu detektieren. In allen Patientenproben konnte eine Expression des kürzeren Transkriptes *EV11*, allerdings nur in einer Patientenprobe die zusätzliche Expressions des *MDS1-EV11* Transkriptes nachgewiesen werden. Weder in den Patientenproben noch in der Probe des gesunden Probanden konnte eine *CAMTA1*-Expression detektiert werden (c). Wohingegen eine Expression von *STAT3* in allen Proben beobachtet werden konnte, allerdings in den Patientenproben wesentlich stärker verglichen mit der gesunden Kontrolle (d). In (e) ist die Aktin-PCR für die verwendeten Proben dargestellt. Es wurden insgesamt 8 verschiedene Einzelzellkolonien für die Genexpressionsanalysen verwendet. M, 100 bp Marker; d, Tage nach Transplantation; PBL, peripheres Blut; MDS1-EV11 bzw. EV11 10^{10} - 10^1 , Kontrollplasmid, das die *MDS1-EV11* bzw. *EV1* cDNA enthält; bp, Basenpaare; STAT3, „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“; CAMTA1, „Calmodulin-Binding Transcription Activator 1“; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; EV11, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“.

3.2.3 Retrovirale Gentherapie des schweren kombinierten Immundefekts ausgelöst durch Adenosindesaminasemangel (ADA-SCID)

In einer erfolgreichen ADA-SCID Gentherapiestudie wurden insgesamt 6 Patienten behandelt. Den Patienten wurden CD34+ Zellen entnommen, diese wurden *ex vivo* mit einem gammaretroviralen Vektor transduziert, der die cDNA des Tragens *ADA* und einen SFFV-Promoter im LTR trägt. Nach Konditionierung der Patienten mit Melphalan wurden die transduzierten Zellen den Patienten reinfundiert (Gaspar et al., 2006). Bei 4 der 6 behandelten Patienten zeigte die Gentherapie einen Erfolg. Ungefähr 10% der Lymphozyten tragen den retroviralen Vektor, wohingegen nur 0,1% der myeloiden Zellen eine Markierung aufweisen

(Gaspar et al., 2006). In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Adrian Thrasher und Prof. Dr. Bobby Gaspar wurden die Integrationsstellen von 3 der erfolgreich behandelten Patienten analysiert.

3.2.3.1 Klonalitätsanalyse der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation

Auch in dieser Studie stand uns leider nicht genügend Material für die Durchführung der nrLAM-PCR zur Verfügung. Daher wurden die Proben mittels 2 verschiedenen Ansätzen der LAM-PCR unter Verwendung von Restriktionsenzymen mit einem nicht CG-Motiv untersucht. Die Analyse der Integrationsstellen mithilfe der LAM-PCR in Kombination mit der Pyrosequenzierung (GS FLX) erbrachte für Patient 1 92 eindeutig zuordenbare, für Patient 2 1005 eindeutig zuordenbare und für Patient 3 249 eindeutig zuordenbare Integrationsstellen. Bei Patient 1 erstreckte sich der Zeitraum der Analyse für diese Arbeit von Tag 1026 bis Tag 1760 nach Transplantation, für Patient 2 von Tag 264 bis Tag 926 nach Transplantation und für Patient 3 wurde bisher der Tag 277 nach Transplantation untersucht. Es wurden CD34+ Zellen, PBMC und weitere Fraktionen sowohl aus dem lymphoiden (CD3, CD19, CD56) als auch aus dem myeloiden System (Granulozyten, Monozyten) analysiert.

Die Analyse der Integrationsstellen und die nachfolgende Sequenzierung ergaben, dass die Hämatopoese in allen Patienten bis zum letzten analysierten Zeitpunkt polyklonal verlief. Die Auftrennung der Integrationsstellen auf einem hochauflösenden Spreadex-Gel zeigte allerdings bei Patient 1 und 3 stärkere Banden, die auf mögliche starke Integrationsklone hinweisen (**Abbildung 3.31**). Die nachfolgende Analyse der Integrationsstellen über die Zeit führte zur Detektion einer auffälligeren Integration bei Patient 1 in Intron 2 des Gens *CD109*. Der Beitrag dieses Klons zur Hämatopoese lag an den analysierten Zeitpunkten zwischen 19,53% und 31,80% (**Abbildung 3.32 a**). Das Gen *CD109* kodiert für ein Antigen, das auf der Zelloberfläche einiger HSC zu finden ist. Eine Integrationsstelle 740 bp stromaufwärts der TSS des Gens *SNRP70* („Small Nuclear Ribonucleoprotein 70 kda“) zeigte einen Beitrag von 28,86% 1760 Tage nach Gentherapie (**Abbildung 3.32 a**). *SNRP70* ist unter anderem an der Regulation des RNA-Spleißens beteiligt. Der Beitrag weiterer am letzten Zeitpunkt detektierter Integrationsstellen lag lediglich bei 0,07%-7,90%.

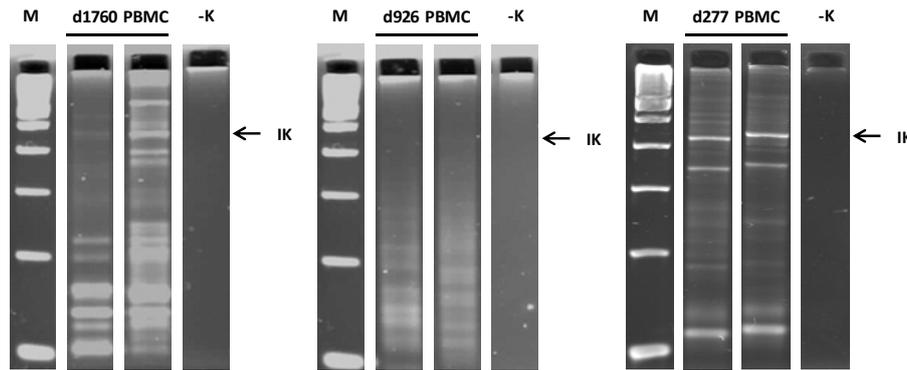


Abbildung 3.31: Darstellung der mithilfe der linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR detektierten Integrationsstellen in 3 ADA-SCID Patienten. Gezeigt sind jeweils der zuletzt analysierte Zeitpunkt von Patient 1 (linkes Gelbild), Patient 2 (mittleres Gelbild) und Patient 3 (rechtes Gelbild). Obwohl die hämatopoetische Repopulation bis zum letzten Zeitpunkt polyklonal verlief, konnten sowohl bei Patient 1 als auch Patient 2 auf dem hochauflösenden Spreadex-Gel starke Banden detektiert werden. Für die Analyse wurde jeweils 100 ng DNA verwendet. M, 100 bp Marker; d, Tage nach Transplantation; PBMC, „Peripheral Blood Mononuclear Cells“; -K, untransduzierte humane genomische DNA; IK, internes Vektorkontrollfragment; ADA-SCID, „Adenosin Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“.

Bei Patient 2 lag der Beitrag der einzelnen Integrationsstellen zur Hämatopoese zwischen 0,04% und 26,33%. Am zuletzt analysierten Zeitpunkt (926 Tage nach Genterapie) waren allerdings keine auffällig starken Integrationsstellen detektierbar. Bei Patient 3 betrug der Beitrag einer Integrationsstelle in dem Gen *KCNJ15* („Potassium Inwardly-Rectifying Channel, Subfamily J, Member 15“) zwischen 33,88% und 42,89% in den analysierten Fraktionen 277 Tage nach Transplantation (Abbildung 3.32 b).

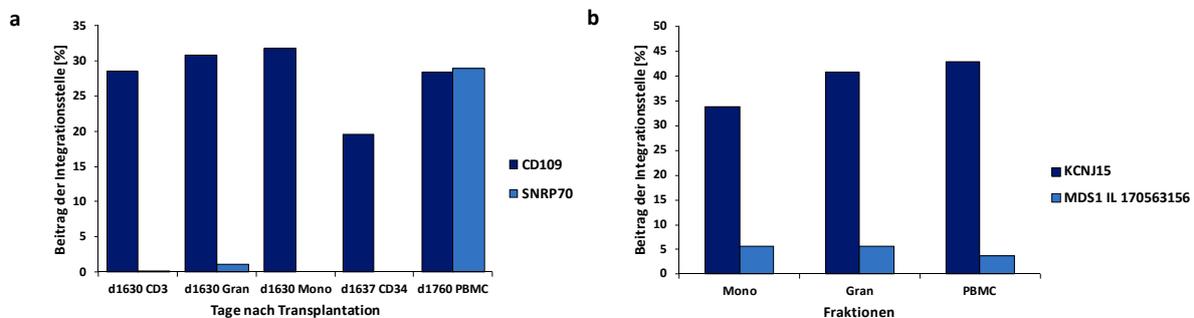


Abbildung 3.32: Beitrag einzelner Integrationsklone zur Hämatopoese. (a) Eine Integrationsstelle in Intron 2 des Gens *CD109* konnte bei Patient 1 1630 Tage nach Transplantation in CD3+-Zellen, Granulozyten und Monozyten, an Tag 1637 in CD34+ Zellen und an Tag 1760 in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) mit einem Beitrag von 19,53%-31,80% detektiert werden. Weiterhin wurde eine Integration stromaufwärts des Gens *SNRP70* detektiert, dessen Beitrag von 0,20%-1,05% an Tag 1630 nach Genterapie auf 28,86% 1760 Tage nach Genterapie anstieg. (b) In Patient 3 wurde eine Integrationsstelle in Intron 2 des Gens *KCNJ15* in allen analysierten Fraktionen 277 Tage nach Transplantation mit einem Beitrag von 33,88%-42,89% gefunden. Der stärkste detektierte *MDS1*-Integrationsklon zeigte einen Beitrag zur Hämatopoese von 3,71%-5,75%. d, Tage nach Transplantation; CD3, CD3+ Zellen; Gran, Granulozyten; Mono, Monozyten; CD34, CD34+ Zellen; PBMC, „Peripheral Blood Mononuclear Cells“; IL, Integrationsloкус; *KCNJ15*, „Potassium Inwardly-Rectifying Channel, Subfamily J, Member 15“; *MDS1*, „Myelodysplastic Syndrome 1“; *CD109*, „Cluster of Differentiation 109“; *SNRP70*, „Small Nuclear Ribonucleoprotein 70 kda“.

KCNJ15 kodiert für das Protein $K_{ir}4.2$, das einen Kalium-Kanal in der Zellmembran darstellt. Die Größe des amplifizierten Fragmentes betrug ~ 150 bp und stimmt mit eine der stärkeren Banden auf dem Spreadex Gel überein. Die zweite stärkere Bande bei ~ 350 bp könnte zu einer Integration in dem bekannten Protoonkogen *MDS1* gehören. Der Beitrag dieser Integrationsstelle lag zwischen 3,71% und 5,75% und sie stellte somit den stärksten detektierten *MDS1*-Klon dar (**Abbildung 3.32 b**).

3.2.3.2 Charakterisierung bevorzugter Integrationsorte

Bei allen 3 Patienten konnten bevorzugte Integrationsorte beobachtet werden, an denen mehr als eine Integration stattgefunden hat (auch CIS für „Common Integration Site“ genannt). Es konnten CIS detektiert werden, an denen 2 bis 9 Integrationsstellen beteiligt sind. Auffallend hierbei war das Auftreten dieser bevorzugter Integrationsorte in oder in der Nähe der bekannten Protoonkogene *MEIS1*, *MDS1-EV11* und *LMO2* (**Abbildung 3.33**). In Patient 1 wurde eine CIS 3. Ordnung in dem *MEIS1* Genlokus und in Patient 2 eine CIS 3. Ordnung in dem *LMO2* Genlokus detektiert. Zusätzlich lagen in Patient 2 9 Integrationsstellen und in Patient 3 6 Integrationsstellen innerhalb von 221-250 kb in den beiden Genloki *MDS1-EV11*.

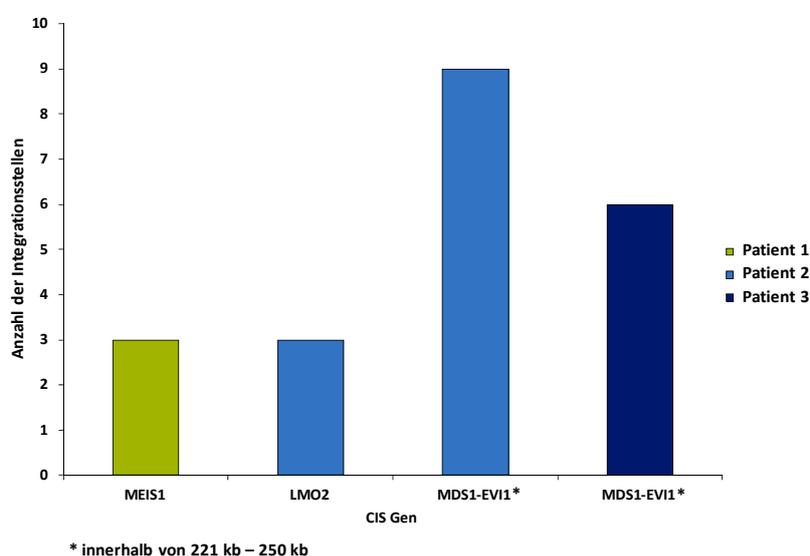


Abbildung 3.33: Bevorzugte Integrationsorte („Common Integration Sites“, CIS) in bekannten Protoonkogenen. Für alle drei Patienten konnten mehrere Integrationsstellen in bekannten Protoonkogenen detektiert werden. In Patient 1 konnten 3 Integrationsstellen in dem *MEIS1*-Lokus und in Patient 2 3 Integrationsstellen in bzw. in der Nähe des *LMO2*-Lokus in einem Abstand ≤ 50 kb gefunden werden. Weiterhin wurden in Patient 2 9 Integrationsstellen in den Genloki *MDS1-EV11* und in Patient 3 ebenfalls 6 Integrationsstellen in den Genloki *MDS1-EV11* in einem Abstand von 221 kb-250 kb detektiert. kb, Kilobasen; *MEIS1*, „Meis Homeobox 1“; *LMO2*, „LIM Domain Only 2“; *MDS1*, „Myelodysplastic Syndrome 1“; *EV11*, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; CIS, „Common Integration Site“.

3.2.4 Retrovirale Gentherapie des Wiskott-Aldrich Syndroms (WAS)

Im Rahmen einer klinischen WAS-Gentherapiestudie wurden insgesamt 8 Patienten behandelt. Nach *ex vivo* Transduktion CD34+ Zellen mit einem MLV-basierenden Vektor, der das Transgen *WASP* trägt und Konditionierung der Patienten mit Busulfan wurden die autologen Zellen reinfundiert. In dieser Arbeit wurde das Integrationsstellenprofil von 2 der 8 behandelten Patienten charakterisiert. Hiefür wurden uns freundlicherweise im Rahmen der Kooperation mit Prof. Dr. Christoph Klein verschiedene Proben zur Verfügung gestellt. Beide Patienten waren zum Zeitpunkt der Gentherapie 3 Jahre alt und zeigten nach Behandlung einen Rückgang der mit der Krankheit verbundenen Symptome. Der Anteil genkorrigierter CD34+ Zellen im Knochenmark betrug 2,5 Jahre nach Gentherapie 9% für Patient 1 und 20% für Patient 2 (Boztug et al., in Begutachtung bei NEJM 2010). Die Behandlung der Patienten 3-8 wurde in den letzten 8 Monaten durchgeführt und die Integrationsstellenanalyse der Proben wird momentan vorgenommen und ist daher nicht in dieser Arbeit beschrieben.

3.2.4.1 Klonalitätsanalyse der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation

Die Integrationsstellenanalyse wurde mithilfe der LAM-PCR und der Pyrosequenzierung (GS FLX) unter der Verwendung von Zellen aus dem Blut und aus dem Knochenmark, CD3+ Zellen, Granulozyten und Lymphknotengewebe durchgeführt. Um eine größtmögliche genomische Zugänglichkeit für die Integrationsstellenanalyse zu erreichen, wurden für die LAM-PCR verschiedene Enzymen (nicht CG-Motive) verwendet. Wir haben ebenfalls begonnen, die Proben mit der nrLAM-PCR zu analysieren, allerdings sind diese Analysen noch nicht abgeschlossen und werden daher in dieser Arbeit nicht beschrieben.

Für Patient 1 erstreckte sich der Zeitraum der Analyse von Tag 25 bis Tag 985 nach Gentherapie, für Patient 2 von Tag 21 bis Tag 891 nach Gentherapie. Bei beiden Patienten verlief die hämatopoetische Repopulation sowohl im peripheren Blut und Knochenmark als auch in gesorteten lymphoiden CD3+-Zellen und myeloiden Granulozyten bis zum letzten Zeitpunkt polyklonal mit insgesamt 5709 detektierbaren Integrationsstellen für Patient 1 und 9538 detektierbaren Integrationsstellen für Patient 2 (**Abbildung 3.34**).

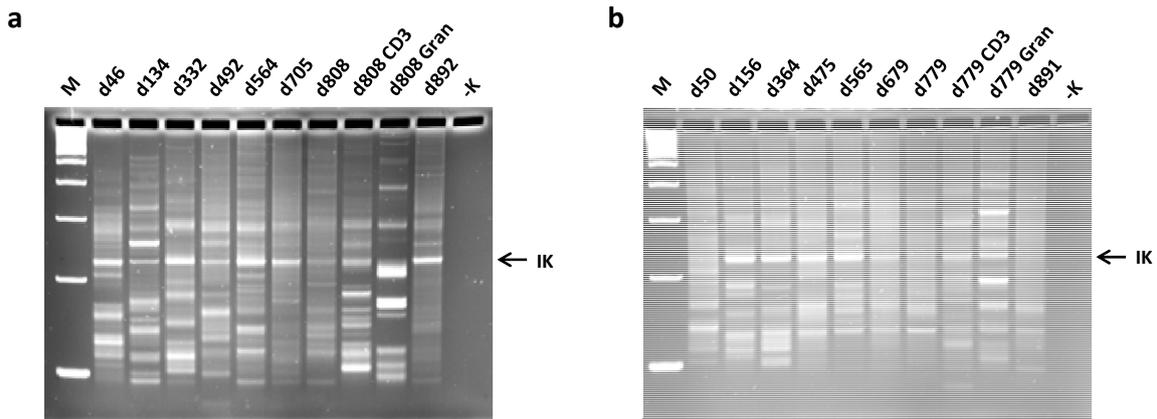


Abbildung 3.34: Klonalitätsanalyse mithilfe der linearen amplifikationsmedierten (LAM)-PCR unter der Verwendung des Enzyms *Tsp509I* in zwei WAS-Patienten nach Genterapie. Sowohl bei Patient 1 (a) als auch bei Patient 2 (b) konnte bis zum letzten analysierten Zeitpunkt eine polyklonale Repopulation der Hämatopoese beobachtet werden. M, 100 bp Marker; d, Tage nach Transplantation; CD3, CD3+-Zellen; Gran, Granulozyten; -K, untransduzierte humane genomische DNA; IK, internes Vektorkontrollfragment; WAS, Wiskott-Aldrich Syndrom. Modifiziert aus Kaan et al., 2010.

Abbildung 3.35 zeigt das polyklonale Integrationsstellenmuster der Patienten 3-6, deren Analyse momentan durchgeführt wird.

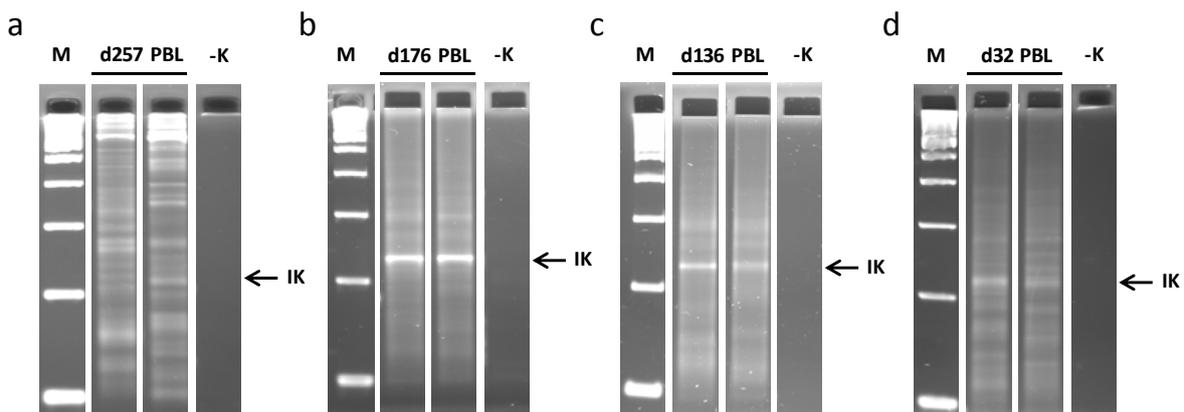


Abbildung 3.35: Darstellung des mithilfe der linearen amplifikationsmedierten PCR (LAM-PCR) detektierten Integrationsstellenmusters der Patienten 3-6 einer erfolgreichen WAS Genterapiestudie unter Verwendung des Restriktionsenzym *Tsp509I*. (a) Integrationsstellenverteilung des Patienten 3. (b) Integrationsstellenverteilung des Patienten 4. (c) Integrationsstellenverteilung des Patienten 5. (d) Integrationsstellenverteilung des Patienten 6. Alle Patienten zeigen eine polyklonale Repopulation der Hämatopoese. M, 100 bp Marker; d, Tage nach Transplantation; PBL, Zellen aus dem peripheren Blut; -K, untransduzierte humane genomische DNA; IK, internes Vektorkontrollfragment; WAS, Wiskott-Aldrich Syndrom.

Um eine genaue Aussage über den Beitrag einzelner Integrationsstellen treffen zu können, wurden mittels der durch die Sequenzierung erhaltenen „Sequence Counts“ die 10 stärksten Integrationsklone an jedem analysierten Zeitpunkt untersucht. Einige der analysierten Integrationsstellen lagen sowohl bei Patient 1 als auch bei Patient 2 an mehreren Zeitpunkten unter den Integrationsklonen, die den höchsten Beitrag leisten (**Abbildung 3.36** und **Abbildung**

3.38). Bei Patient 1 konnte unter anderem eine Integrationsstelle stromaufwärts der TSS des Protoonkogens *CCND2* detektiert werden, die 705 Tage nach Gentherapie mit 12,6% den stärksten Klon darstellte. An den darauffolgenden analysierten Zeitpunkten sank der Beitrag auf 0,48%-1,98% (**Abbildung 3.36**). Die quantitative Analyse des Beitrags mithilfe der „Realtime“-PCR ergab ab Tag 332 ebenfalls einen kontinuierlichen Anstieg von 0,4% bis 7,5% an Tag 564. An Tag 606 war der Beitrag kurz etwas niedriger, stieg allerdings an Tag 705 wieder auf 7,2% an. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Sequenzierung, sank bei der Analyse mittels „Realtime“-PCR der Beitrag an den letzten analysierten Zeitpunkten nicht, stattdessen kam es zu einem weiteren Anstieg auf 10%-11% (**Abbildung 3.37**).

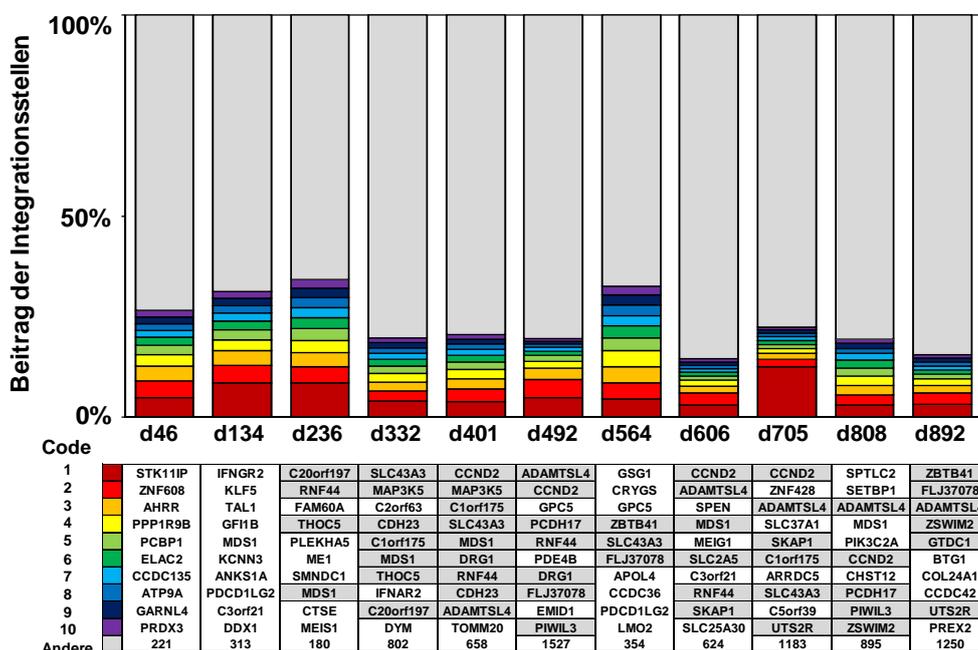


Abbildung 3.36: Analyse des Beitrags der einzelnen Integrationsklone über die Zeit bei Patient 1. An jedem analysierten Zeitpunkt wurde der Beitrag der 10 stärksten Klone ermittelt. ‚Rot‘ unterlegt stellt dabei den stärksten Klon und ‚lila‘ unterlegt den 10. stärksten Klon dar. In ‚grau‘ sind die restlichen Integrationsstellen dargestellt. Die Tabelle unter dem Diagramm gibt den jeweiligen Genlokus an, der von der Integration betroffen ist. ‚Gru‘ markierte Gennamen weisen daraufhin, dass die Integrationsstelle an mehreren Zeitpunkten zu den 10 stärksten Integrationsstellen zählte. d, Tage nach Gentherapie. Modifiziert aus Kaan et al., 2010.

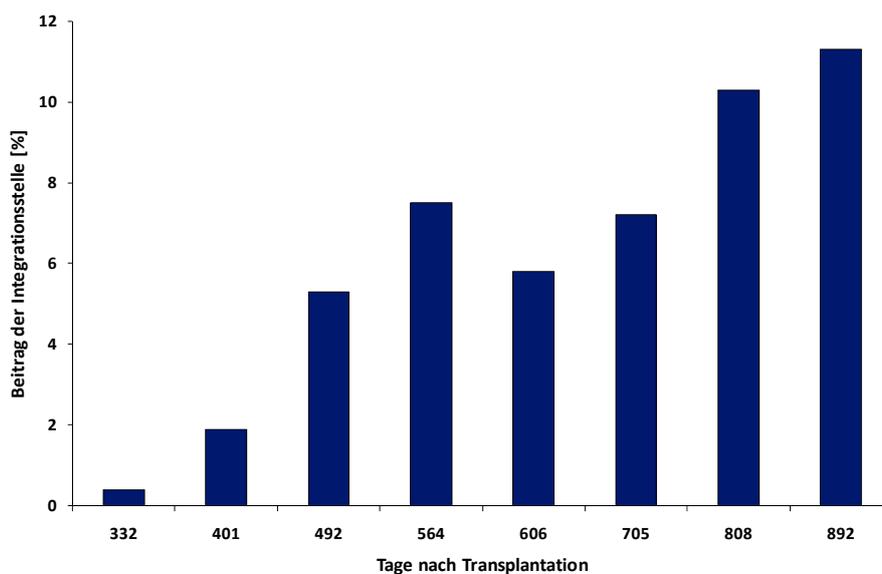


Abbildung 3.37: Quantitative Analyse des Beitrags einer *CCND2*-Integration in Patient 1 mittels „Realtime“-PCR. Die quantitative Analyse ermöglichte die Detektion des *CCND2*-Klons erstmals 332 Tage nach Gentherapie mit einem Beitrag von 0,4%. Ab diesem Tag stieg der Beitrag kontinuierlich an und betrug am letzten analysierten Zeitpunkt 11,3%. *CCND2*, „*CCND2* Cyclin D2“.

Eine Integrationsstelle stromaufwärts der TSS von *TRAF1* („TNF Receptor-Associated Factor 1“) leistete 156 Tage bis 364 Tage und 475 Tage nach Gentherapie bei Patient 2 den stärksten Beitrag (**Abbildung 3.38**). An den beiden darauffolgenden Zeitpunkten (566 und 679 Tage nach Gentherapie) sank der Beitrag, der Klon zählte allerdings weiterhin zu den 10 stärksten Integrationsstellen. An den letzten analysierten Zeitpunkten wurde dieser Klon nicht mehr unter den 10 stärksten Integrationsstellen detektiert. Das TRAF1 Protein ist an der Regulation der durch TNF („Tumor Necrosis Factor“-)Rezeptoren vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Weiterhin konnte am letzten analysierten Zeitpunkt (891 Tage nach Gentherapie) eine Integration im *MDS1*-Protoonkogen als stärkster Klon beobachtet werden (**Abbildung 3.38**). Diese Integrationsstelle wurde erstmals 246 Tage nach Gentherapie mit einem Beitrag von 0,1% detektiert. Bis Tag 779 nach Gentherapie stieg der Beitrag auf 2,2% und am letzten analysierten Zeitpunkt leistete dieser Klon einen Beitrag von 4,4% zur hämatopoetischen Repopulation.

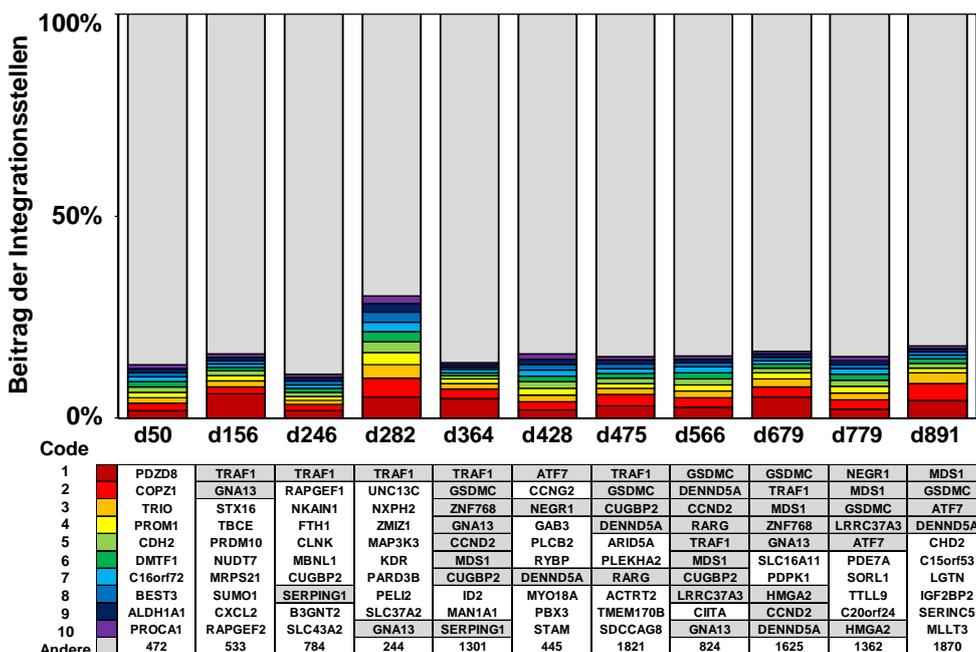


Abbildung 3.38: Analyse des Beitrags der einzelnen Integrationsklone über die Zeit bei Patient 2. An jedem analysierten Zeitpunkt wurde der Beitrag der 10 stärksten Klone ermittelt. ‚Rot‘ unterlegt stellt dabei den stärksten Klon und ‚lila‘ unterlegt den 10. stärksten Klon dar. In ‚grau‘ sind die restlichen Integrationsstellen dargestellt. Die Tabelle unter dem Diagramm gibt den jeweiligen Genlokus an, der von der Integration betroffen ist. ‚Gru‘ markierte Gennamen weisen daraufhin, dass die Integrationsstelle an mehreren Zeitpunkten zu den 10 stärksten Integrationsstellen zählte. d, Tage nach Genterapie. Modifiziert aus Kaan et al., 2010.

3.2.4.2 Charakterisierung bevorzugter Integrationsorte

Die Analyse der bevorzugten Integrationsorte zeigte, dass für beide Patienten zahlreiche Integrationsstellen in den bekannten Protoonkogenen *MDS1-EVI1*, *LMO2*, *CCND2* und *PRDM16* detektiert werden konnten (Abbildung 3.39). Bei Patient 1 fanden 81 Integrationen in oder in der Nähe von *MDS1-EVI1* statt, 13 in oder in der Nähe von *LMO2*, 11 in oder in der Nähe von *CCND2* und 10 Integrationsstellen lagen in dem *PRDM16* Genlokus. 705 Tage nach Genterapie, der Zeitpunkt an dem der starke *CCND2*-Klon detektiert wurde, beträgt der Anteil aller detektierten *CCND2* Integrationen > 10%.

94 Integrationsstellen in oder in der Nähe von *MDS1-EVI1* konnten bei Patient 2 beobachtet werden, weiterhin 29 Integrationsstellen in dem *LMO2*-Lokus, 18 in dem *CCND2*-Lokus und 28 in dem *PRDM16*-Lokus. Der Beitrag der Integrationsstellen in den Genen *MDS1-EVI1* war am zuletzt analysierten Zeitpunkt am stärksten (891 Tage nach Transplantation) und liegt zwischen 5% und 10%. Genau an diesem Zeitpunkt konnte eine der *MDS1*-Integrationen als stärkster Klon detektiert werden.

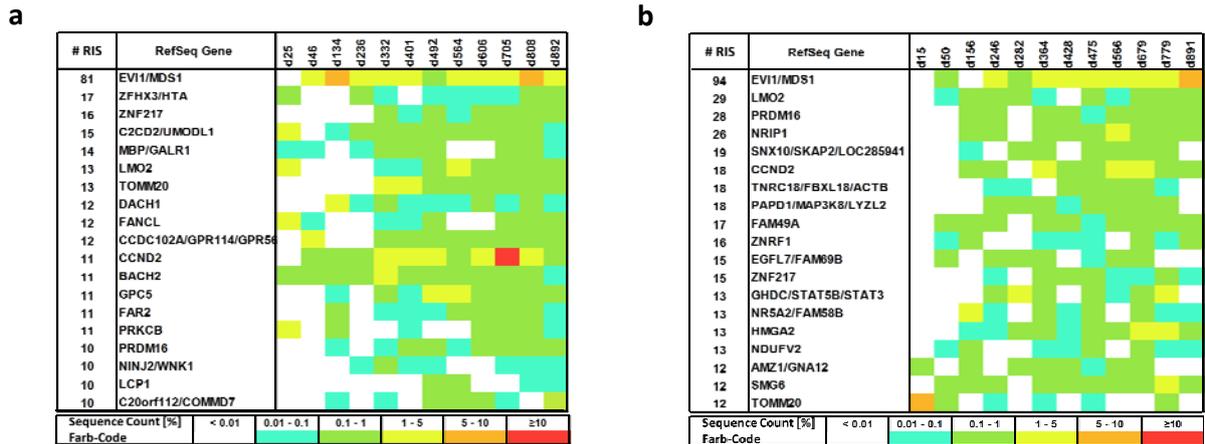


Abbildung 3.39: Darstellung der bevorzugten Integrationsorte und deren Beitrag zur Hämatopoese für Patient 1 und 2. (a) Für Patient 1 konnten insgesamt 81 Integrationsstellen in den Genloki *MDS1* und *EVI1* detektiert werden. Weitere betroffene Protoonkogene waren *LMO2* mit 13 Integrationsstellen, *CCND2* mit 11 Integrationsstellen und *PRDM16* mit 10 Integrationsstellen. (b) Bei Patient 2 konnten 94 Integrationsstellen in den Genloki *MDS1-EVI1*, 29 in dem *LMO2*-Lokus, 28 in dem *PRDM16*-Lokus und 18 in dem *CCND2*-Lokus detektiert werden. RIS, retrovirale Integrationsstellen; d, Tage nach Gentherapie; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; EVI1, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; CCND2, „CCND2 Cyclin D2“; LMO2, „LIM Domain Only 2“; PRDM16, „PR Domain Containing 16“. Modifiziert aus Kaan et al., 2010.

3.2.4.3 Analyse der Integrationsstellen in gesorteten Fraktionen

Die Analyse gesorteter lymphoider CD3+ Zellen und myeloider Granulozyten hinsichtlich der Integrationsstellen in bekannten Protoonkogenen sollte ermöglichen, den Beitrag dieser Klone zum myeloiden und lymphoiden System getrennt zu betrachten. So konnte gezeigt werden, dass *MDS1-EVI1*-, *PRDM16*- und *SETBP1*-Integrationsklone vorwiegend zur myeloiden Hämatopoese, wohingegen *LMO2*-, *CCND2*- und *BMI1*-Integrationsklone vorwiegend zur Hämatopoese im lymphoiden System beitragen (**Abbildung 3.40**).

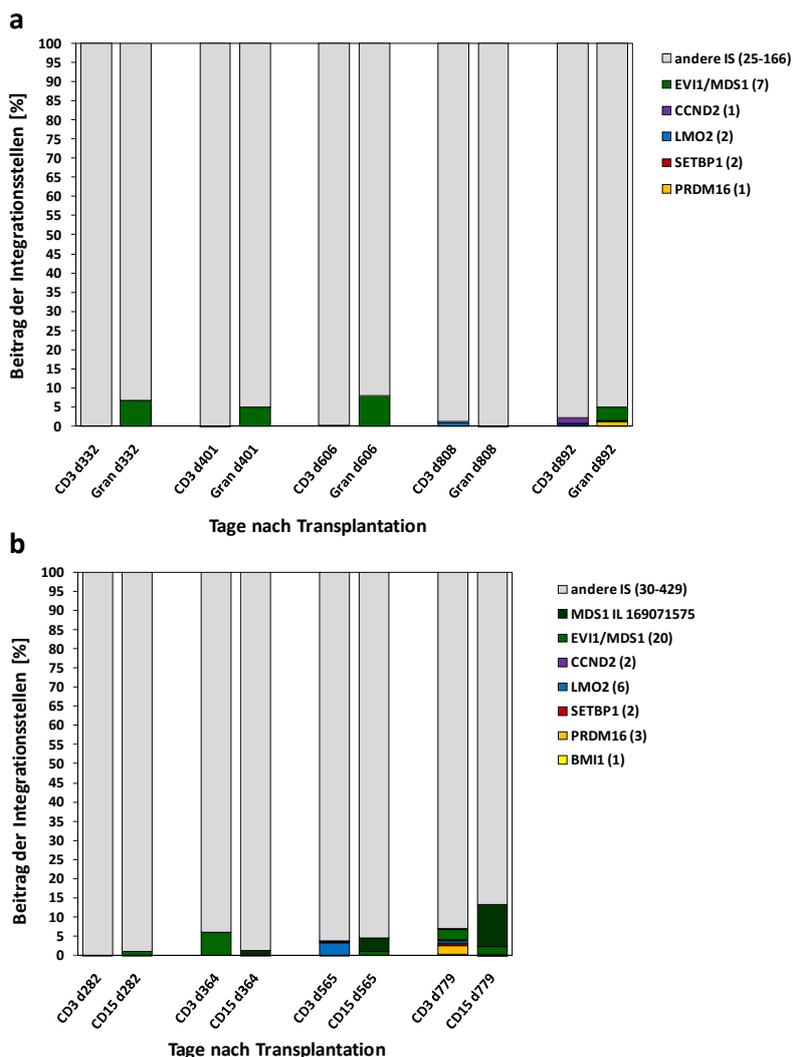


Abbildung 3.40: Integrationsstellenanalyse gesorteter lymphoider CD3+-Zellen und myeloider Granulozyten in beiden Patienten. Die Analyse gesorteter lymphoider und myeloider Fraktionen zeigte für Patient 1 (a) als auch für Patient 2 (b), dass die Integrationsstellen in den Genloki *MDS1-EVI1*, *PRDM16* und *SETBP1* vorwiegend zur myeloiden und die Integrationsstellen in den Genloki *LMO2*, *CCND2* und *BMI1* vorwiegend zur lymphoiden Hämatopoese beitragen. In Klammer hinter dem jeweiligen Gennamen ist die Anzahl an Integrationsstellen gezeigt, die detektiert werden konnten. CD3; CD3+-Zellen; Gran, Granulozyten; d, Tage nach Transplantation; IS, Integrationsstellen; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; EVI1, „Ecotropic Viral Integration Site 1“; CCND2, „CCND2 Cyclin D2“; LMO2, „LIM Domain Only 2“; SETBP1, „SET Binding Protein 1“; PRDM16, „PR Domain Containing 16“; BMI1, „BMI1 Polycomb Ring Finger Oncogene“; IL, Integrationsloкус. Modifiziert aus Kaan et al., 2010.

4 DISKUSSION

Retrovirale Vektoren gewährleisten durch ihre stabile Integration in das Wirtsgenom der Zielzelle die Langzeitexpression eines therapeutischen Transgens in der klinischen Gentherapie. Weiterhin ermöglichen sie eine *in vivo* Markierung einzelner Zellklone. Die anfängliche Annahme, dass die Integration dieser Vektoren zufällig verläuft (Williams et al., 1984), konnte in nachfolgenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. So wurde beobachtet, dass die Integration der gammaretroviralen Vektoren bevorzugt in genkodierenden Bereichen stattfindet und insbesondere in der Nähe der TSS (Mooslehner et al., 1990; Scherdin et al., 1990, Schroeder et al., 2002; Wu et al., 2003; Mitchell et al., 2004, Deichmann et al., 2007, Schwarzwaelder et al., 2007).

Die in der Gentherapie verwendeten gammaretroviralen Vektoren tragen im LTR sowohl Verstärkerelemente als auch einen Promoter, der die Expression des therapeutischen Transgens reguliert. Die stabile Integration dieser Vektoren in das Wirtsgenom gewährleistet die dauerhafte Expression des Transgens, birgt allerdings auch ein erhöhtes Sicherheitsrisiko. Die Integration in genkodierende Regionen kann zum einen dazu führen, dass das betroffene Gen nicht mehr funktionsfähig ist und somit keine Expression mehr stattfindet. Zum anderen kann die Integration durch die im LTR enthaltenen Verstärkerelemente eine Überexpression zellulärer Gene hervorrufen. So konnte in *in vitro* und *in vivo* Maus- und nicht humanoiden Primatenstudien unter Verwendung gammaretroviraler Vektoren die Entstehung klonaler Dominanz bis hin zur Leukämie beobachtet werden (Li et al., 2002; Du et al., 2005; Modlich et al., 2005; Calmels et al., 2005; Kustikova et al., 2005, Seggewiss et al., 2006, Montini et al., 2006, Modlich et al., 2006, Modlich et al., 2008, Montini et al., 2009). In drei erfolgreichen klinischen Gentherapiestudien entwickelten 7 der insgesamt 21 behandelten Patienten eine vektorinduzierte Leukämie (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008; Stein et al., 2010). Die Behandlung von insgesamt über 20 Patienten im Rahmen einer erfolgreichen WAS und zwei erfolgreichen ADA-SCID gammaretroviralen Gentherapiestudien führte dagegen bisher nicht zur Entstehung vektorinduzierter Nebenwirkungen (Aiuti et al., 2002; Gaspar et al., 2006; Aiuti et al., 2009, Boztug et al., in Begutachtung bei NEJM 2010). Das Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen sowohl in präklinischen als auch in klinischen Gentherapiestudien zeigt die Notwendigkeit der Durchführung von Integrationsstellenanalysen, um das Risiko des verwendeten Vektorsystems abschätzen und zukünftige klinische Gentherapiestudien sicherer gestalten zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische Zugänglichkeit der Integrationsstellenanalyse unter Verwendung der linearen amplifikationsmedierten PCR (LAM-PCR) mithilfe eines mathematischen Modells berechnet, um die Effizienz der LAM-PCR Analyse unter definierten Parametern von vornherein bestimmen zu können. Weiterhin wurde eine nicht restriktive (nr) LAM-PCR für die umfassende Analyse von Integrationsstellen (ohne die Verwendung von Endonukleasen) etabliert. Mit den durchgeführten Integrationsstellenanalysen an Patientenmaterial von zwei X-CGD, einer ADA-SCID und einer WAS Gentherapiestudie konnten Integrationscharakteristika der verwendeten gammaretroviralen Vektoren untersucht und mögliche Risiken frühzeitig erkannt werden.

4.1 Integrationsstellenanalyse und genomische Zugänglichkeit der linearen amplifikationsmedierten PCR (LAM-PCR)

Es existieren bereits einige Methoden, die es ermöglichen, Integrationsstellen zu amplifizieren und durch Sequenzierung den genauen Integrationslokus zu bestimmen (Mueller et al., 1989; Pfeifer et al., 1989; Silver et al., 1989). Die LAM-PCR stellt hierbei die sensitivste Methode dar, die es durch anfängliche lineare Amplifikation der Vektor-Genom Übergänge ermöglicht, die Integrationsstellen bis auf Einzelzellniveau zu detektieren (Schmidt et al., 2001; Schmidt et al., 2007; Schmidt et al., 2009).

Alle der bisher etablierten Methoden verwenden Restriktionsenzyme, die zu einer Fragmentierung der amplifizierten Vektor-Genom Übergänge führen. Abschließend erfolgt jeweils eine PCR Amplifikation der Vektor-Genom Übergänge, bei der kürzere Fragmente wesentlich effizienter amplifiziert werden als längere Fragmente. So kann jede der etablierten Methoden nur eingeschränkt die existierenden Integrationsstellen darstellen. Liegt die Schnittstelle des verwendeten Restriktionsenzym zu weit von der Integration entfernt, dann entsteht ein für die Amplifikation zu langes Fragment und die Integration kann nicht detektiert werden. Weiterhin werden für die Zuordnung der Integration im jeweiligen Genom mindestens 20 bp genomische DNA benötigt. Dies kann dazu führen, dass zu kurze Fragmente, bei denen die Restriktionsschnittstelle des verwendeten Enzyms zu nah an der Integration liegt, nicht sequenziert werden können (**Abbildung 3.2**). Die anschließende Sequenzierung der Fragmente mithilfe der Pyrophosphat-Sequenzierertechnologien (GS FLX) reicht nicht aus, um diese Beschränkungen aufzuheben (Wang et al., 2008). So war es unklar, wie umfassend Integrationsstellenanalysen unter Verwendung bestimmter Restriktionsenzyme und PCR

Parameter in einzelnen Projekten durchgeführt werden, und zu welchem Anteil die Integrationsstellen zugänglich sind.

Um eine effiziente und umfassende Integrationsstellenanalyse gewährleisten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein mathematisches Modell erstellt, das es erlaubt, das für die Integrationsstellenanalyse zugängliche Genom für die verschiedenen Restriktionsenzyme unter Verwendung der LAM-PCR zu berechnen. Somit hilft dieses mathematische Modell dabei, die „besten“ Restriktionsenzyme zu finden, die die höchste genomische Zugänglichkeit ermöglichen und somit die effizienteste Integrationsstellenanalyse gewährleisten.

Das Berechnen der genomischen Zugänglichkeit für verschiedene Restriktionsenzyme, die ein 4 bp Restriktionsmotiv aufweisen, zeigte, dass Enzyme mit einem nicht CG-Motiv deutlich solchen überlegen sind, die ein CG-Motiv aufweisen (**Abbildung 3.3**). So können unter der Verwendung eines CG-Motivs lediglich 2,9%-11,2% der Integrationsstellen detektiert werden, wohingegen ein nicht CG-Motiv die Detektion von 23,5%-54,5% der Integrationsstellen ermöglicht (**Abbildung 3.3**). Das für die Integrationsstellenanalyse zugängliche Genom kann weiter durch die Verwendung mehrerer nicht CG-Motive gesteigert werden (**Abbildung 3.4**). Um eine genomische Zugänglichkeit von etwa 90% gewährleisten zu können, müssen fünf verschiedene nicht CG-Motive für die Integrationsstellenanalyse eingesetzt werden. Auch die Amplifikationslänge hat einen Einfluss auf den Anteil der detektierbaren Integrationsstellen. So steigt mit zunehmender maximaler Amplifikationslänge ebenfalls die genomische Zugänglichkeit für die Integrationsstellenanalyse (**Abbildung 3.5**).

Die Validierung unseres Modells wurde an präklinischen und klinischen Datensätzen durchgeführt und bestätigte, dass die Amplifikation von Fragmenten bis zu 200 bp deutlich bevorzugt ist. So wiesen trotz Verwendung der CG-Motive ACGT und GCGC, die im Schnitt nur alle 1330 bp-1728 bp im humanen Genom schneiden (**Tabelle 3.1**), ~ 65% aller Fragmente eine Länge ≤ 200 bp auf (**Abbildung 3.6**), entgegen einer zu erwartenden Durchschnittslänge von ~665 bp-865 bp. Die Durchführung der Integrationsstellenanalyse einer leukämischen X-SCID Patientenprobe zeigte ebenfalls deutlich mögliche Limitationen der LAM-PCR und die Wichtigkeit der Abschätzung der genomischen Zugänglichkeit vor der Durchführung der Integrationsstellenanalyse (Howe et al., 2008). Die LAM-PCR wurde ausgehend von dem 5'-LTR mit den Enzymen *Tsp509I* (AAT^T) und *HinP1I* (GCGC) durchgeführt. Für die 3'-LTR LAM-PCR wurde ebenfalls das Enzym *Tsp509I* (AAT^T) und weiterhin das Enzym *MseI* (TTAA)

verwendet. Nur unter Verwendung der nicht CG-Motive für die 3'-LTR LAM-PCR konnte der dominante Klon, der eine Integration 35 kb stromaufwärts der TSS des Protoonkogens *LMO2* aufwies (Howe et al., 2008), detektiert werden (**Abbildung 3.12**). Der dominante maligne Klon konnte dagegen in keinem der beiden 5'-LTR LAM-PCR Ansätze nachgewiesen werden, da die verwendeten Restriktionsenzyme zu weit von der Integration entfernt waren und somit keine effiziente Amplifikation der Vektor-Genom Übergänge gewährleisteten (**Abbildung 3.13**). Die Ermittlung der um die Integrationsstelle liegenden Restriktionsmotive zeigte, dass von 22 möglichen Motiven nur 8 eine Detektion des dominanten Klons ermöglichen konnten (**Abbildung 3.13**).

Das in dieser Arbeit etablierte mathematische Modell zur Berechnung der genomischen Zugänglichkeit erlaubt die Abschätzung der durch das verwendete Restriktionsenzym detektierbaren Integrationsstellen und ermöglicht die Berechnung der effizientesten Kombination von Restriktionsenzymen vor der praktischen Durchführung, um eine möglichst umfassende Integrationsstellenanalyse zu gewährleisten.

4.2 Steigerung der Zugänglichkeit von Integrationsloki im Genom durch nicht-restriktive Integrationsstellenanalyse

Die Verwendung von mehreren Restriktionsenzymen um eine weitestgehend umfassende Analyse mittels LAM-PCR zu gewährleisten, ist sehr zeit- und kostenaufwendig. Die Etablierung einer nicht restriktiven LAM-PCR im Rahmen dieser Arbeit ermöglicht die Detektion der Integrationsstellen ohne Verwendung von Restriktionsenzymen und den damit verbundenen Limitationen. Nach einer linearen Amplifikation des Vektor-Genom Übergangs kann durch direkte Ligation einer einzelsträngigen Linkersequenz an das unbekannte genomische Ende die Doppelstrangsynthese und der Restriktionsverdau umgangen werden. Anschließend erfolgt die exponentielle Amplifikation der Fragmente (**Abbildung 3.7**).

Der Entstehung zu langer Fragmente während der linearen Amplifikation wurde durch Reduktion der Elongationszeit und Verringerung der dNTP Konzentration entgegengewirkt (**Abbildung 3.8**). Bereits bei früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Reduktion der Denaturierungstemperatur von 95°C auf 90°C zu einem Verlust langer Fragmente führt (Yap et al., 1991). Daher wurde die Denaturierungstemperatur für die exponetiellen PCR-Ansätze ebenfalls reduziert (**Abbildung 3.8**). In Verbindung mit einer kurzen Elongationszeit von 5 sek

und einer dNTP-Konzentration von 0,5 mM zur Durchführung der linearen PCR wird die Amplifikation von DNA-Fragmenten ermöglicht, die vorwiegend eine Länge zwischen 100 bp und 300 bp aufweisen.

Die Sensitivität der nrLAM-PCR ist durch die ineffizientere Einzelstrang-Ligation geringer als die der LAM-PCR, etwa vergleichbar mit der Sensitivität der Inversen PCR und der LM-PCR. Bei Verfügbarkeit einer ausreichenden Probenmenge (100 ng-1000 ng; 100% der Zellen transduziert) bietet die nrLAM-PCR allerdings die Möglichkeit das Integrationsstellenprofil schnell und verlässlich in mono-polyklonalen Proben zu analysieren.

Die Vermeidung der mit dem Restriktionsverdau verbundenen Limitationen konnte bei einer vergleichenden Analyse von 3 lentiviral transduzierten HeLa Einzelzellklonen gezeigt werden. Die Analyse der Klone mithilfe der LAM-PCR unter der Verwendung der Restriktionsenzyme *MseI* und *HinPII* erlaubte die Detektion einer Integrationsstelle in jedem Einzelzellklon (**Abbildung 3.10** und **Tabelle 3.2**). Allerdings konnten mit jedem einzelnen Enzym nur jeweils zwei der drei Integrationsstellen nachgewiesen werden. Die Ermittlung der Entfernung der Restriktionsschnittstellen zu den Integrationsstellen zeigte, dass die amplifizierten Fragmente entweder zu kurz oder zu lang für eine effiziente Integrationsstellenanalyse waren (**Tabelle 3.2**). Die nrLAM-PCR dagegen ermöglichte die Detektion der vorhandenen Integrationsstellen in nur einem Ansatz (**Abbildung 3.10**). Eine zweite Integrationsstelle in einem der Klone konnte nur mit der nrLAM-PCR nachgewiesen werden. Auch die Verwendung von zwei Enzymen für die LAM-PCR erlaubte die Detektion dieser Integrationsstelle nicht (**Tabelle 3.2**).

Die Analyse von 5 lentiviral transduzierten T-Zellklonen, die zuvor mithilfe der LM-PCR analysiert wurden, erlaubte die Detektion von 5-13 Integrationsstellen in nur einem Ansatz (**Abbildung 3.11 a**). Die LM-PCR dagegen, die nur mit dem Enzym *MseI* durchgeführt wurde, ermöglichte die Detektion von 1-5 Integrationsstellen. Auch hier zeigte die Ermittlung der Entfernung der *MseI*-Restriktionsschnittstelle von der Integrationsstelle, dass die *MseI*-Schnittstelle zu nah bzw. zu weit entfernt lag, um eine Detektion zu gewährleisten.

Weiterhin konnten die Integrationsstellen von verschiedenen mono-polyklonalen präklinischen und klinischen Proben effizient mit der nrLAM-PCR bestimmt werden (**Abbildung 3.11 b** und **c**). So war es möglich, den dominanten Klon in der leukämischen Patientenprobe einer X-SCID Gentherapiestudie (Howe et al., 2008) mit nur einem Ansatz in 98% der Zellen nachzuweisen (**Abbildung 3.14**). Für die Analyse mit der LAM-PCR mussten dagegen 4 verschiedene Ansätze

durchgeführt werden, um eine umfassende Integrationsstellenanalyse zu gewährleisten (**Abbildung 3.12**).

Bei der LAM-PCR weist jede Integrationsstelle eine für sich spezifische Länge auf, da nach der linearen Amplifikation die Fragmente mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden. Daher werden bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente aufgrund des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus einzelne Banden sichtbar, die jeweils einer Integrationsstelle entsprechen. Bei der nrLAM-PCR dagegen bestimmt allein die Polymerase-Aktivität in der linearen PCR die Länge der Fragmente. Da kein Restriktionsverdau durchgeführt wird, kommt es nicht zu einem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus und somit wird jede Integrationsstelle von Fragmenten unterschiedlicher Länge repräsentiert. Aus diesem Grund erscheinen bei der Auftrennung der Fragmente keine definierten Banden, sondern ein „Schmier“ auf dem Gel (**Abbildung 3.7**). Die Verwendung der nrLAM-PCR erlaubt es daher nicht, die Klonalität einer Probe anhand der Gelelektrophorese zu untersuchen. Um dies zu ermöglichen, müssen die mit der nrLAM-PCR analysierten Proben sequenziert werden. Je nach Laborausstattung und Projektfragestellung ist für die umfassende Integrationsstellenanalyse durchaus eine Kombination aus LAM-PCR und nrLAM-PCR sinnvoll. Um die Klonalität einer Probe sichtbar machen zu können, ist es ratsam die LAM-PCR zunächst mit zwei Enzymen, die eine möglichst große genomische Zugänglichkeit für die Integrationsstellenanalyse gewährleisten, durchzuführen. Anschließend werden die Proben mittels der nrLAM-PCR analysiert und sequenziert.

Die nrLAM-PCR ermöglichte die mit dem Restriktionsverdau auftretenden Einschränkungen zu umgehen und eine effiziente und umfassende Integrationsstellenanalyse durchzuführen. Somit konnte die Bestimmung des vollständigen klonalen Inventars verschiedener präklinischer und klinischer Proben erzielt werden. Aufgrund der ineffizienteren Einzelstrang-Ligation ist die Sensitivität der nrLAM-PCR geringer verglichen mit der LAM-PCR. Allerdings bewirkt die Verwendung der nrLAM-PCR eine Reduktion der Laborzeit um das 5- bis 10-fache und eine Reduktion der Kosten um das 10- bis 50-fache.

4.3 LAM-PCR/nrLAM-PCR und Pyrosequenzierung (GS FLX)

Die präzise und umfassende Analyse präklinischer und klinischer Proben erfordert die Darstellung von hunderten bis tausenden Integrationsstellen. Die Kombination der LAM-PCR bzw. der in dieser Arbeit etablierten nrLAM-PCR und der neuen Hochdurchsatz-Pyrophosphat-Sequenzierertechnologie (GS FLX) ermöglicht ein effizientes und kostengünstiges *in vivo* Monitoring in präklinischen und klinischen Studien. Die Pyrosequenzierung im Hochdurchsatz (Margulies et al., 2005) erzeugt bis zu 500000 Sequenzen in einem Sequenzierlauf (GS FLX System), der nur wenige Tage in Anspruch nimmt. Somit ergibt sich potentiell die Möglichkeit, das gesamte klonale Inventar einer transduzierten polyklonalen Probe zu detektieren.

Um die LAM-PCR/nrLAM-PCR Amplikons effizient sequenzieren zu können, wurde in unserem Labor eine Fusionsprimer-PCR etabliert. Diese PCR ermöglicht das Anbringen der sequenzerspezifischen Adaptoren an beide Enden der Amplikons. Durch Einfügen einer 2-6 bp langen Erkennungssequenz können > 100 LAM-PCR/nrLAM-PCR-Produkte parallel analysiert und die Kosten für die Integrationsstellenanalyse somit entscheidend gesenkt werden. Die Erkennungssequenzen müssen sich mindestens in 2 Basen unterscheiden, um eine Umwandlung einer Sequenz in eine andere durch Mutation zu vermeiden und eine eindeutige Zuordnung zu einer analysierten Probe zu gewährleisten. Nach der Fusionsprimer-PCR werden die LAM-PCR/nrLAM-PCR Amplikons aufgereinigt, um gezielt kurze Amplifikationsprodukte zu entfernen, die keine Abgleichung mit dem Wirtsgenom ermöglichen. Für die Zuordnung der Sequenz in dem jeweiligen Genom muss ein genomisches DNA-Fragment von mindestens 20 bp (ohne LTR- und Linkersequenz) vorliegen.

Die Analyse der durch die Pyrosequenzierung (GS FLX) generierten Daten erforderte die Entwicklung eines bioinformatischen Programms. Dies wurde in unserem Labor von Frau Anne Arens entwickelt. Das Programm sortiert zunächst die Sequenzen anhand ihrer Erkennungssequenz und entfernt die LTR- und Linkersequenzen. Um zu gewährleisten, dass nur solche Sequenzen verwendet werden, die auch tatsächlich einer Integrationsstelle entsprechen, müssen mindestens 20 bp der LTR-Sequenz vorhanden sein. Identische Sequenzen werden automatisch zusammengefasst und anschließend mittels BLAT („Blast Like Alignment Tool“) einer Position im Wirtsgenom zugeordnet. Die Analyse der Sequenzen mithilfe des bioinformatischen Programms liefert Informationen über die Sequenzlänge, die Übereinstimmung mit dem entsprechenden Genom, den Integrationslokus und die Entfernung zu dem nächstgelegenen RefSeq Gen. Weiterhin wird die Integrationsstelle hinsichtlich des

Vorhandenseins von repetitiven Elementen und CpG-Inseln untersucht. Die Kombination der in dieser Arbeit etablierten nrLAM-PCR mit der Hochdurchsatz-Pyrophosphat-Sequenzieretechnologie (GS FLX) und bioinformatischer Auswertungsprogramme ermöglichte im Vergleich zur LAM-PCR eine noch schnellere und günstigere Integrationsstellenanalyse und erlaubte die Bestimmung des gesamten klonalen Inventars polyklonaler Proben in nur einer Woche.

Die spezifische Anreicherung der Vektor-Genom Übergänge und eine anschließende Pyrosequenzierung (GS FLX) könnten in Zukunft die Integrationsstellenanalyse ohne vorhergehende PCR-basierende Amplifikation ermöglichen (Albert et al., 2007; McCormick et al., 2007; Gnirke et al., 2009). Hierfür wird die zu analysierende DNA zunächst fragmentiert, die für die nachfolgende Sequenzierung benötigten Adaptoren an beide Enden ligiert und die Fragmente anschließend auf einen Chip hybridisiert oder an spezifischen „Beads“ angereichert. Durch mehrmaliges Waschen werden unspezifische Fragmente entfernt und die angereicherten Fragmente können anschließend direkt sequenziert werden (Blow, 2009; Albert et al., 2007; McCormick et al., 2007; Gnirke et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit der PCR-basierenden Anreicherung spezifischer Sequenzen wurde von der Firma „RainDance Technologies“ entwickelt. Die Verwendung einer Kombination aus verschiedenen Oligonukleotiden ermöglicht die parallele Amplifikation von 100-1000 verschiedenen genomischen Bereichen in nur einem Reaktionsgefäß (Tewhey et al., 2009). Die für die Anreicherung spezifischer Fragmente benötigte DNA-Menge liegt allerdings zurzeit zwischen 1-5 µg, und daher können diese Methoden bislang nur bei Studien durchgeführt werden, bei denen genug Probenmaterial vorhanden ist.

Die rasche Entwicklung neuer Sequenzieretechnologien in den letzten Jahren zeichnet sich durch sinkende Kosten und drastisch steigende Sequenzierleistungen aus. Dauerte die erste Sequenzierung eines kompletten menschlichen Genoms noch mehrere Jahre und kostete Milliarden US-Dollar, wird das gleiche Projekt heute mithilfe der Pyrophosphat-Sequenzieretechnologien (GS FLX) in wenigen Wochen für nur einige Tausend Dollar durchgeführt. Die Pyrosequenzierung (GS FLX) ist für die Anwendung in verschiedensten Fragestellungen geeignet. So ist es unter anderem möglich, schnelle und effiziente Transkriptom-, Methylierungs-, epigenetische und Protein/DNA Interaktions-Analysen durchzuführen (Korbel et al., 2007; Korshunova et al., 2008; Mavrich et al., 2008; Zhao et al., 2009). Die gezielte Anreicherung und Sequenzierung von medizinisch relevanten genomischen Loci ermöglicht grundlegend neue Ansätze in der Erforschung sowohl normaler Zellfunktionen als auch

krankhafter Veränderungen bei vererbten und erworbenen Erkrankungen wie beispielsweise Krebs. Die Ergebnisse solcher Studien ermöglichen die Entwicklung neuartiger Diagnosemethoden und könnten zu einer wesentlich gezielteren Anwendung von Medikamenten und zu einer personalisierten Medizin führen (Reis-Filho, 2009; Overdevest et al., 2009; Roukos, 2010).

4.4 Klinische Gentherapie mit gammaretroviralen Vektoren

In der ersten klinischen Gentherapiestudie 1990 wurden 2 Kinder, die an ADA-SCID litten, mit einem *ADA* exprimierenden gammaretroviralen Vektor behandelt. Die Therapie war gekennzeichnet von einer niedrigen *in vivo* Genmarkierung und die Patienten mussten weiterhin einer Enzyersatztherapie mit PEG-ADA unterzogen werden (Blaese et al., 1995; Muul et al., 2003). Seitdem wurden mehr als 1500 klinische Studien durchgeführt, in denen vorwiegend Adenoviren (23,9%) und Retroviren (20,8%) Verwendung fanden (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>, Stand: Dezember 2009). Ein erster Erfolg der Gentherapie mit retroviralen Vektoren konnte 2000 bei der Behandlung von X-SCID Patienten erzielt werden (Cavazzana-Calvo et al., 2000). 2004 wurde die erfolgreiche Behandlung weiterer X-SCID Patienten in England beschrieben (Gaspar et al., 2004). Es folgten weitere Erfolge bei der Behandlung von ADA-SCID, X-CGD und WAS mit gammaretroviralen Vektoren (Aiuti et al., 2002; Gaspar et al., 2006; Aiuti et al., 2007; Ott et al., 2006; Aiuti et al., 2009; Boztug et al., in Begutachtung bei NEJM 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Klonalitätsanalysen und pharmakokinetische Untersuchungen primär an Patientenmaterial von zwei X-CGD Studien, einer ADA-SCID Studie (Gaspar et al., 2006) und einer WAS Studie (Boztug et al., in Begutachtung bei NEJM 2010) durchgeführt.

Mit der zunehmenden Effizienz des retroviralen klinischen Gentransfers traten allerdings auch vermehrt vektorinduzierte Nebenwirkungen in einzelnen Studien auf. Im Laufe der Behandlungen kam es durch die Integration des gammaretroviralen Vektors in 5 Patienten zweier ansonsten erfolgreicher X-SCID Gentherapiestudien zu einer Überexpression der Protoonkogene *LMO2* (4 Patienten) oder *CCND2* (1 Patient), die zunächst zu einer *in vivo* Selektion der betroffenen Zellklone und durch Akkumulation weiterer molekularer Veränderungen wie chromosomale Translokationen und „gain-of-function“ Mutationen zur Entstehung einer akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) führte (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008). In einer erfolgreichen X-CGD Gentherapiestudie entwickelten beide

Patienten nach Integration des Vektors in den Genlokus *MDS1-EVI1* und daraus resultierender Überexpression der Transkripte *MDS1-EVI1* und *EVI1* ein myelodysplastisches Syndrom (MDS). Auch hier waren weitere molekulare Veränderungen wie Monosomie 7 aufgetreten (Stein et al., 2010). In den ebenfalls therapeutisch wirksamen ADA-SCID und WAS Gentherapiestudien kam es hingegen zu keinen Nebenwirkungen.

In allen diesen Studien wurden gammaretrovirale Vektoren verwendet, die über vollständige und funktionsfähige regulatorische LTR Sequenzen (Promoter- und Verstärkerelemente) verfügen und das therapeutische Transgen konstitutiv exprimieren. Die Entstehung einer malignen Dysproliferation zumindest initiiert durch die Integration in oder in der Nähe der Protoonkogene *LMO2* bzw. *MDS1-EVI1* zeigt, dass die verwendeten Vektoren neben ihrem therapeutischen Potential auch ein hohes Sicherheitsrisiko darstellen können. Daher stellen umfassende Klonalitätsanalysen im präklinischen Modell und pharmakokinetische Untersuchungen gentherapeutisch behandelter Patienten einen entscheidenden Bestandteil für die Bestimmung der Sicherheit und Langzeiteffizienz in laufenden und zukünftigen Studien dar.

Die in dieser Arbeit untersuchten klinischen ADA, WAS und X-CGD Gentherapiestudien wurden ebenfalls mit einem gammaretroviralen Vektor durchgeführt, der über einen vollständigen und funktionsfähigen LTR verfügt. Daher ist eine fortlaufende umfassende und effiziente Integrationsstellenanalyse von großer Wichtigkeit, um mögliche Risiken frühzeitig erkennen und alternative Therapien, wie beispielsweise eine Knochenmarkstransplantation, einleiten zu können. Um eine umfassende Integrationsstellenanalyse zu gewährleisten, wurden den Patienten regelmäßig Zellen entnommen, die uns für unsere pharmakokinetischen Untersuchungen und zur Ermittlung der klonalen hämatopoetischen Repopulation zur Verfügung standen.

4.5 Klonale *in vivo* Selektion in der klinischen retroviralen Gentherapie

In präklinischen und klinischen Gentherapiestudien wurden bereits vektorinduzierte Nebenwirkungen resultierend in *in vivo* Selektionen einzelner Integrationsklone bis hin zur Leukämiebildung beobachtet (Li et al., 2002; Du et al., 2005; Modlich et al., 2005; Calmels et al., 2005; Seggewiss et al., 2006; Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008; Stein et al., 2010). Die selektionierten Zellklone wiesen Integrationsstellen in oder in der Nähe von Genen auf, dessen Expression einen wachstums- und proliferationsfördernden Vorteil für die Zelle

erbrachte. Die Nebenwirkungen in der klinischen Gentherapie traten beispielsweise durch Integrationen des gammaretroviralen Vektors in den Protoonkogenen *MDS1*, *EVI1*, *LMO2* und *CCND2* auf (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008; Stein et al., 2010). Um die Entstehung einer klonalen *in vivo* Selektion und einer (prä)malignen Entwicklung frühzeitig erkennen zu können, wurden das klonale Inventar der Patientenproben zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und der Beitrag einzelner Integrationsklone untersucht.

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten klinischen Proben zeigte sich das typische Integrationsstellenprofil gammaretroviraler Vektoren. 70% aller Integrationsstellen konnten in genkodierenden Bereichen oder in einer Umgebung von 10 kb detektiert werden und es zeigte sich eine Anhäufung der Integrationen in der Nähe der TSS (**Abbildung 7.12 und Abbildung 7.13**).

4.5.1 *In vivo* Expansion genkorrigierter Zellen in drei X-CGD Gentherapiestudien

In einer deutschen X-CGD Gentherapiestudie wurden 2 adulte Patienten mit einem gammaretroviralen Vektor, der das Transgen *gp91phox* exprimiert, behandelt. Die Gentherapie zeigte sich als äußerst wirksam, bestehende Infektionsherde wurden eliminiert und zumindest ein Patient konnte auf eine zusätzliche Gabe von Antibiotika und Antimykotika verzichten. 3-5 Monate nach Behandlung kam es in beiden Patienten zu einer *in vivo* Expansion der korrigierten myelopoetischen Zellen von 15%-20% auf 50%-60%. Maßgeblich initiiert und getragen wurde dieser Anstieg von Klonen mit Integrationen in oder in der Nähe der Protoonkogene *MDS1*, *EVI1*, *PRDM16* und *SETBP1* (Ott et al., 2006). Dabei zeigte sich über die Zeit, dass der quantitative Beitrag einzelner *MDS1*-Integrationsklone zunahm. Schließlich dominierte (> 60%-80% des genkorrigierten Zellpools) in beiden Patienten jeweils ein *MDS1*-Klon 26 Monate (Patient 1) und 33 Monate (Patient 2) nach Behandlung. Beide Patienten entwickelten 2-2½ Jahre nach Transplantation ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) und Patient 1 verstarb 27 Monate nach Gentherapie (Ott et al. 2006; Stein et al., 2010).

Mit der *in vivo* Expansion der *MDS1*-Klone und der Diagnose eines MDS in der deutschen X-CGD Gentherapiestudie konnte gleichzeitig eine Monosomie 7 in den Zellen detektiert werden, die die dominanten *MDS1*-Integrationen enthielten. Weitere Analysen lassen vermuten, dass der Verlust des Chromosoms 7 hervorgerufen wurde durch eine Expression des *EVI1*-Transkriptes. Die beiden Genloki *MDS1* und *EVI1* liegen sehr nah beieinander und somit existieren die

Transkripte *MDS1*, *EVI1* und das Fusionstranskript *MDS1-EVI1*. Expressionsanalysen konnten zeigen, dass die Expression von *EVI1* in den dominanten Klonen 100-fach stärker war verglichen mit der Expression des Fusionstranskriptes (Stein et al., 2010). Verschiedenste Untersuchungen weisen daraufhin, dass *EVI1* mit Proteinen interagiert, die an der Regulation der Chromatin-Remodellierung beteiligt sind (Chi et al., 2003; Cattaneo et al., 2008; Spensberger et al., 2008a; Spensberger et al., 2008b; Kondo et al., 2008). Daher ist es durchaus möglich, dass die Expression von *EVI1* die Zentrosom-Replikation, den Chromatin-Aufbau und die genomische Stabilität beeinflusst und somit zu einer Monosomie 7 führen kann (Stein et al., 2010).

In der in dieser Arbeit untersuchten schweizer X-CGD Gentherapiestudie wurden das gleiche klinische Protokoll und derselbe Vektor wie in der deutschen Gentherapiestudie verwendet. Der Anteil genkorrigierter Granulozyten lag bei Patient 1 zu Beginn der Gentherapie bei ~ 5%, sank allerdings nach kurzer Zeit auf 0,1%. Bis ~ 25 Monate nach Gentherapie blieb der Anteil der genkorrigierten Granulozyten bei 0,1%. Trotz der geringen Genmarkierung konnte ein Erfolg der Gentherapie beobachtet werden. 25 Monate nach Gentherapie stieg die Genmarkierung auf \geq 5% an. Gleichzeitig konnte vergleichbar zu der deutschen Gentherapiestudie ein Anstieg des Beitrags eines *MDS1*-Klons von 4% auf 23% beobachtet werden (**Abbildung 3.16**). Dieser *MDS1*-Klon wurde erstmals 10 Monate nach Gentherapie detektiert (**Abbildung 3.16**). Ab Monat 23 nach Gentherapie wurde ein kontinuierlicher Anstieg des Beitrags beobachtet und 45 Monate nach Gentherapie dominiert er die Hämatopoese mit einem Beitrag von $>$ 80% (**Abbildung 3.16**).

Bei Patient 2 der schweizer Gentherapiestudie trugen zu Beginn der Gentherapie ~ 15% der Granulozyten den Vektor. 3 Monate nach Gentherapie kam es ebenfalls zu einem Anstieg genmarkierter Zellen von ~ 15% auf 90%. Auch hier konnten zeitgleich zwei *MDS1*-Klone die eine weitere Integration in *CAMTA1* bzw. *STAT3* tragen, mit einem Beitrag von 2%-3% unter den 10 stärksten Klonen detektiert werden (**Abbildung 3.19**). Der Beitrag dieser Klone stieg kontinuierlich an und betrug 18 Monate nach Gentherapie 17%-22%. Damit stellten die beiden *MDS1*-Klone 18 Monate nach Gentherapie die stärksten Klone dar (**Abbildung 3.19**).

In weiteren Analysen konnte gezeigt werden, dass in einem der starken *MDS1*-Klone eine Deletion der kompletten regulatorischen U3-Region im 5'-LTR vorlag. Die Durchführung einer 5'-LAM-PCR bei Patient 2 erlaubte zwar die Detektion der *CAMTA1*-Integration, nicht aber der zweiten Integration in dem *MDS1*-Lokus. Nur mithilfe der Durchführung einer 3'-LAM-PCR

konnte diese *MDS1*-Integration detektiert werden. Die Durchführung einer PCR mit Primern, die innerhalb des Vektors und nicht im LTR liegen (**Abbildung 3.21**) und die anschließende Sequenzierung der amplifizierten Fragmente, zeigte, dass im 5'-LTR eine Deletion von ~ 400 bp vorlag. Die komplette U3-Region, in der die Primer der LAM-PCR binden sollten, war deletiert und daher war eine Detektion des *MDS1*-Integrates über eine 5'-LAM-PCR nicht möglich.

Die Analyse der Proben der schweizer X-CGD Gentherapiestudie zeigte starke Ähnlichkeiten zu der deutschen Gentherapiestudie. In beiden Studien konnte ein Anstieg der genmarkierten Granulozyten und eine *in vivo* Expansion ein oder mehrerer *MDS1*-Klone beobachtet werden. Vergleichbar mit der deutschen Gentherapiestudie wurde in beiden Patienten an den letzten analysierten Zeitpunkten die Hämatopoese von einem bzw. zwei *MDS1*-Klonen dominiert. Bisher kam es bei den Patienten der schweizer Studie zu keinen Anzeichen eines MDS.

Die Integrationsstellenanalysen der Patientenproben einer koreanischen X-CGD Gentherapiestudie, in der 2 Patienten mit einem MLV-basierenden Vektor behandelt wurden, erlaubte die Detektion einer klonalen *in vivo* Expansion in Patient 2. Hierbei handelte es sich ebenfalls um einen *MDS1*-Klon, der erstmals 4 Monate nach Gentherapie mit einem Beitrag von 0,35% detektiert werden konnte. Auch hier wurde eine kontinuierliche Zunahme des Klons auf ~ 40% 1 Jahr nach Gentherapie beobachtet (**Abbildung 3.23**). Anders als bei der deutschen und der schweizer Gentherapiestudie sank der Anteil an genkorrigierten Zellen innerhalb eines Jahres bei beiden Patienten von 6%-15% auf 0,1%-2%.

Die Tatsache, dass in den in dieser Arbeit beschriebenen X-CGD Gentherapiestudien ebenfalls dominante *MDS1*-Klone in 3 der 4 behandelten Patienten beobachtet werden konnten, erfordert zwingend die weitere Analyse der Patientenproben hinsichtlich der Expression von *MDS1-EVII* und Monosomie 7. Für Patient 2 der schweizer Gentherapiestudie konnte bereits im Rahmen dieser Arbeit eine Analyse der Expression von *MDS1-EVII* und *EVII* durchgeführt werden. Auch hier wurde eine Überexpression vorwiegend des kurzen *EVII*-Transkriptes nachgewiesen (**Abbildung 3.30**). Die in der Schweiz durchgeführten Analysen der Proben zeigten bisher in beiden Patienten keine Anzeichen einer Monosomie 7. Die Überexpression von *EVII* in Patient 2 scheint bisher zu keinen chromosomalen Veränderungen geführt zu haben. Allerdings wurden aufgrund der eindeutigen Parallelen zwischen den Studien und der schwerwiegenden Nebenwirkungen, die in der deutschen Gentherapiestudie auftraten, für beide Patienten der schweizer Gentherapiestudie geeignete Spender für eine Knochenmarkstransplantation gesucht

und Patient 2 konnte bereits erfolgreich transplantiert werden (persönliche Kommunikation mit Herrn Prof. Dr. Seger).

Stark diskutiert wurde auch, ob das therapeutische Transgen *gp91phox* eine Rolle bei der Entstehung des MDS spielt. In X-CGD ist die Expression von *gp91phox* für das Überleben der Zellen nicht zwingend notwendig und anders als bei X-SCID erlangen die transduzierten myeloiden Zellen durch *gp91phox*-Expression keinen proliferativen Vorteil (Stein et al., 2010). Die Beobachtung, dass Zellen, die *gp91phox* oder eine katalytisch inaktive Form exprimieren, keine verstärkte Zentrosomamplifikation zeigten, wie es bei den *MDS1-EVI1* und *EVI1* exprimierenden Zellen detektiert wurde, ist ein Indiz dafür, dass das Transgen keinen Einfluss auf die genomische Stabilität und auf die Entstehung der Leukämie ausübte (Stein et al., 2010). Weiterhin sank die Expression des Transgens in beiden Patienten der deutschen Gentherapiestudie 9 bis 15 Monate nach Gentherapie. Genauere Analysen ergaben, dass es zu einer Methylierung der Promoterregion im LTR des verwendeten Vektors kam, die Verstärkerelemente allerdings nicht methyliert wurden und diese daher weiterhin die Überexpression von *MDS1-EVI1* steuern konnten.

In der schweizer Gentherapiestudie konnten bisher in beiden Patienten keine Methylierungen und eine damit verbundene Reduktion der *gp91phox*-Expression detektiert werden. In der koreanischen X-CGD Gentherapiestudie kam es im Laufe eines Jahre nach Gentherapie zu einer Abnahme an *gp91phox*-exprimierenden Zellen. Ob diese Abnahme durch eine Methylierung des Promoters ausgelöst wurde, wurde bisher nicht geklärt.

Die Tatsache, dass für die koreanische X-CGD Gentherapiestudie ein anderes klinisches Protokoll und ein anderer Vektor verwendet wurde, führt zu dem Schluss, dass die Entstehung der *in vivo* Expansion einzelner *MDS1*-Klone nicht nur auf den verwendeten Vektor und das klinische Protokoll zurückgeführt werden kann. Die eindeutigen Parallelen, die im Laufe dieser Arbeit zwischen den X-CGD Gentherapiestudien detektiert wurden, zeigen auf, wie wichtig die umfassende und regelmäßige Analyse der Integrationsstellen ist, um frühzeitig der Entstehung schwerwiegender Nebenwirkungen entgegen wirken zu können. Auch nach der Knochenmarkstransplantation der schweizer Patienten muss die Entwicklung des klonalen Inventars genkorrigierter Zellen weiterhin beobachtet werden.

4.5.2 ADA-SCID – Das klonale Inventar nach Behandlung einer lymphoiden Erkrankung

In der erfolgreichen ADA-SCID Gentherapiestudie wurden ebenfalls mehrere Integrationen in Protoonkogen-Genloki detektiert, allerdings zeigte keiner der Klone kontinuierlich einen starken Beitrag zur Hämatopoese. Der stärkste Beitrag lag bei 6% für einen *MDS1*-Klon in Patient 3 9 Monate nach Gentherapie (**Abbildung 3.32**). Stärkere Klone konnten in Patient 1 und 3 mit einem Beitrag von 28%-43% zwar detektiert werden, allerdings liegen die Integrationen in Genloki, die bisher nicht an der Entstehung dominanter Integrationsklone beteiligt waren und von denen bisher keine Rolle bei der Krebsentstehung bekannt ist (**Abbildung 3.32**). Eine Integration in dem Gen *CD109* in Patient 1 konnte erstmals 54 Monate nach Gentherapie mit einem Beitrag von 30% detektiert werden. Auch am zuletzt analysierten Zeitpunkt, 58 Monate nach Gentherapie, blieb der Beitrag dieses Integrationsklons bei 30%. Ein weiterer Klon, der eine Integration stromaufwärts des Gens *SNRP70* trägt, trat erstmals 44 Monate nach Gentherapie mit einem Beitrag von 0,2%-1% auf. 58 Monaten nach Gentherapie konnte ein Anstieg des Beitrags auf 30% detektiert werden. Bei Patient 3 wurde neben dem *MDS1*-Klon mit einem Beitrag von 6%, eine Integration in dem Gen *KCNJ15* detektiert, die 9 Monate nach Gentherapie einen Beitrag von 40% zur Hämatopoese leistete (**Abbildung 3.32**).

Obwohl die beiden Gene *MDS1* und *EVI1* auch in dieser Studie die am häufigsten getroffenen Genloki darstellen (**Abbildung 3.33**) kam es bisher zu keiner *in vivo* Selektion dieser Integrationsklone, wie es bei den X-CGD Gentherapiestudien beobachtet werden konnte.

4.5.3 WAS – Das klonale Inventar nach Behandlung einer Erkrankung des myeloiden und lymphoiden Systems

In der erfolgreichen deutschen WAS-Gentherapiestudie konnte bis zum letzten analysierten Zeitpunkt eine starke polyklonale hämatopoetische Repopulation in allen bisher behandelten Patienten beobachtet werden (**Abbildung 3.34 und Abbildung 3.35**). Allerdings stieg auch hier der Beitrag eines *CCND2*-Klons bei Patient 1 und eines *MDS1*-Klons bei Patient 2 im Laufe der Integrationsstellenanalyse an. Die Analysen der Sequenzierdaten für Patient 1 wiesen daraufhin, dass der Beitrag des starken *CCND2*-Klons 23 Monate nach Gentherapie mit 12% einen Höhepunkt erreicht und an den darauffolgenden Zeitpunkten wieder abfällt (0,5%-2%) (**Abbildung 3.36**). Der spezifische Nachweis dieses Integrationsklons mit der sehr sensitiven „Realtime“-PCR zeigte ebenfalls einen Anstieg des Beitrages zur Hämatopoese von 0,4% auf 7%,

allerdings konnte hier ab Tag 705 kein Rückgang sondern ein weiterer Anstieg auf 10%-11% 29 Monate nach Gentherapie beobachtet werden (**Abbildung 3.37**). Die Pyrosequenzierung (GS FLX) der Integrationsstellen kann erste Hinweise auf die Entstehung dominanter Klone und deren Beitrag zur hämatopoetischen Repopulation geben und kann dabei helfen *in vivo* Selektionen frühzeitig zu erkennen. Um den genauen Beitrag einzelner Integrationsklone zu bestimmen, können durch die Sequenzierung detektierte dominante Klone nochmals quantitativ mittels der „Realtime“-PCR analysiert werden.

Der in Patient 2 detektierte *MDS1*-Integrationsklon stellte 29 Monate nach Gentherapie mit 4,4% den stärksten Klon dar (**Abbildung 3.38**). Der Klon konnte erstmals 8 Monate nach Gentherapie mit einem Beitrag von 0,1% detektiert werden. Bis 16 Monate nach Gentherapie blieb der Beitrag zwischen 0,3% und 0,7%. Erst ab 23 Monate nach Gentherapie kam es zu einem Anstieg auf 2%-4%.

Auch in dieser Studie konnten die meisten Integrationsstellen in den beiden Genloki *MDS1* und *EVI1* detektiert werden. Weitere häufig getroffene bekannte Integrationsloki waren *PRDM16*, *CCND2* und *LMO2* (**Abbildung 3.39**). Trotz der vielen Integrationsstellen in bereits bekannten Protoonkogenen konnte keine Entstehung dominanter Klone beobachtet werden. Die hämatopoetische Repopulation wurde bis zum letzten analysierten Zeitpunkt von > 1000 Integrationsstellen gebildet und der Beitrag einzelner Klone lag bei 0%-15%.

4.5.4 Vergleich der *MDS1-EVI1*- Integrationen in allen analysierten klinischen Gentherapiestudien

Der Vergleich, der in der deutschen X-CGD Gentherapiestudie detektierten Integrationen in *MDS1* (Ott et al., 2006) mit den Integrationen, die im Rahmen dieser Arbeit in der schweizer und koreanischen X-CGD Gentherapiestudie nachgewiesen werden konnten, zeigte eine deutliche Anhäufung in Intron 2 des Protoonkogens (**Abbildung 3.26** und **Abbildung 3.27**). Ebenfalls konnte eine Anhäufung aller Integrationsstellen stromaufwärts und in Intron 1 und 2 des Protoonkogens *EVI1* in allen Studien entdeckt werden (**Abbildung 3.28** und **Abbildung 3.29**). Auch in der ADA-SCID und WAS Gentherapiestudie konnten bis zu 94 Integrationsstellen in den *MDS1-EVI1* Genloki detektiert werden (**Abbildung 3.33** und **Abbildung 3.39**), die ebenfalls in den bei den X-CGD Gentherapie Studien beobachteten bevorzugten Bereichen liegen. In allen in dieser Arbeit untersuchten klinischen Gentherapiestudien, außer in der

schweizer X-CGD Studie, wurden verschiedene klinische Protokolle und verschiedene Vektoren verwendet. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das klinische Protokoll und die Verwendung des Vektors nicht alleine für die Entstehung solcher bevorzugter Integrationsorte verantwortlich sein können.

4.5.5 Integrationsstellen im lymphoiden und myeloiden hämatopoetischen System

Die berichteten Nebenwirkungen in der X-SCID-Gentherapie wurden unter anderem durch Integrationen in den Protoonkogenen *LMO2* und *CCND2* hervorgerufen (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008). Die Entstehung des MDS in der deutschen X-CGD Gentherapiestudie wurde durch Integrationen in *MDS1* ausgelöst (Stein et al., 2010). Bei X-SCID handelt es sich um eine Erkrankung des lymphoiden Systems, wohingegen in X-CGD Patienten die myeloiden Zellen betroffen sind. Dies könnte die Vermutung aufkommen lassen, dass *LMO2* und *CCND2* die Proliferation und Differenzierung lymphoider, *MDS1* dagegen die Entwicklung myeloider Zellen beeinflusst. Die Analyse der X-CGD Patientenproben aus der deutschen Gentherapiestudie und auch frühere Untersuchungen weisen daraufhin, dass *EVI1* das Wachstum myeloider Zellen fördert, auf das lymphoide Kompartiment allerdings keinen Einfluss hat (Goyama et al., 2008; Stein et al., 2010). Das Wiskott-Aldrich Syndrom beeinflusst sowohl das lymphoide als auch das myeloide hämatopoetische System. In der erfolgreichen WAS Gentherapiestudie konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl Integrationen in *MDS1* und *EVI1*, als auch in *LMO2* und *CCND2* detektiert werden (**Abbildung 3.39**). Bei der Analyse CD3⁺-Zellen und myeloider Granulozyten wurden die Integrationen in oder in der Nähe von *MDS1* und *EVI1* vorwiegend in myeloiden Zellen, *LMO2*- und *CCND2*-Integrationen dagegen verstärkt in Zellen des lymphoiden Systems gefunden (**Abbildung 3.40**). Dies liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass Integrationen in *MDS1* und *EVI1* einen Wachstumsvorteil im myeloiden System, Integrationen in *CCND2* und *LMO2* dagegen einen Wachstumsvorteil in lymphoiden Zellen hervorrufen.

Auffällig ist weiterhin, dass in der ADA-SCID Gentherapiestudie die beiden Genloki *MDS1* und *EVI1* wie auch in den anderen analysierten Studien den stärksten CIS Lokus darstellen (**Abbildung 3.33**). Dies konnte allerdings in einer weiteren erfolgreichen ADA-SCID Gentherapiestudie, die in Italien unter Verwendung eines Vektors der einen MLV-Promoter im LTR trägt, durchgeführt wurde, bisher nicht beobachtet werden (Aiuti et al., 2002; Aiuti et al., 2007; Aiuti et al., 2009). Da es sich bei ADA-SCID um eine lymphoide Erkrankung handelt,

würde man als bevorzugte Integrationsorte die Protoonkogene *LMO2* und *CCND2* erwarten, die in der klinischen Gentherapie von X-SCID zu Komplikationen führten (Hacein-Bey-Abina et al., 2008, Howe et al., 2008). In der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse konnten zwar auch Integrationen in *LMO2* und *CCND2* gefunden werden, allerdings zeigten die beiden Genloki *MDS1* und *EVI1* eine größere Präsenz (**Abbildung 3.33**). Anders als bei den X-SCID Patienten zeigten die Integrationen in diesen Genloki bisher einen sehr niedrigen Beitrag und unterstützen daher die Vermutung, dass die Protoonkogene *MDS1* und *EVI1* keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Lymphopoese haben (Goyama et al., 2008; Stein et al., 2010).

In allen im Rahmen dieser Arbeit analysierten gammaretroviral transduzierten Proben konnte das gleiche Integrationsstellenprofil beobachtet werden und auch gemeinsame bevorzugte Integrationsorte konnte detektiert werden. Dies weist auf ein für gammaretrovirale Vektoren spezifisches, nicht allein vom Transgen und vom Promoter abhängiges Integrationsstellenverhalten hin, das von großer Bedeutung ist bei der Herstellung und Optimierung neuer Vektoren für die klinische Gentherapie.

4.6 Verwendung gammaretroviraler Integrationsloki zur pharmakokinetischen Markierung

In einer komparativen präklinischen und klinischen Integrationsstellenanalyse konnten beeindruckende Übereinstimmungen im Integrationsprofil der verwendeten Vektoren beobachtet werden (Deichmann et al., eingereicht bei Blood 2010). Unsere Daten zeigten eine starke Anhäufung der Integrationsstellen in oder in der Nähe von genkodierenden Bereichen, bevorzugt in der Nähe der TSS (**Tabelle 3.4**).

Bevorzugte Integrationsorte („Common Integration Sites“, CIS) stellen ein Indiz für die nicht zufällige Verteilung der Integrationsstellen dar. 40% aller Integrationsstellen waren in CIS lokalisiert, dieser Wert ist signifikant höher als die statistisch erwartete Anzahl an Integrationsstellen in CIS. In Prätransplantationsproben konnten nur CIS 2.Ordnung gefunden werden, wohingegen nach der Transplantation weitaus mehr und höhere CIS auftraten, was auf eine verstärkte *in vivo* Selektion bestimmter Zellklone nach der Transplantation hinweist. Daher kann die Formation von CIS insbesondere höherer Ordnung (CIS bestehend aus > 4 verschiedenen Integrationsstellen innerhalb 100 kb) einen Indikator für eine klonale *in vivo* Selektion darstellen (de Ridder et al., 2006, Wu et al., 2006). Die Analyse der CIS zeigte eine

starke Übereinstimmung zwischen den Studien. So konnten die CIS höchster Ordnung in den bereits bekannten Protoonkogenen *MDS1*, *EVI1*, *PRDM16*, *SETBP1*, *LMO2* und *CCND2* detektiert werden (**Tabelle 3.3**). Alle diese Protoonkogene spielten eine Rolle bei der Entstehung vektorinduzierter schwerer Nebenwirkungen in der klinischen Gentherapie (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008; Stein et al., 2010).

Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Anhäufung von Integrationsstellen in bestimmten Genloki in Zusammenhang mit dem klinischen Protokoll, mit dem verwendeten Vektorsystem oder aber mit dem Transgen steht (Ott et al., 2006; Woods et al., 2006; Deichmann et al., 2007; Schwarzwaelder et al., 2007). Es ist immer noch stark umstritten, ob das therapeutische Transgen *IL2RG*, ein zentraler Rezeptor für verschiedene Interleukine, selbst zu Nebenwirkungen führen kann (Pike-Overzet et al., 2006; Thrasher et al., 2006; Woods et al., 2006; Modlich et al., 2008). Die vergleichende Studie zeigte, dass gemeinsame bevorzugte Integrationsorte in den analysierten Studien auftreten, in denen allerdings verschiedene Protokolle und verschiedene Vektoren verwendet wurden. Dies spricht dafür, dass das Auftreten von *in vivo* Selektionen nicht allein auf eine bestimmte Versuchssituation zurückgeführt werden kann.

4.7 Optimierung der Vektorsicherheit für zukünftige Gentherapiestudien

Um das Risiko vektorinduzierter Nebenwirkungen zu verringern und die Effizienz der Gentherapie zu steigern, ist es von großer Wichtigkeit die für die Gentherapie zur Verfügung stehenden Vektoren zu verbessern und neue Gentransfervehikel in *in vitro* und *in vivo* Studien auf ihre Sicherheit zu prüfen. Alle bisher in der klinischen Gentherapie verwendeten gammaretroviralen Vektoren weisen zwei intakte LTR-Bereiche (5'-LTR und 3'-LTR) auf, die sowohl Promoter- als auch Verstärkerelemente enthalten. Die Verstärkerelemente bringen allerdings die Gefahr mit sich, dass sie die Expression umliegender Gene beeinflussen. So konnte in einigen klinischen Gentherapiestudien eine vektorinduzierte Überexpression des betroffenen Gens beobachtet werden (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008; Stein et al., 2010). Die Entwicklung sogenannter SIN-Vektoren könnte den Einfluss des Vektors auf das umliegende Genom einschränken. In diesen Vektoren ist die U3-Region des LTR, die die Promoter- und Verstärkerelemente enthält, deletiert und die Expression des Transgens wird von einem internen Promoter reguliert (Kraunus et al., 2004). Klinische Gentherapiestudien, die SIN-

Vektoren als Gentransfervehikel verwenden, sind bereits für die Immundefizienzen X-SCID und WAS in Planung (Thornhill et al., 2008; Galy et al., 2008).

Um das Risiko einer vektorinduzierten Überexpression weiter minimieren zu können, besteht die Möglichkeit zusätzlich sogenannte Insulator-Sequenzen in den LTR einzufügen. Diese Insulator-Sequenzen fungieren als Blockade, die zum einen den Einfluss der Verstärkerelemente auf das umliegende Genom und zum anderen den Einfluss der in der Nähe der Integration befindlichen Regulatorelemente auf die Transgen-Aktivität vermindern (West et al., 2002). Allerdings ist bei diesen Insulator-Elementen momentan noch sehr umstritten, ob sie die Expression des von der Integration betroffenen Gens blockieren, indem kein funktionsfähiges Transkript gebildet werden kann.

Integrase-defiziente Vektoren, die es ermöglichen alle mit der Integration verbundenen Probleme zu umgehen, können nur in postmitotischem Gewebe verwendet werden, da durch Teilung der Zellen der episomal vorliegende Vektor verloren gehen würde. In einem Maus- und Rattenmodell konnte die erfolgreiche Anwendung dieser nicht-integrierenden Vektoren bereits gezeigt werden (Yanez-Munoz et al., 2006).

Die Hoffnung der Reduzierung vektorinduzierter Nebenwirkungen liegt momentan in der Verwendung von SIN lentiviralen Vektoren. Lentivirale Vektoren können im Gegensatz zu gammaretroviralen Vektoren auch sich nicht teilende Zellen infizieren und sie zeigen bei der Integration eine uniforme Verteilung über das komplette Gen und weisen somit keine Präferenz für die TSS auf. Hargrove et al. konnte allerdings in einer *in vivo* Studie zeigen, dass auch die Integration von SIN lentiviralen Vektoren zu einer Veränderung der Genexpression in einem Radius von 600 kb um die Integrationsstelle herum führen kann (Hargrove et al., 2008).

Von der ersten erfolgreichen klinischen Gentherapiestudie unter Verwendung eines HIV-abgeleiteten SIN lentiviralen Vektors konnte vor kurzem berichtet werden (Cartier-Lacave et al., 2009). Die Patienten, die an X-ALD litten, wurden 2006 mit einem lentiviralen Vektor, der über einen internen Promoter das ALD Transgen exprimiert, therapiert. Die Therapie führte zu einer Korrektur der Erkrankung und bisher sind keine mit der Integration des Vektors verbundenen Nebenwirkungen aufgetreten.

Die gezielte Integration in sichere genomische Bereiche stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Nebenwirkungen des Gentransfers einzuschränken. ZFN und Transposons wie „Sleeping Beauty“ in Kombination mit integrase-defizienten Vektoren stellen hierbei vielversprechende Transfervehikel dar. ZFN können durch homologe Rekombination an spezifischen Stellen im Genom die Integration von integrase-defizienten Vektoren bewirken (Ivics et al., 2007; Cathomen und Joung, 2008; Vink et al., 2009). Sowohl für ZFN als auch für die Verwendung von Transposons muss zunächst die Spezifität und die Effizienz demonstriert werden, bevor dieses eine Anwendung in der klinischen Gentherapie finden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G., Segal, A. W. (1991). "Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1". *Nature* **353**: 668-670.
- Ahmed, F., Ings, S. J., Pizzey, A. R., Blundell, M. P., Thrasher, A. J., Ye, H. T., Fahey, A., Linch, D. C., Yong, K. L. (2004). "Impaired bone marrow homing of cytokine-activated CD34+ cells in the NOD/SCID model." *Blood* **103**: 2079-2087.
- Albert, T. J., Molla, M. N., Muzny, D. M., Nazareth, L., Wheeler, D., Song, X., Richmond, T. A., Middle, C. M., Rodesch, M. J., Packard, C. J. et al. (2007). "Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization." *Nat Methods* **4**(11): 903-905.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage, WILEY-VCH Verlag, Weinheim.
- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., et al. (2002). "Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning." *Science* **296**: 2410-2413.
- Aiuti, A., B. Cassani, G. Andolfi, M. Mirolo, L. Biasco, A. Recchia, F. Urbinati, C. Valacca, S. Scaramuzza, M. Aker, et al. (2007). "Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy." *J Clin Invest* **117**(8): 2233-40.
- Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., Scaramuzza, S., Andolfi, G., Mirolo, M., Brigida, I., et al. (2009). "Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency." *N Engl J Med* **360**(5):447-58.
- Anderson, W. F. (1984). "Prospects for human gene therapy." *Science* **226**(4673): 401-9.
- Antoine, C., Muller, S., Cant, A., Cavazzana-Calvo, M., Veys, P., Vossen, J., Fasth, A., Heilmann, C., Wulffraat, N., Seger, R., et al. (2003). "Long-term survival and transplantation of haematopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience" 1968-99. *Lancet* **361**:553-560.
- Apasov, S. G., Blackburn, M. R., Kellems, R. E., Smith, P. T., Sitkovsky, M. V. (2001). "Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling." *J Clin Invest* **108**: 131-141.
- Badour, K., Zhang, J., Shi, F., McGavin, M. K., Rampersad, V., Hardy, L. A., Field, D., Siminovitch, K. A. (2003). "The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse." *Immunity* **18**(1): 141-154.
- Badour, K., McGavin, M. K., Zhang, J., Freeman, S., Vieira, C., Filipp, D., Julius, M., Mills, G. B., Siminovitch, K. A. (2007). "Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(5):1593-1598.
- Baltimore, D. (1970). "Viral RNA-dependent DNA polymerase." *Nature* **226**: 1209-1211.
- Baum, C., Forster, P., Hegewisch-Becker, S., Harbers, K. (1994). „An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines." *BioTechniques* **17**: 1058-1062.
- Baum, C., von Kalle, C., Staal, F. J., Li, Z., Fehse, B., Schmidt, M., Weerkamp, F., Karlsson, S., Wagemaker, G., Williams, D. A. (2004). "Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences." *Mol Ther* **9**: 5-13.
- Benveniste, P., Zhu, W., Cohen, A. (1995). „Interference with thymocyte differentiation by an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase." *J Immunol* **155**: 536-544.
- Bertrand, Y., Landais, P., Friedrich, W., Gerritsen, B., Morgan, G., Fasth, A., Cavazzana-Calvo, M., Porta, F., Cant, A., Espanol, T., et al. (1999). "Influence of Severe Combined Immunodeficiency phenotype on the outcome of HLA non-identical, T-cell-depleted bone marrow transplantation: a retrospective European survey from the European group for bone marrow transplantation and the European society for immunodeficiency." *J Pediatr* **134**: 740-748.
- Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D., Dick, J. E. (1997). „Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5320-5325.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., et al. (1995). "T lymphocyte directed gene therapy for ADA-

- SCID: initial trial results after 4 years." *Science* **270**: 475-480.
- Bloquel, C., Fabre, E., Bureau, M. F., Scherman, D. (2004). "Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications." *J Gene Med* **6** (Suppl 1): 11-23.
- Blow, N. (2009). "Microfluidics: the great divide." *Nat Methods* **6**: 683-686, doi: 10.1038/nmeth0909-683.
- Blundell, M. P., Demaison, C., Brouns, G., Goldman, J. P., Gaspar, H. B., Kinnon, C., Thrasher, A. J., Lazzari, L., Sirchia, G. (1999). "Quality of repopulation in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice engrafted with expanded cord blood CD34+ cells." *Blood* **94**: 3269-3270.
- Bonnet, D., Dick, J. E. (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* **3**(7): 730-737.
- Bosticardo, M., Marangoni, F., Aiuti, A., Villa, A. and Roncarolo, M. G. (2009). "Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome." *Blood* **113**: 6288-6295.
- Bovee, D., Zhou, Y., Haugen, E., Wu, Z., Hayden, H. S., Gillett, W., Tuzun, E., Cooper, G. M., Sampas, N., Phelps, K., et al. (2008). "Closing gaps in the human genome with fosmid resources generated from multiple individuals." *Nat Genet* **40**(1): 96-101.
- Boztug, K., Dewey, R. A., Klein, C. (2006). "Development of hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome." *Curr Opin Mol Ther* **8**(5):390-395.
- Boztug, K., Schmidt, M., Schwarzer, A., Banerjee, P. P., Díez, I. A., Dewey, R., Böhm, M., Ball, C., Nowrouzi, A., Naundorf, S., et al. (2010). "Correction of Wiskott-Aldrich Syndrome by Hematopoietic Cell Gene Transfer." *NEJM* Manuscript in revision.
- Brown, B. D., Venneri, M. A., Zingale, A., Sergi Sergi, L., Naldini, L. (2006). "Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer." *Nat Med* **12**(5): 585-91.
- Buckley, R. H., Schiff, S. E., Schiff, R. I., Markert, L., Williams, L. W., Roberts, J. L., Myers, L. A., Ward, F. E. (1999). "Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of Severe Combined Immunodeficiency." *N Engl J Med* **340**: 508-516.
- Bunnell, B. A., Morgan, R. A. (1998). "Gene therapy for infectious diseases." *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 42-56.
- Butler, S. L., Johnson, E.P. and Bushman, F. D. (2002). "Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-Long Terminal Repeat circles." *J Virol* **76**(8): 3739-47.
- Calmels, B., Ferguson, C., Laukkanen, M. O., Adler, R., Faulhaber, M., Kim, H. J., Sellers, S., Hematti, P., Schmidt, M., von Kalle, C., et al. (2005). "Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells." *Blood* **106**(7): 2530-2533.
- Capecchi, M. R. (1980). "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells." *Cell* **22**: 479-488.
- Cartier-Lacave, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Malhaoui, N., et al. (2009). "Hematopoietic stem cell gene therapy with lentiviral vector in X-adrenoleukodystrophy." *Science* **326**: 818-823.
- Case, S. S., Price, M. A., Jordan, C. T., Yu, X. J., Wang, L., Bauer, G., Haas, D. L., Xu, D., Stripecke, R., Naldini, L., et al. (1999). "Stable transduction of quiescent CD34(+)/CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors." *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2988-2993.
- Cathomen, T., and Joung, J. K. (2008). "Zinc-finger nucleases: the next generation emerges." *Mol Ther* **16**(7): 1200-1207.
- Cattaneo, F., Nucifora, G. (2008). "EVI1 recruits the histone methyltransferase SUV39H1 for transcription repression." *J Cell Biochem* **105**(2): 344-352.
- Cattoglio, C., Facchini, G., Sartori, D., Antonelli, A., Miccio, A., Cassani, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Howe, S., Thrasher, A. J., et al. (2007). "Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells." *Blood* **110**(6): 1770-1778.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, et al. (2000). "Gene therapy of human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 disease." *Science* **288**:669-672.
- Cavazzana-Calvo, M., Thrasher, A., Mavilio, F. (2004). "The future of gene therapy." *Nature* **427**:779-781.
- Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A. (2007). "Gene therapy for Severe Combined Immunodeficiency: are we there yet?" *J Clin Invest* **117**: 1456-1465.
- Chi, Y., Senyuk, V., Chakraborty, S., Nucifora, G. (2003). "EVI1 promotes cell proliferation by interacting with BRG1 and blocking the repression of BRG1 on E2F1 activity." *J Biol Chem* **278**(50): 49806-49811.

- Clark, P. R. and Hersh, E. M. (1999). "Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts." Curr Opin Mol Ther **1**(2): 158-76.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (1997). "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A., Eaves, C. (1997). "Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 9836-9841.
- Conneally, E., Eaves, C. J., and Humphries, R. K. (1998). "Efficient retroviral-mediated gene transfer to human cord blood stem cells with in vivo repopulating potential." Blood **91**: 3487-3493.
- Corneo, B., Moshous, D., Güngör, T., Wulffraat, N., Philippet, P., Le Deist, F. L., Fischer, A., de Villartay, J. P. (2001). "Identical mutations in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome." Blood **97**: 2772-2776.
- Cross, A. R., Segal, A. W. (2004). "The NADPH oxidase of professional phagocytes - prototype of the NOX electron transport chain systems." Biochim Biophys Acta **1657**: 1-22.
- Cullen, B. R. (1992). "Mechanism of Action of Regulatory Proteins encoded by complex retroviruses." Microbiological Reviews **56**: 375-394.
- Curnutte, J., Orkin, S., Dinauer, M. (1994). „Genetic disorders of phagocyte function, in Stamoyannopoulos G (ed): the Molecular Basis of Blood Diseases (ed 2)". Philadelphia, P.A., Saunders, p493.
- Dadi, H. K., Simon, A. J., Roifman, C. M. (2003). "Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in Severe Combined Immunodeficiency." N Engl J Med **349**: 1821-1828.
- Danos, O., and Mulligan, R. C. (1988). "Safe and efficient generation of recombinant retroviruses withamphotropic and ecotropic host ranges." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6460-4.
- de la Iglesia, N., Konopka, G., Puram, S. V., Chan, J. A., Bachoo, R. M., You, M. J., Levy, D. E., Depinho, R. A., Bonni, A. (2008). "Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway." Genes Dev **22**(4): 449-462.
- de Ridder, J., Uren, A., Kool, J., Reinders, M., Wessels, L. (2006). "Detecting statistically significant common insertion sites in retroviral insertional mutagenesis screens." PLoS Comput Biol **2**: e166.
- Deichmann, A., Haccin-Bey-Abina, S., Schmidt, M., Garrigue, A., Brugman, M. H., Hu, J., Glimm, H., Gyapay, G., Prum, B., Fraser, C. C., et al. (2007). "Vector integration is non-random, clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy." J Clin Invest **117**: 2225-2232.
- Deichmann, A., Brugman, M. H., Bartholomae, C. C., Schwarzwaelder, K., Verstegen, M. M. A., Howe, S. J., Arens, A., Ott, M. G., Hoelzer, D., Seger, R., et al. (2010) "Integration sites in engrafted cells cluster within a limited repertoire of genes after retrovirus vector gene therapy." Blood Manuscript submitted.
- Demaison, C., Brouns, G., Blundell, M. P., Goldman, J. P., Levinsky, R. J., Grez, M., Kinnon, C., Thrasher, A. J. (2000). "A defined window for efficient gene marking of severe combined immunodeficient-repopulating cells using a gibbon ape leukemia virus- pseudotyped retroviral vector." Hum Gene Ther **11**: 91-100.
- De Saint, B. G., Geissmann, F., Flori, E., Uring-Lambert, B., Soudais, C., Cavazzana-Calvo, M., Durandy, A., Jabado, N., Fischer, A., Le Deist, F. (2004). "Severe Combined Immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3." J Clin Invest **114**: 1512-1517.
- Dick, J. E. (2008). "Stem cell concepts renew cancer research." Blood **112**(13): 4793-4807.
- Dick, J. E. (2009). "Looking ahead in cancer stem cell research." Nat Biotechnol **27**(1): 44-46.
- Du, Y., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2005a). "Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary bone marrow progenitor cells." Blood **106**: 3932-3939.
- Duan, D., Sharma, P., Yang, J., Yue, Y., Dudus, L., Zhang, Y., Fisher, K. J., Engelhardt, J. F. (1998). "Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue." J Virol **72**: 8568-8577.
- Dym, M. (1994). "Spermatogonial stem cells of the testis." Proc Natl Acad Sci USA **91**: 11287-11289.
- Dupré, L., Trifari, S., Follenzi, A., Marangoni, F., Lain de Lera, T., Bernad, A., Martino, S., Tsuchiya, S., Bordignon, C., Naldini, L., et al. (2004). "Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction." Mol Ther **10**(5): 903-915.
- Ehrhardt, A., Haase, R., Schepers, A., Deutsch, M. J., Lipps, H. J., Baiker, A. (2008). „Episomal vectors for gene therapy." Curr Gene Ther **8**: 147-161.

- Eichmuller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D., Schadendorf, D. (2001). „Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens.“ *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(2): 629-634.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987). “Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.” *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7413-7417.
- Felice, B., Cattoglio, C., Cittaro, D., Testa, A., Miccio, A., Ferrari, G., Luzi, L., Recchia, A., Mavilio, F. (2009). “Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome.” *PLoS One* **4**(2): e4571.
- Fischer, A., Haccin-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M. (2004). “Gene therapy for immunodeficiency diseases.” *Semin. Hematol.* **41**:272-278.
- Fischer, A. (2007). “Human primary immunodeficiency diseases.” *Immunity* **27**: 835-845.
- Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. (2008). “Gene therapy of inherited diseases.” *Lancet* **371**(9629): 2044-2047.
- Flotte, T. R. (2007). “Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the art.” *J Cell Physiol* **213**: 301-305.
- Friedmann, T. (1992). "A brief history of gene therapy." *Nat Genet* **2**(2): 93-8.
- Gabriel, R., Eckenberg, R., Paruzynski, A., Bartholomae, C. C., Nowrouzi, A., Arens, A., Howe, S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., et al. (2009) “Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy.” *Nat Med* **15**(12): 1431-1436.
- Gallego, M. D., Santamaría, M., Peña, J., Molina, I. J. (1997). “Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation.” *Blood* **90**(8): 3089-3097.
- Gallin, J. I., Alling, D. W., Malech, H. L., Wesley, R., Koziol, D., Marciano, B., Eisenstein, E. M., Turner, M. L., DeCarlo, E. S., Starling, J. M., Holland, S. M. (2003). “Itraconazole to prevent fungal infections in Chronic Granulomatous Disease.” *N Engl J Med* **348**: 2416-2422.
- Galy, A., Roncarolo, M. G., Thrasher, A. J. (2008). “Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich Syndrome.” *Expert Opin Biol Ther* **8**: 181-190.
- Gangi-Peterson, L., Sorscher, D. H., Reynolds, J. W., Kepler, T. B., Mitchell, B. S. (1999). “Nucleotide pool imbalance and adenosine deaminase deficiency induce alterations of N-region insertions during V(D)J recombination.” *J Clin Invest* **103**: 833-841.
- Gaspar, H. B., Parsley, K. L., Howe, S., King, D., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., et al. (2004). “Gene therapy of X-linked Severe Combined Immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector.” *Lancet* **364**: 2181-2187.
- Gaspar, H. B., Bjorkegren, E., Parsley, K., Gilmour, K. C., King, D., Sinclair, J., Zhang, F., Giannakopoulos, A., Adams, S., Fairbanks, D., et al. (2006). “Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning.” *Mol Ther* **14**: 505-513.
- Gaspar, H. B., Aiuti, A., Porta, F., Candotti, F., Hershfield, M. S., Notarangelo, L. D. (2009). “How I treat ADA deficiency.” *Blood* Jul 28.
- Gatti, R. A., Meuwissen, H. J., Allen, H. D., Hong, R., Good, R. A. (1968). “Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency.” *Lancet* **2**: 1366-1369.
- Geha, R. S., Notarangelo, L. D., Casanova, J. L., Chapel, H., Conley, M. E., Fischer, A., Hammarström, L., Nonoyama, S., Ochs, H. D., Puck, J. M. et al. (2007). “Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee.” *J Allergy Clin Immunol* **120**: 776-794.
- Glimm, H., Schmidt, M., Fischer, M., Schwarzwaelder, K., Wissler, M., Klingenberg, S., Prinz, C., Waller, C. F., Lange, W., Eaves, C. J., et al. (2005). "Efficient marking of human cells with rapid but transient repopulating activity in autografted recipients." *Blood* **106**(3): 893-898.
- Gnrke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E. M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., et al. (2009). “Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing.” *Nat Biotechnol* **27**(2): 182-189.
- Goyama, S., Yamamoto, G., Shimabe, M., Sato, T., Ichikawa, M., Ogawa, S., Chiba, S., Kurokawa, M. (2008). “Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells.” *Cell Stem Cell* **3**(2): 207-220.
- Graham, F. L., van der Eb, A. J. (1973). „A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.“ *Virology* **52**: 456-467.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., Dustin, M. L. (1999). “The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation.” *Science* **285**(5425): 221-227.

- Greene, W. C., and Cullen, B. R. (1990). "The Rev-Rex connection: Convergent strategies for the posttranscriptional regulation of HIV-1 and HTLV-1 gene expression." *Semin Virol* **1**: 195-204.
- Grunebaum, E., Mazzolari, E., Porta, F., Dallera, D., Atkinson, A., Reid, B., Notarangelo, L. D., Roifman, C. M. (2006). "Bone marrow transplantation for severe combined immune deficiency." *JAMA* **295**: 508-518.
- Gutierrez, A. A, Lemoine, N. R, Sikora, K. (1992). "Gene therapy for cancer." *Lancet* **339**(8795): 715-721.
- Haccin-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., et al. (2002). "Sustained correction of X-linked Severe Combined Immunodeficiency by ex vivo gene therapy." *N Engl J Med* **346**(16): 1185-1193.
- Haccin-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* **302**(5644): 415-9.
- Haccin-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., et al. (2008). "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." *J Clin Invest* **118**: 3132-3142.
- Hall, P. A., and Watt, F. M. (1989). "Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity." *Development* **106**: 619-633.
- Hargrove, P. W., Kepes, S., Hanawa, H., Obenauer, J. C., Pei, D., Cheng, C., Gray, J. T., Neale, G., Persons, D. A. (2008). "Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in beta-thalassemic hematopoietic cell." *Mol Ther* **16**: 525-533.
- Harkey, M. A., Kaul, R., Jacobs, M. A., Kurre, P., Bovee, D., Levy, R., Blau, C. A. (2007). "Multiarm high-throughput integration site detection: limitations of LAM-PCR technology and optimization for clonal analysis." *Stem Cells Dev* **16**, 381-392.
- Hematti, P., Hong, B. K., Ferguson, C., Adler, R., Hanawa, H., Sellers, S., Holt, I. E., Eckfeldt, C. E., Sharma, Y., Schmidt, M., et al. (2004). "Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells." *PLoS Biol* **2**(12): e423.
- Hershfield, M. S., Mitchell, B. S. (1995). "Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency." In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Vol 2. New York: McGraw-Hill, 1725-1768.
- Hershfield, M. S. (2004). "Combined immune deficiencies due to purine enzyme defects. In: Stiehm, E. R., Ochs, H. D., Winkelstein, J. A., editors. *Immunologic disorders in infants and children*. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 480-504.
- High, K. A. (1999). "Gene Therapy for disorders of hemostasis." *Hematology* **1**: 438-446.
- Hirschhorn, R., Candotti, F. (2006). "Immunodeficiency due to defects of purine metabolism". In: Ochs, H.D., Smith, C. I. E., Puck, J. M., editors. *Primary Immunodeficiency Diseases*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 169-196.
- Howe, S. J., Mansour, M. R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempinski, H., Brugman, M. H., Pike-Overzet, K., Chatters, S. J., de Ridder, D., et al. (2008). "Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients." *J Clin Invest* **118**: 3143-3150.
- Hu, J., Ferris, A., Larochele, A., Krouse, A. E., Metzger, M. E., Donahue, R. E., Hughes, S. H., Dunbar, C. E. (2007). "Transduction of rhesus macaque hematopoietic stem and progenitor cells with avian sarcoma and leukosis virus vectors." *Hum Gene Ther* **18**(8): 691-700.
- Imai, K., Morio, T., Zhu, Y., Jin, Y., Itoh, S., Kajiwara, M., Yata, J., Mizutani, S., Ochs, H. D., Nonoyama, S. (2004). "Clinical course of patients with WASP gene mutations." *Blood* **103**(2): 456-464.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature* **431**(7011): 931-945.
- Ivics, Z., Katzer, A., Stuwe, E. E., Fiedler, D., Knepfel, S., Izsvak, Z. (2007). "Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells." *Mol Ther* **15**(6): 1137-1144.
- Janeway, C. A., Travers, P. (1997). *Immunologie*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Jern, P., Sperber, G. O., Blomberg, J. (2005). "Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy." *Retrovirology* **2**: 50.
- Karlsson, S. (1991). "Treatment of genetic defects in hematopoietic cell function by gene transfer." *Blood* **78**:2481-2492.
- Kay, M. A., Glorioso, J. C., Naldini, L. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." *Nat Med* **7**: 33-40.

- Knaus, U. G., Heyworth, P. G., Evans, T., Curnutte, J. T., Bokoch, G. M. (1991). "Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2." *Science* **254**: 1512-1515.
- Kobayashi, R., Ariga, T., Nonoyama, S., Kanegane, H., Tsuchiya, S., Morio, T., Yabe, H., Nagatoshi, Y., Kawa, K., Tabuchi, K., et al. (2006). "Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan." *Br J Haematol* **135**(3): 362-366.
- Kondo, Y., Shen, L., Ahmed, S., Bumber, Y., Sekido, Y., Haddad, B. R., Issa, J. P. (2008). "Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells." *PLoS One* **3**(4): e2037.
- Korbel, J. O., Urban, A. E., Affourtit, J. P., Godwin, B., Grubert, F., Simons, J. F., Kim, P. M., Palejev, D., Carriero, N. J., Du, L., et al. (2007). "Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome." *Science* **318**(5849): 420-426.
- Korshunova, Y., Maloney, R. K., Lakey, N., Citek, R. W., Bacher, B., Budiman, A., Ordway, J. M., McCombie, W. R., Leon, J., Jeddloh, J. A. (2008). "Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA." *Genome Res* **18**(1): 19-29.
- Kraunus, J., Schaumann, D. H., Meyer, J., Modlich, U., Fehse, B., Brandenburg, G., von Laer, D., Klump, H., Schambach, A., Bohne, J., Baum, C. (2004). "Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing." *Gene Ther* **11**: 1568-1578.
- Kumar, V. V., Singh, R. S. and Chaudhuri, A. (2003). "Cationic transfection lipids in gene therapy: successes, set-backs, challenges and promises." *Curr Med Chem* **10**(14): 1297-1306.
- Kung, C., Pingel, J. T., Heikinheimo, M., Klemola, T., Varkila, K., Yoo, L. I., Vuopala, K., Poyhonen, M., Uhari, M., Rogers, M., et al. (2000). "Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with Severe Combined Immunodeficiency disease." *Nat Med* **6**: 343-345.
- Kustikova, O., Fehse, B., Modlich, U., Yang, M., Dullmann, J., Kamino, K., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Li, Z., Baum, C. (2005). "Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking." *Science* **308**(5725): 1171-1174.
- Kustikova, O. S., Geiger, H., Li, Z., Brugman, M. H., Chambers, S. M., Shaw, C. A., Pike-Overzet, K., de Ridder, D., Staal, F. J., von Keudell, G., et al. (2007). "Retroviral vector insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark "stemness" pathways." *Blood* **109**(5): 1897-1907.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Laufs, S., Gentner, B., Nagy, K. Z., Jauch, A., Benner, A., Naundorf, S., Kuehlcke, K., Schiedlmeier, B., Ho, A. D., Zeller, W. J. et al. (2003). "Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells." *Blood* **101**(6): 2191-2198.
- Lavker, R. M., Miller, S., Wilson, C., Cotsarelis, G., Wei, Z. G., Yang, J. S., Sun, T. T. (1993). "Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation." *J Invest Dermatol* **101**(1 Suppl):16S-26S.
- Lee, N., Russel, N., Ganeshaguru, K., Jackson, B. F., Piga, A., Prentice, H. G., Foa, R., Hoffbrand, A. V. (1984). "Mechanisms of deoxyadenosine toxicity in human lymphoid cells in vitro: relevance to the therapeutic use of inhibitors of adenosine deaminase." *Br J Haematol* **56**: 107-119.
- Lee, K. J., Lee, A. H., and Sung, Y. C. (1993). "Multiple positive and negative cis-acting elements that mediate transactivation by bel1 in the Long Terminal Repeat of human foamy virus." *J Virol* **67**: 2317-2326.
- Leonard, W. J. (1996). "The molecular basis of X-linked Severe Combined Immunodeficiency: defective cytokine receptor signalling." *Annu. Rev. Med.* **47**:229-239.
- Leonard, W. J. (2001). "Cytokines and immunodeficiency diseases." *Nat. Rev. Immunol.* **1**:200-208.
- Lewinski, M. K., Yamashita, M., Emerman, M., Ciuffi, A., Marshall, H., Crawford, G., Collins, F., Shinn, P., Leipzig, J., Hannenhalli, S., et al. (2006). "Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection." *PLoS Pathog* **2**: e60.
- Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., et al. (2002). "Murine leukemia induced by retroviral gene marking." *Science* **296**(5567): 497.
- Locci, M., Draghici, E., Marangoni, F., Bosticardo, M., Catucci, M., Aiuti, A., Cancrini, C., Marodi, L., Espanol, T., Bredius, R. G. (2009). "The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for iNKT cell maturation and function." *J Exp Med* **206**(4): 735-742.
- Lopata, M. A., Cleveland, D. W. and Sollner-Webb, B. (1984). "High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by

- DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment." *Nucleic Acids Res* **12**(14): 5707-5717.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." *Cell Stem Cell* **1**(1): 55-70.
- Marciano, B. E., Wesley, R., De Carlo, E. S., Anderson, V. L., Barnhart, L. A., Darnell, D., Malech, H. L., Gallin, J. I., Holland, S. M. (2004). "Long-term interferon-gamma therapy for 13 patients with Chronic Granulomatous Disease." *Clin Infect Dis* **39**: 692-699.
- Margolis, D. M., Melnick, D. A., Alling, D. W., Gallin, J. I. (1990). "Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of Chronic Granulomatous Disease." *J Infect Dis* **162**: 723-726.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z. et al. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." *Nature* **437**(7057): 376-380.
- Mavrich, T. N., Jiang, C., Ioshikhes, I. P., Li, X., Venters, B. J., Zanton, S. J., Tomsho, L. P., Qi, J., Glaser, R. L., Schuster, S. C., et al. (2008). "Nucleosome organization in the Drosophila genome." *Nature* **453**(7193): 358-362.
- McCormick, M. R., Selzer, R. R., Richmond, T. A. (2007). "Methods in high-resolution, array-based comparative genomic hybridization." *Methods Mol Biol* **381**: 189-211.
- Miao, C. H., Snyder, R. O., Schowalter, D. B., Patijn, G. A., Donahue, B., Winther, B., Kay, M. A. (1998). "The kinetics of rAAV integration in the liver." *Nat Genet* **19**: 13-15.
- Miller, A. D., and Rosman, G. J. (1989). "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression." *Biotechniques* **7**(9): 980-2, 984-6, 989-90.
- Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J. R., Bushman, F. D. (2004). "Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, MLV show distinct target site preferences." *PLoS Biol* **2**: e234.
- Miyoshi, H., Smith, K. A., Mosier, D. E., Verma, I. M., Torbett, B. E. (1999). "Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors." *Science* **283**: 682-686.
- Modlich, U., Kustikova, O. S., Schmidt, M., Rudolph, C., Meyer, J., Li, Z., Kamino, K., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Kuehlcke, K., et al. (2005). "Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis." *Blood* **105**(11): 4235-4246.
- Modlich, U., Bohne, J., Schmidt, M., von Kalle, C., Knoss, S., Schambach, A., Baum, C. (2006). "Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity." *Blood* **108**(8): 2545-2553.
- Modlich, U., Schambach, A., Brugman, M. H., Wicke, D. C., Knoess, S., Li, Z., Maetzig, T., Rudolph, C., Schlegelberger, B., Baum, C. (2008). "Leukemia induction after a single retroviral vector insertion in Evi1 or Prdm16." *Leukemia* **22**(8): 1519-1528.
- Modrow, S., and Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- Molina, I. J., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F. S., Remold-O'Donnell, E. (1993). "T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses." *J Immunol* **151**(8): 4383-4390.
- Monti Graziadei, G. A., Graziadei, P. P. C. (1979). "Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy." *J Neurocytol* **8**(2):197-213.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., et al. (2006). "Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration." *Nat Biotechnology* **24**: 687-696.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C. C., Ranzani, M., Benedicenti, F., Sergi Sergi, L., Ambrosi, A., Ponzoni, M., et al. (2009). "The Genotoxic Potential of Retroviral Vectors is Strongly Modulated by Vector Design and Integration Site Selection." *J Clin Invest* **119**(4): 964-975.
- Moolten, F. L., and Cupples, L. A. (1992). "A model for predicting the risk of cancer consequent to retroviral gene therapy." *Hum Gene Ther* **3**: 479-486.
- Mooslehner, K., Karls, U., and Harbers, K. (1990). "Retroviral integration sites in transgenic Mov mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions." *J Virol* **64**: 3056-3058.
- Morrison, S. J., Uchida, N., and Weissman, I. L. (1994). "The biology of hematopoietic stem cells." *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 35-71.

- Morrison, S. J., Shah, N. M., and Anderson, D. J. (1997). "Regulatory mechanisms in stem cell biology." *Cell* **88**: 287-298.
- Mortellaro, A., Hernandez, R. J., Guerrini, M. M., Carlucci, F., Tabucchi, A., Ponzoni, M., Sanvito, F., Doglioni, C., Di Serio, C., Biasco, L., et al. (2006). "Ex vivo gene therapy with lentiviral vectors rescues adenosine deaminase (ADA)-deficient mice and corrects their immune and metabolic defects." *Blood* **108**(9): 2979-2988.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature* **420**(6915): 520-562.
- Mueller, P. R. and Wold, B. (1989). "In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR." *Science* **246**(4931): 780-6.
- Muul, L. M., Tuschong, L. M., Soenen, S. L., Jagadeesh, G. J., Ramsey, W. J., Long, Z., Carter, C. S., Garabedian, E. K., Alleyne, M., Brown, M., et al. (2003). "Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial." *Blood* **101**(7): 2563-2569.
- Nakai, H., Iwaki, Y., Kay, M. A., Couto, L. B. (1999). "Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver." *J Virol* **73**: 5438-5447.
- Nathwani, A. C., Davidoff, A. M., and Linch, D. C. (2005). "A review of gene therapy for haematological disorders." *Br J Haematol* **128**: 3-17.
- Noguchi, M., Adelstein, S., Cao, X., Leonard, W. J. (1993a). "Characterization of the human interleukin-2 receptor gamma chain gene." *J Biol Chem* **268**: 13601-13608.
- Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S. M., Ziegler, S. F., Tsang, M., Cao, X., Leonard, W. J. (1993b). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor." *Science* **262**: 1877-1880.
- Nolta, J. A., Smogorzewska, E. M., and Kohn, D. B. (1995). "Analysis of optimal conditions for retroviral-mediated transduction of primitive human hematopoietic cells." *Blood* **86**(1): 101-10.
- Ochs, H. D., Thrasher, A. J. (2006). "The Wiskott-Aldrich syndrome." *J Allergy Clin Immunol* **117**(4): 725-738.
- Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." *Nature* **448**(7151): 313-317.
- O'Shea, J. J., Husa, M., Li, D., Hofmann, S. R., Watford, W., Roberts, J. L., Buckley, R. H., Changelian, P., Candotti, F. (2004). "Jak3 and the pathogenesis of Severe Combined Immunodeficiency." *Mol Immunol* **41**: 727-737.
- Ott, M., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., et al. (2006). "Correction of X-linked Chronic Granulomatous Disease by gene therapy, augmented by insertional activation of *MDS1-EVT1*, *PRDM16* or *SETBP1*." *Nat Med* **12**:401-409.
- Overdevest, J. B., Theodorescu, D., Lee, J. K. (2009). "Utilizing the molecular gateway: the path to personalized cancer management." *Clin Chem* **55**(4): 684-697.
- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., Daley, G. Q. (2008). "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors." *Nature* **451**(7175): 141-146.
- Pfeifer, G. P., Steigerwald, S. D., Mueller, P. R., Wold, B., Riggs, A. D. (1989). "Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR." *Science* **246**(4931): 810-3.
- Philpott, N. J., and Thrasher, A. J. (2007). "Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy." *Hum Gene Ther* **18**(6): 483-489.
- Pierson, T. C., Kieffer, T. L., Ruff, C. T., Buck, C., Gange, S.J., Siliciano, R. F. (2002). "Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication." *J Virol* **76**(8): 4138-44.
- Pike-Overzet, K., de Ridder, D., Weerkamp, F., Baert, M. R., Verstegen, M. M., Brugman, M. H., Howe, S. J., Reinders, M. J., Thrasher, A. J., Wagemaker, G. et al. (2006). "Gene therapy: is IL2RG oncogenic in T-cell development?" *Nature* **443**(7109): E5; discussion E6-7.
- Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." *Development* **110**: 1001-1020.
- Potter, H., Weir, L., Leder, P. (1984). "Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation." *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7161-7165.
- Puck, J. M. (1999). "X-linked Severe Combined Immunodeficiency." In: Ochs, H., Smith, C. I. E., Puck, J. M. editors. *Primary immunodeficiency diseases, a molecular and genetic approach*. New York, NY:Oxford University Press; S.99-110.
- Qasim, W., Gaspar, H. B. and Thrasher, A. J. (2009). "Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies." *Gene Therapy* **1**-7.

- Quayle, S. N., Sadar, M. D. (2006). "A truncated isoform of TMEFF2 encodes a secreted protein in prostate cancer cells." *Genomics* **87**(5): 633-637.
- Recchia, A., Bonini, C., Magnani, Z., Urbinati, F., Sartori, D., Muraro, S., Tagliafico, E., Bondanza, A., Stanghellini, M. T., Bernardi, M., et al. (2006). "Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1457-1462.
- Reis-Filho, J. S. (2009). "Next-generation sequencing." *Breast Cancer Res Suppl* **3**: S12.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**: 105-111.
- Rieux-Laucat, F., Hivroz, C., Mateo, V., Pellier, I., Selz, F., Fischer, A., Le Deits, F. (2006). "Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency." *N Engl J Med* **354**: 1913-1921.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., Brown, P. O. (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis." *EMBO J* **12**(5): 2099-108.
- Roifman, C. M., Zhang, J., Chitavat, D., Sharfe, N. (2000). "A partial deficiency of interleukin-7R alpha is sufficient to abrogate T-cell development and cause Severe Combined Immunodeficiency." *Blood* **96**: 2803-2807.
- Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. (2003). "Oxidative killing of microbes by neutrophils." *Microbes Infect* **5**: 1307-1315.
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., et al. (1990). "Gene transfer into humans - immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction." *N Engl J Med* **323**: 570-578.
- Roukos, D. H. (2010). "Novel clinico-genome network modeling for revolutionizing genotype-phenotype-based personalized cancer care." *Expert Rev Mol Diagn* **10**(1): 33-48.
- Sauer, A. V., Mrak, E., Hernandez, R. J., Zacchi, E., Cavani, F., Casiraghi, M., Grunebaum, E., Roifman, C. M., Cervi, M.C., Ambrosi, A., et al. (2009). "ADA-deficient SCID ia associated with a specific microenvironment and bone phenotype characterized by RANKL/OPG imbalance and osteoblast insufficiency." *Blood* Jul 24.
- Scherdin, U., Rhodes, K., and Breindl, M. (1990). "Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration." *J Virol* **64**: 907-912.
- Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., Gansbacher, B., Plank, C. (2002). "Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo." *Gene Ther* **9**: 102-109.
- Schmidt, M., Hoffmann, G., Wissler, M., Lemke, N., Mussig, A., Glimm, H., Williams, D. A., Ragg, S., Hesemann, C. U., C. von Kalle, C. (2001). "Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples." *Hum Gene Ther* **12**(7): 743-749.
- Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Zaoui, K., Ball, C., Pilz, I., Braun, S., Glimm, H., von Kalle, C. (2007). "High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR)." *Nat Methods* **4**(12): 1051-1057.
- Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C. C., Glimm, H., von Kalle, C. (2009). "Detection of retroviral integration sites by linear amplification-mediated PCR and tracking of individual integration clones in different samples." *Methods Mol Biol* **506**: 363-372.
- Schroeder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., Bushman, F. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." *Cell* **110**: 521-529.
- Schwarzwaelder, K., Howe, S. J., Schmidt, M., Brugman, M. H., Deichmann, A., Glimm, H., Schmidt, S., Prinz, C., Wissler, M., King, D. J., et al. (2007). "Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo." *J Clin Invest* **117**: 2241-2249.
- Scollay, R. (2001). "Gene therapy: a brief overview of the past, present, and future." *Ann N Y Acad Sci* **953**: 26-30.
- Segal, A. W. (2005). "How neutrophils kill microbes". *Annu Rev Immunol* **23**: 197-223.
- Seger, R. A. (2008). "Modern management of Chronic Granulomatous Disease." *British journal of Haematology* **140**: 255-266.
- Seggewiss, R., Pittaluga, S., Adler, R. L., Guenaga, F. J., Ferguson, C., Pilz, I. H., Ryu, B., Sorrentino, B. P., Young, W. S., 3rd, R. E. Donahue, R. E., et al. (2006). "Acute myeloid leukemia is associated with retroviral gene transfer to hematopoietic progenitor cells in a rhesus macaque." *Blood* **107**(10): 3865-3867.
- Silver, J. and, Keerikatte, V. (1989). "Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus." *J Virol* **63**(5): 1924-8.
- Snapper, S. B., Rosen, F. S., Mizoguchi, E., Cohen, P., Khan, W., Liu, C. H., Hagemann, T. L., Kwan, S. P., Ferrini, R., Davidson, L., et al. (1998). "Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient

- mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation." *Immunity* **9**(1): 81-91.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S., and Weissman, I. L. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." *Science* **241**(4861): 58-62.
- Spensberger, D., Delwel, R. (2008a). "A novel interaction between the proto-oncogene Evi1 and histone methyltransferases, SUV39H1 and G9a." *FEBS Lett* **582**(18): 2761-2767.
- Spensberger, D., Vermeulen, M., Le Guezennec, X., Beekman, R., van Hoven, A., Bindels, E., Stunnenberg, H., Delwel, R. (2008b). "Myeloid transforming protein Evi1 interacts with methyl-CpG binding domain protein 3 and inhibits in vitro histone deacetylation by Mbd3/Mi-2/NuRD." *Biochemistry* **47**(24): 6418-6426.
- Stein, S., Ott, M. G., Schultze-Strasser, S., Jauch, A., Burwinkel, B., Kinner, A., Schmidt, M., Krämer, A., Schwäble, J., Glimm, H., et al. (2010). "Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease." *Nat Med* **16**(2): 198-204.
- Stocking, C., Bergholz, U., Friel, J., Klingler, K., Wagener, T., Starke, C., Kitamura, T., Miyajima, A., Ostertag, W. (1993). "Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line." *Growth Factors* **8**(3): 197-209.
- Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M., Takeshita, T. (1996). "The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in X-SCID." *Annu. Rev. Immunol.* **14**:179-205.
- Sussman, D. J. and Milman, G. (1984). "Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA." *Mol Cell Biol* **4**(8): 1641-3.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2008). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* **131**(5): 861-872.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Aoki, M., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y., Morishita, R. (2002). "Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle." *Gene Ther* **9**: 372-380.
- Termin, H. M., and Mizutani, S. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." *Nature* **226**: 1211-1213.
- Tewhey, R., Warner, J. B., Nakano, M., Libby, B., Medkova, M., David, P. H., Kotsopoulos, S. K., Samuels, M. L., Hutchison, J. B., Larson, J. W., et al. (2009). "Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing." *Nat Biotechnol* **27**(11): 1025-1031.
- Thornhill, S. I., Schambach, A., Howe, S. J., Ulaganathan, M., Grassman, E., Williams, D., Schiedmeier, B., Sebire, N. J., Gaspar, H. B., Kinnon, C., et al. (2008). "Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked Severe Combined Immunodeficiency." *Mol Ther* **16**(3): 590-598.
- Thrasher, A. J., Haccin-Bey-Abina, S., Gaspar, H. B., Blanche, S., Davies, E. G., Parsley, K., Gilmour, K., King, D., Howe, S., Sinclair, J., et al. (2005). "Failure of SCID-X1 gene therapy in older patients." *Blood* **105**(11): 4255-4257.
- Thrasher, A. J., Gaspar, H. B., Baum, C., Modlich, U., Schambach, A., Candotti, F., Otsu, M., Sorrentino, B., Scobie, L., Cameron, E., et al. (2006). "Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity." *Nature* **443**(7109): E5-6; discussion E6-7.
- Uchida, T., Wada, K., Akamatsu, T., Yonezawa, M., Noguchi, H., Mizoguchi, A., Kasuga, M., Sakamoto, C. (1999). "A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **266**(2): 593-602.
- Vassen, L., Khandanpour, C., Ebeling, P., van der Reijden, B. A., Jansen, J. H., Mahlmann, S., Dührsen, U., Möröy, T. (2009). "Growth factor independent 1b (Gfi1b) and a new splice variant of Gfi1b are highly expressed in patients with acute and chronic leukemia." *Int J Hematol* **89**(4): 422-430.
- Vink, C. A., Gaspar, H. B., Gabriel, R., Schmidt, M., McIvor, R. S., Thrasher, A. J., Qasim, W. (2009). "Sleeping beauty transposition from nonintegrating lentivirus." *Mol Ther* **17**(7): 1197-1204.
- von Kalle, C., Veelken, H. and Rosenthal, F. M. (1999). "Gentherapie in der Onkologie." *Der Onkologe* **5**: 898-909.
- Wang, G. P., Garrigue, A., Ciuffi, A., Ronen, K., Leipzig, J., Berry, C., Lagresle-Peyrou, C., Benjelloun, F., Haccin-Bey-Abina, S., Fischer, A., et al. (2008). "DNA bar coding and pyrosequencing to analyze adverse events in therapeutic gene transfer." *Nucleic Acids Res* **36**(9): e49.
- Weiss, R. A. (2006). "The discovery of endogenous retroviruses." *Retrovirology* **3**: 67.

- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E., Jaenisch, R. (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." Nature **448**(7151): 318-324.
- West, A. G., Gaszner, M., Felsenfeld, G. (2002). "Insulators: Many functions, many mechanisms." Genes Dev **16**: 271-288.
- White, H., Thrasher, A., Veys, P., Kinnon, C., Gaspar, H. B. (2000). "Intrinsic defects of B cell function in X-linked Severe Combined Immunodeficiency." Eur J Immunol **30**: 732-737.
- Williams, D. A., Lemischka, I. R., Nathan, D.G., Mulligan, R. C. (1984). "Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse." Nature **310**(5977): 476-80.
- Winkelstein, J. A., Marino, M. C., Johnston, R. B. Jr, Boyle, J., Curnutte, J., Gallin, J. I., Malech, H. L., Holland, S. M., Ochs, H., Quie, P., et al. (2000). "Chronic Granulomatous Disease. Report on a national registry of 368 patients." Medicine (Baltimore) **79**: 155-169.
- Woods, N. B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C., Verma, I. M. (2006). "Therapeutic gene causing lymphoma." Nature **440**: 1123.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess, S. M. (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science **300**: 1749-1751.
- Wu, X., Luke, B. T., Burgess, S. M. (2006). "Redefining the common insertion site." Virology **344**(2): 292-295.
- Yanez-Munoz, R. J., Balagan, K. S., MacNeil, A., Howe, S. J., Schmidt, M., Smith, A. J., Buch, P., MacLaren, R. E., Anderson, P. N., Barker, S. E., et al. (2006). "Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors." Nat Med **12**(3): 348-353.
- Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., McCabe, D. (1990). "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment." Proc Natl Acad Sci USA **87**: 9568-9572.
- Yap, E.P.H., O'D.McGee, J. (1991). "Short PCR product yields improved by lower denaturation temperatures." Nucleic Acids Research **19**: 1713.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-1920.
- Zeira, E., Manevitch, A., Khatchaturians, A., Pappo, O., Hyam, E., Darash-Yahana, M., Tavor, E., Honigman, A., Lewis, A., Galun, E. (2003). "Femtosecond infrared laser – an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression." Mol Ther **8**: 342-350.
- Zhang, J., Shehabeldin, A., da Cruz, L. A., Butler, J., Somani, A. K., McGavin, M., Kozieradzki, I., dos Santos, A. O., Nagy, A., Grinstein, S., et al. (1999). "Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes." J Exp Med **190**(9):1329-1342.
- Zhang, F., Thornhill, S. I., Howe, S. J., Ulaganathan, M., Schambach, A., Sinclair, J., Kinnon, C., Gaspar, H. B., Antoniou, M., Thrasher, A. J. (2007). "Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells." Blood **110**(5):1448-1457.
- Zhao, Q., Caballero, O. L., Levy, S., Stevenson, B. J., Iseli, C., de Souza, S. J., Galante, P. A., Busam, D., Leversha, M. A., Chadalavada, K., et al. (2009). "Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line." Proc Natl Acad Sci USA **106**(6): 1886-1891.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., Trono, D. (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." J Virol **72**(12): 9873-80.

6 PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

6.1 Publikationen

Czirr, E., Leuchtenberger, S., Dorner-Ciossek, C., **Schneider, A.**, Jucker, M., Koo, E. H., Pietrzik, C. U., Baumann, K., Weggen, S. „Insensitivity to Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gamma-secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations.” (2007). *J Biol Chem* **282**(34): 24504-24513.

Gabriel, R.*, Eckenberg, R.*, **Paruzynski, A.***, Bartholomae, C. C.*, Nowrouzi, A., Arens, A., Howe S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Kirsten, R., Deichmann, A., Ball, C. R., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R.J., Ali, R. R., Gaspar, H.B., Biasco, L., Aiuti, A., Cesana, D., Montini, E., Naldini, L., Cohen-Haguenauer, O., Mavilio, F., Thrasher, A. J., Glimm, H., von Kalle, C., Saurin, W., Schmidt, M. (2009). „Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy.“ *Nat Med* **15**(12): 1431-1436.

Paruzynski, A.*, Arens, A.*, Gabriel, R.*, Bartholomae, C. C.*, Scholz, S., Wolf, S., Glimm, H., Schmidt, M., von Kalle, C. „Genome Wide Integrome High Throughput Sequencing Analyses.“ *Manuskript in Begutachtung bei Nature Protocols*.

Bartholomae, C. C., Arens, A., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R. J., Montini, E., Howe, S.J., **Paruzynski, A.**, Korn, B., MacNeil, A., Cesana, D., Abel, U., Eckenberg, R., Saurin, W., Glimm, H., Naldini, L., Ali, R. R., Thrasher, A. J., von Kalle, C., Schmidt, M. „Specific Lentiviral Vector Integration Profiles in Rodent Postmitotic Tissues.“ *Manuskript in Begutachtung bei Molecular Therapy*.

Deichmann, A.*, Brugman, M. H.*, Bartholomae, C. C.*, Schwarzwaelder, K., Verstegen, M. M. A., Howe, S. J., Arens, A., Ott, M. G., Hoelzer, D., Seger, R., Grez, M., Hacein-Bey Abina, S., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, F., **Paruzynski, A.**, Gabriel, R., Glimm, H., Abel, U., Cattoglio, C., Mavilio, F., Cassani, B., Aiuti, A., Dunbar, C. E., Baum, C., Gaspar, H. B., Thrasher, A. J., von Kalle, C., Schmidt, M., Wagemaker, G. „Integration sites in engrafted cells cluster within a limited repertoire of genes after retrovirus vector gene therapy.” *Manuskript eingereicht bei Blood*.

*Autoren haben gleichermaßen zu der Arbeit beigetragen

6.2 Kongressbeiträge

Paruzynski, A., Gabriel, R., Eckenberg, R., Bartholomae, C. C., Nowrouzi, A., Arens, A., Scholz, S., Howe S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Kirsten, R., Deichmann, A., Ball, C. R., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R.J., Ali, R. R., Gaspar, H.B., Biasco, L., Aiuti, A., Cesana, D., Montini, E., Naldini, L., Cohen-Haguenauer, O., Mavilio, F., Thrasher, A. J., Glimm, H., von Kalle, C., Saurin, W., Schmidt, M. (2009). „Integration Site Analysis by non-restrictive (nr) LAM-PCR combined with optimized High-Throughput Sequencing.”

Combined Meeting of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT, Hannover, Deutschland. *Posterpräsentation.*

Paruzynski, A., Gabriel, R., Eckenberg, R., Bartholomae, C. C., Nowrouzi, A., Arens, A., Howe S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Kirsten, R., Deichmann, A., Ball, C. R., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R.J., Ali, R. R., Gaspar, H.B., Biasco, L., Aiuti, A., Cesana, D., Montini, E., Naldini, L., Cohen-Haguenauer, O., Mavilio, F., Thrasher, A. J., Glimm, H., von Kalle, C., Saurin, W., Schmidt, M. (2009). „Modeling and Increasing the Genome Accessibility of Viral Integration Sites.”

American Society of Gene Therapy, 12th Annual Meeting, San Diego, USA. *Vortag* (Travel Grant Empfänger).

Paruzynski, A., Gabriel, R., Eckenberg, R., Bartholomae, C. C., Nowrouzi, A., Arens, A., Howe S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Kirsten, R., Deichmann, A., Ball, C. R., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R.J., Ali, R. R., Gaspar, H.B., Biasco, L., Aiuti, A., Cesana, D., Montini, E., Naldini, L., Cohen-Haguenauer, O., Mavilio, F., Thrasher, A. J., Glimm, H., von Kalle, C., Saurin, W., Schmidt, M. (2009). „Modeling and Increasing the Genome Accessibility of Viral Integration Sites.”

TransAtlantic Gene Therapy Retreat, San Diego, USA. *Vortag.*

Paruzynski, A., Siler, U., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Grez, M., Seger, R., von Kalle, C., Schmidt, M. (2009). „Analysis of the Gene-Corrected Clonal Inventory of a Successful Clinical X-linked Chronic Granulomatous Disease (X-CGD) Gene Therapy Trial.”

DKFZ PhD Retreat 2009, Weil der Stadt. *Posterpräsentation.*

Paruzynski, A., Gabriel, R., Eckenberg, R., Bartholomae, C. C., Nowrouzi, A., Arens, A., Howe S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Kirsten, R., Deichmann, A., Ball, C. R., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R.J., Ali, R. R., Gaspar, H.B., Biasco, L., Aiuti, A., Cesana, D., Montini, E., Naldini, L., Cohen-Haguenauer, O., Mavilio, F., Thrasher, A. J., Glimm, H., von Kalle, C., Saurin, W., Schmidt, M. (2009). „Design and Performance of Comprehensive Integration Site Analysis in Clinical Gene Therapy.”

Joined Scientific Annual Meeting: 5th Consert Meeting & 1st Persist Meeting, Leukerbad, Schweiz.
Vortrag.

Paruzynski, A., Gabriel, R., Eckenberg, R., Bartholomae, C. C., Nowrouzi, A., Arens, A., Howe S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Kirsten, R., Deichmann, A., Ball, C. R., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R.J., Ali, R. R., Gaspar, H.B., Biasco, L., Aiuti, A., Cesana, D., Montini, E., Naldini, L., Cohen-Haguenauer, O., Mavilio, F., Thrasher, A. J., Glimm, H., von Kalle, C., Saurin, W., Schmidt, M. (2008). „Design and Performance of Comprehensive Integration Site Analysis in Clinical Gene Therapy.”

DKFZ PhD Students Poster Presentation, Heidelberg. *Posterpräsentation.*

Paruzynski, A., Gabriel, R., Eckenberg, R., Bartholomae, C. C., Nowrouzi, A., Arens, A., Howe S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Kirsten, R., Deichmann, A., Ball, C. R., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R.J., Ali, R. R., Gaspar, H.B., Biasco, L., Aiuti, A., Cesana, D., Montini, E., Naldini, L., Cohen-Haguenauer, O., Mavilio, F., Thrasher, A. J., Glimm, H., von Kalle, C., Saurin, W., Schmidt, M. (2008). „Modeling and Increasing the Genome Accessibility of Viral Integration Sites.”

European Society of Gene Therapy, 16th Annual Meeting, Brügge, Belgien. *Vortrag.*

Paruzynski, A., Schwarzwaelder, K., Braun, S., Fetsch, S., Gaspar, H.B., Thrasher, A., von Kalle, C., Schmidt, M. (2008). „Analysis of the clonal inventory of gene-corrected cells from ADA-SCID patients by 454 sequencing technologies.”

Deutsche Gesellschaft für Gentherapie, 15^{te} Jahrestagung, Berlin, Deutschland. *Posterpräsentation.*

Paruzynski, A., Gabriel, R., Eckenberg, R., Bartholomae, C. C., Nowrouzi, A., Arens, A., Howe S. J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., Faber, K., Schwarzwaelder, K., Kirsten, R., Deichmann, A., Ball, C. R., Balaggan, K. S., Yáñez-Muñoz, R.J., Ali, R. R., Gaspar, H.B., Biasco, L., Aiuti, A., Cesana, D., Montini, E., Naldini, L., Cohen-Haguenauer, O., Mavilio, F., Thrasher, A. J., Glimm, H., von Kalle, C., Saurin, W., Schmidt, M. (2008). „Genomic Accessibility of Viral Integration Sites.“

Workshop on Clonality Models and Bioinformatics in Gene Therapy, Heidelberg, Deutschland.
Vortrag.

Schneider, A., Nowrouzi, A., Krenzer, N., Schmidt, M., Korn, B., von Kalle, C. (2008). „A Functional Integration Site Assay to Define Potential Side Effects in Clinical Gene Therapy.”

4th Annual Concert Meeting, Leukerbad, Schweiz. *Posterpräsentation.*

Schneider, A., Nowrouzi, A., Krenzer, N., Schmidt, M., Korn, B., von Kalle, C. (2007). „Evaluation of a Highly Sensitive Integration Site Assay to Monitor the Influence of Vector Integration on Gene Expression.”

European Society of Gene Therapy, 15th Annual Meeting, Rotterdam, Niederlande. *Posterpräsentation.*

Schneider, A., Schmidt, M., Korn, B., von Kalle, C. (2007). „Sensitive RNA Microarray Analysis for a Functional Integration Site Assay.”

Deutsche Gesellschaft für Genterapie, 14^{te} Jahrestagung, Heidelberg, Deutschland. *Posterpräsentation.*

Schneider, A., Nowrouzi, A., Krenzer, N., Schmidt, M., Korn, B., von Kalle, C. (2007). „Evaluation of a Highly Sensitive Functional Integration Site Assay.“

TransAtlantic Gene Therapy Retreat, London, UK. *Vortrag.*

7 ANHANG

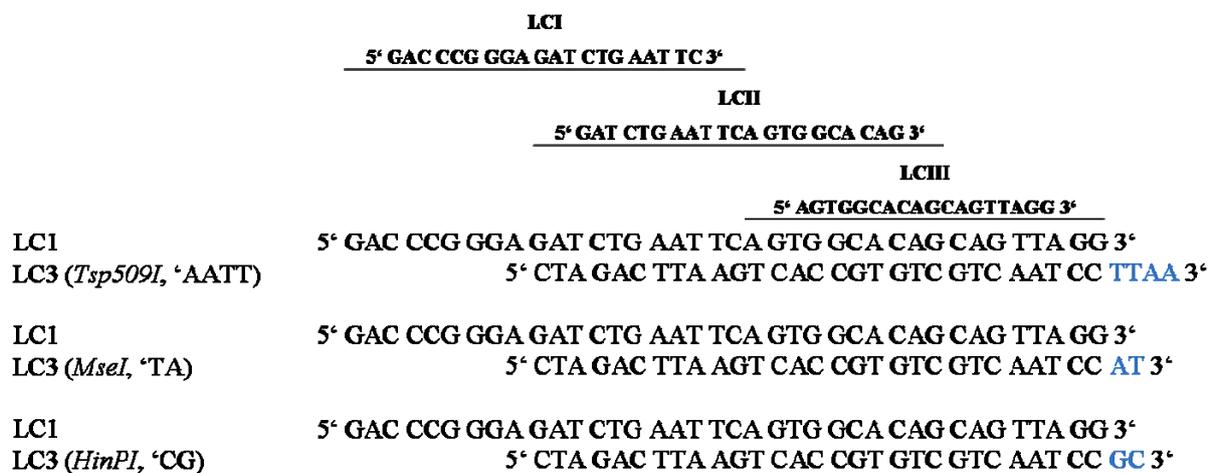


Abbildung 7.1: Design der Linkerkassette für die lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR). Für die Herstellung der Linkerkassetten wurden Oligonukleotide verwendet, die nach Hybridisierung einen Überhang bilden. Die Sequenz des LC3 Oligonukleotides war abhängig von dem in der LAM-PCR verwendeten Restriktionsenzym, die Sequenz des LC1 Oligonukleotides war immer gleich. Die Hybridisierung der Linkerkassetten Oligonukleotide ist am Beispiel einer Linkerkassette für das Enzym *Tsp509I*, *MseI* und *HinPI* dargestellt, welche einen AATT, TA bzw. CG Überhang bilden. Die Lage der Linker-Primer, welche zur Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge verwendet werden sind angegeben (LCI, LCII). Die Sequenz des LCIII Primers ist der Linker-spezifische Anteil des Fusionsprimers B-LK (Pyrosequenzierung). LC, Linkerkassette.

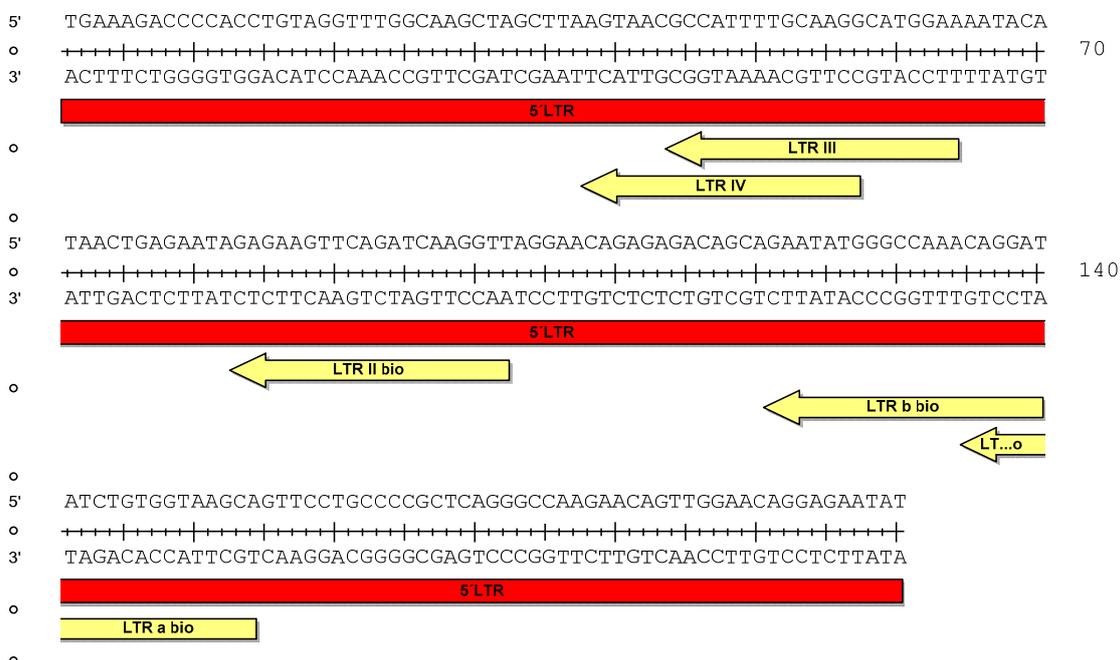


Abbildung 7.2: Lage der LAM-PCR Primer im 5'-LTR MLV-basierender gammaretroviraler Vektoren. LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; LTR, „Long Terminal Repeat“; MLV, „Murine Leukemia Virus“; bio, biotinyliert.

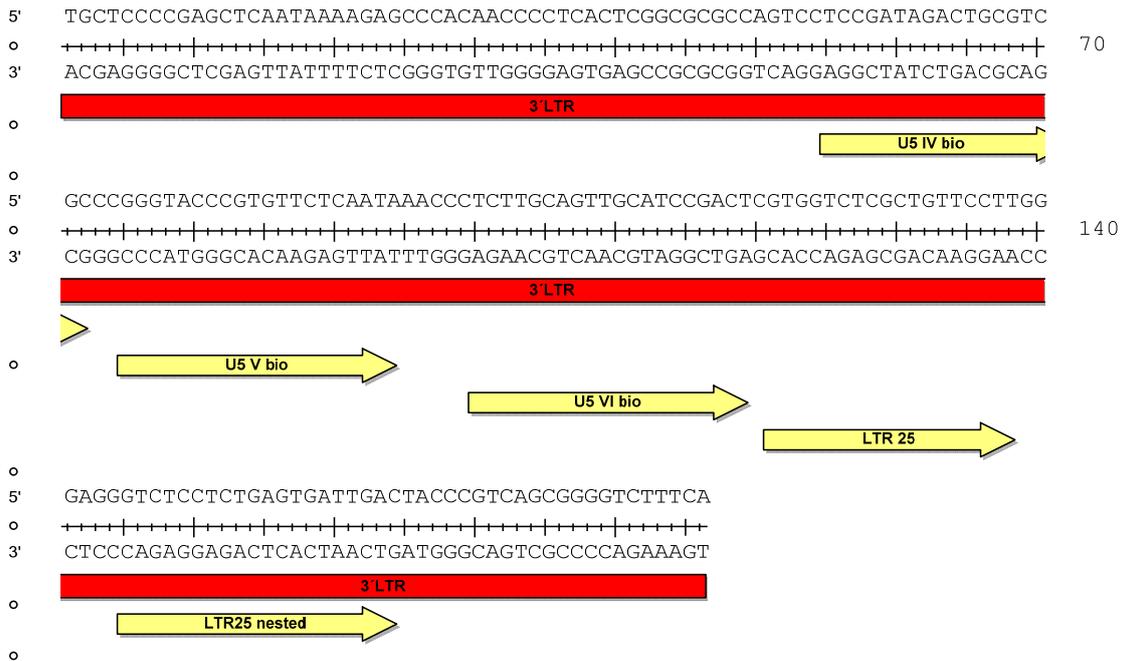


Abbildung 7.3: Lage der LAM-PCR Primer im 3'-LTR MLV-basierender gammaretroviraler Vektoren. LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; LTR, „Long Terminal Repeat“; MLV, „Murine Leukemia Virus“; bio, biotinyliert.

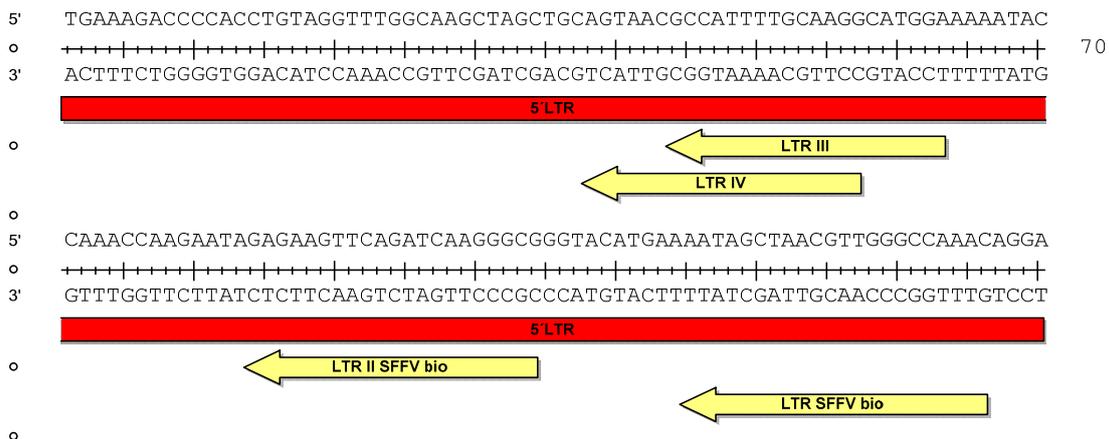


Abbildung 7.4: Lage der LAM-PCR Primer im 5'-LTR SFFV-basierender gammaretroviraler Vektoren. LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; LTR, „Long Terminal Repeat“; SFFV, „Spleen Focus Forming Virus“; bio, biotinyliert.

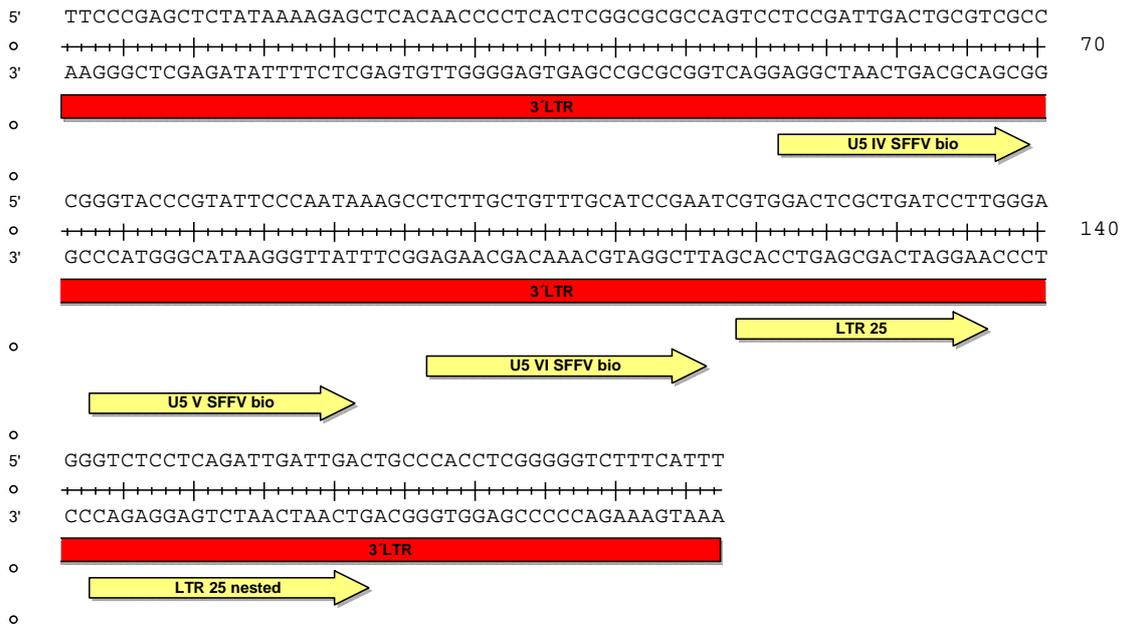


Abbildung 7.5: Lage der LAM-PCR Primer im 3'-LTR SFFV-basierender gammaretroviraler Vektoren. LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; LTR, „Long Terminal Repeat“; SFFV, „Spleen Focus Forming Virus“; bio, biotinyliert.

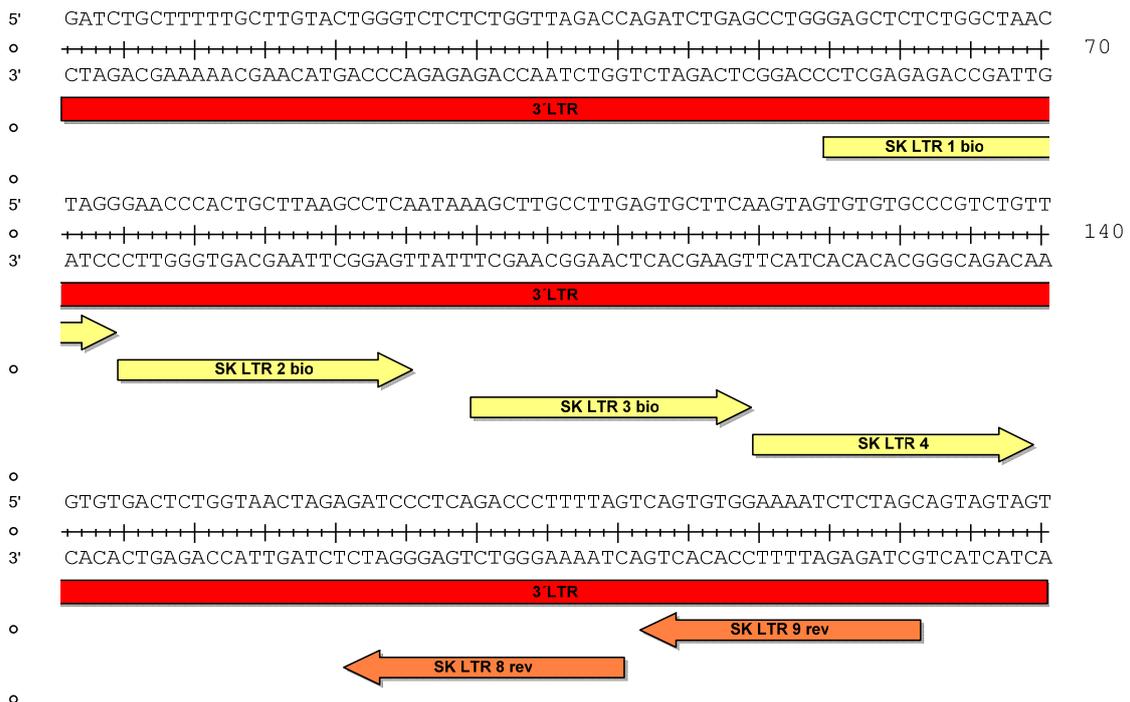


Abbildung 7.6: Lage der LAM-PCR Primer im 3'-LTR HIV-basierender lentiviraler Vektoren. LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; LTR, „Long Terminal Repeat“; HIV, Humanes Immundefizienz Virus; bio, biotinyliert; rev, „reverse“.

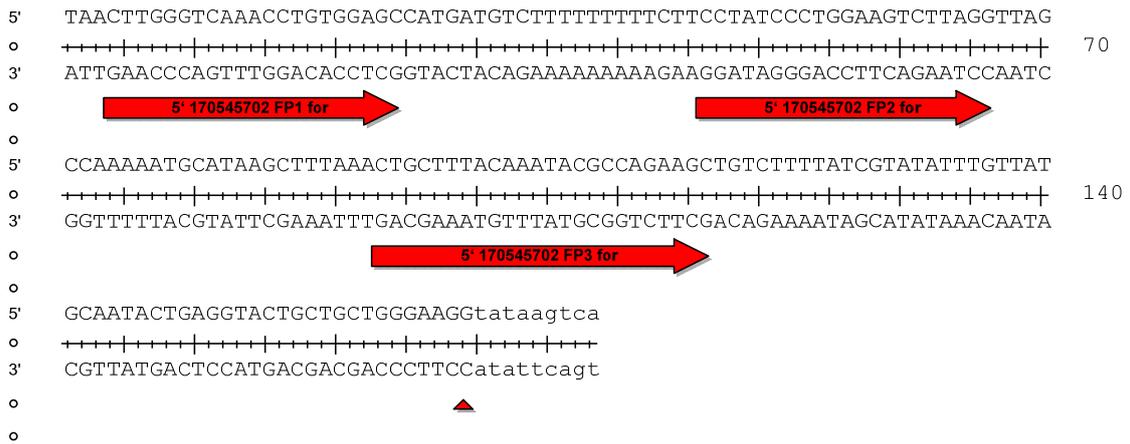


Abbildung 7.9: Lage der „Tracking“-Primer für die spezifische Amplifikation der *MDS1*-Integration 170545702 in dem Patienten 2 der schweizer X-CGD Genterapiestudie. Der rote Pfeil markiert die Stelle der Integration. FP, Flankenprimer; for, „forward“; MDS1, „Myelodysplastic Syndrome 1“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“.

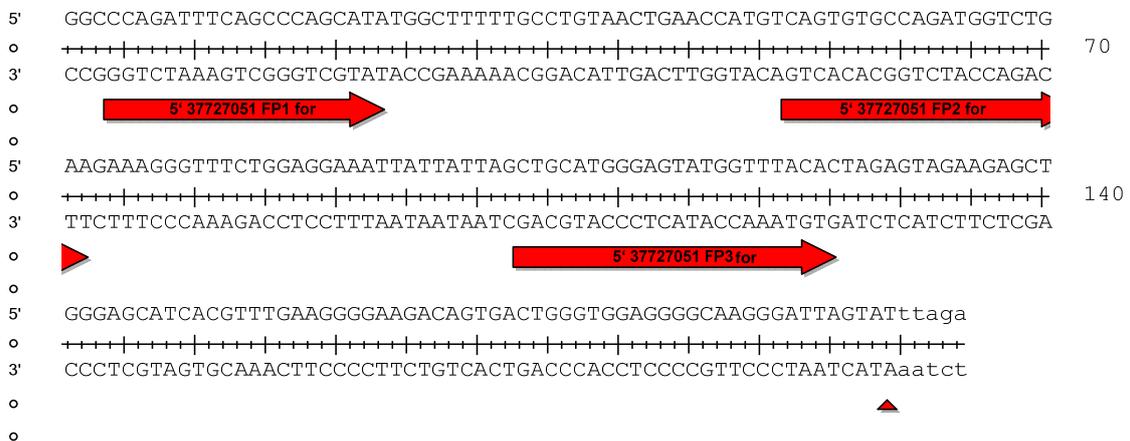


Abbildung 7.10: Lage der „Tracking“-Primer für die spezifische Amplifikation der *STAT3*-Integration 37727051 in dem Patienten 2 der schweizer X-CGD Genterapiestudie. Der rote Pfeil markiert die Stelle der Integration. FP, Flankenprimer; for, „forward“; STAT3, „Signal Transducer and Enhancer of Transcription 3“; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“.

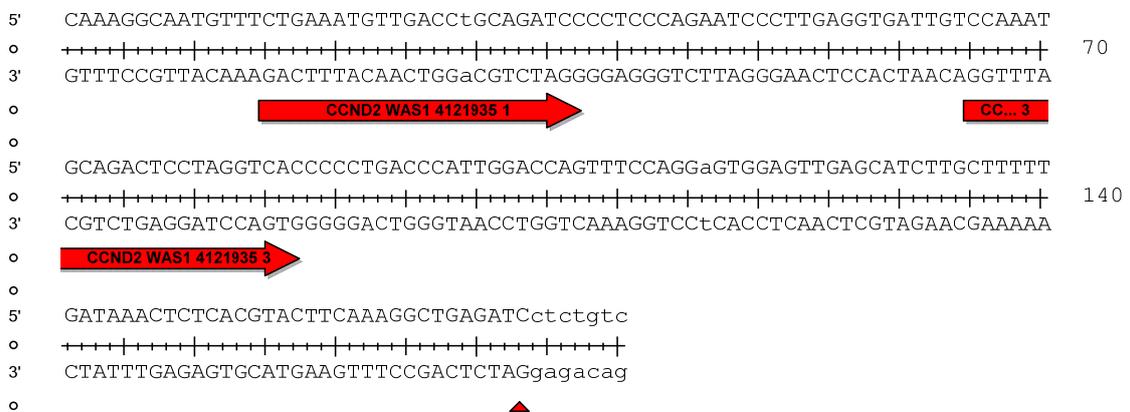


Abbildung 7.11: Lage der „Tracking“-Primer für die spezifische Amplifikation der *CCND2*-Integration 4121935 in dem Patienten 1 der WAS Genterapiestudie. Der rote Pfeil markiert die Stelle der Integration. CCND2, „CCND2 Cyclin D2“; WAS, Wiskott Aldrich Syndrom.

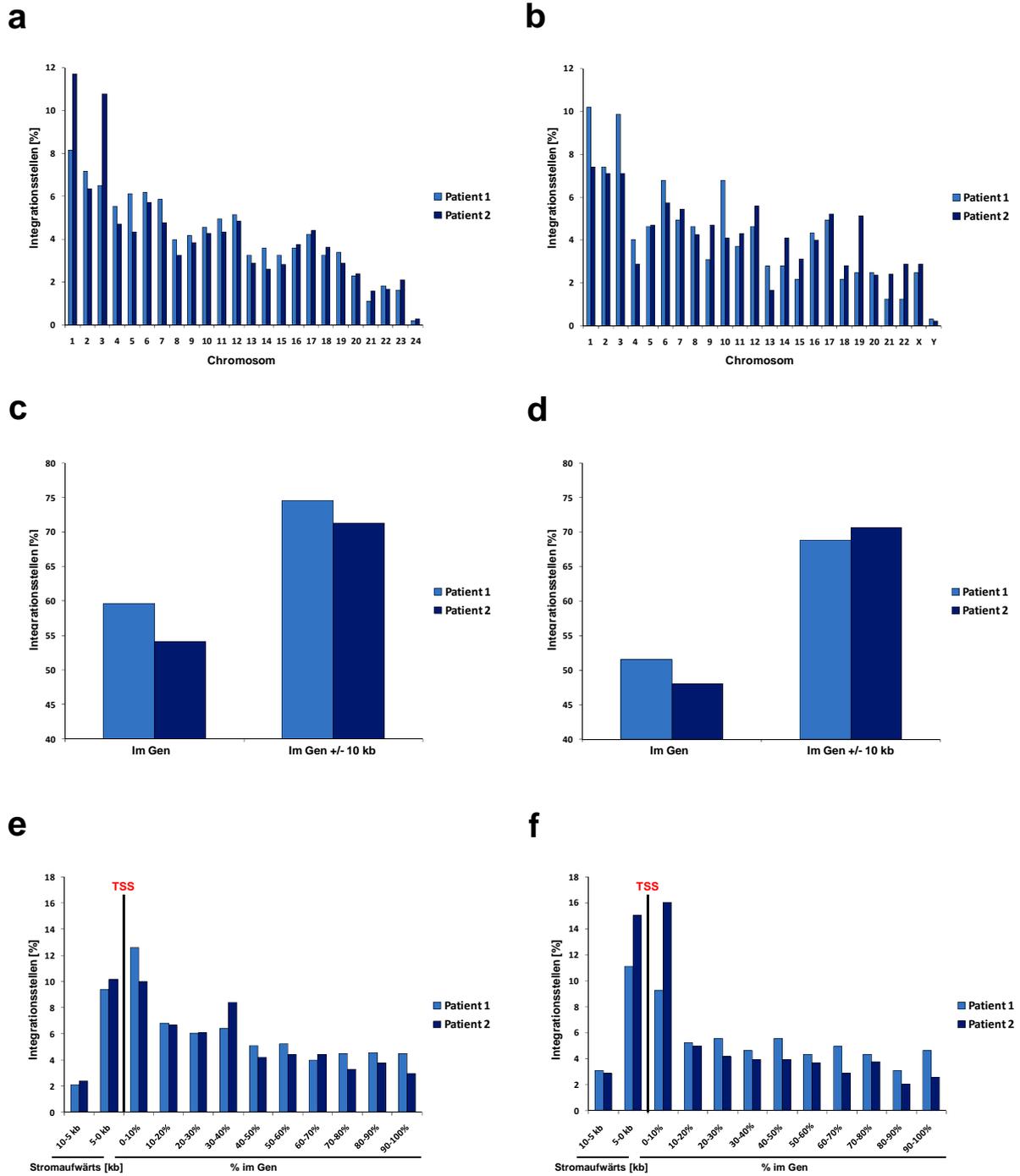


Abbildung 7.12: Verteilung der Integrationsstellen in den zwei X-CGD Gentherapiestudien. Die chromosomale Verteilung der Integrationsstellen in der schweizer (a) und in der koreanischen X-CGD Gentherapiestudie (b). Die Verteilung der Integrationsstellen innerhalb von Genen bzw. innerhalb von Genen und der umliegenden Bereiche (+/- 10 kb) für die schweizer (c) und die koreanische Gentherapiestudie (d) zeigte, dass die Integration des gammaretroviralen Vektors bevorzugt in oder in der Nähe von genkodierenden Bereichen stattfindet. Zwischen 68% und 75% der Integrationsstellen lagen in Genen und den umliegenden Bereichen. Die Analyse der Verteilung der Integrationsstellen innerhalb von Genen und bis zu 10 kb stromaufwärts der TSS für die schweizer (e) und die koreanische Studie (f) zeigte weiterhin, dass die Integration bevorzugt in der Nähe der TSS stattfindet und keine uniforme Verteilung über das komplette Gen vorliegt. ‚Hellblau‘, Patient 1 der jeweiligen Studie; ‚dunkelblau‘, Patient 2 der jeweiligen Studie; kb, Kilobasen; TSS, Transkriptionsstartstelle; X-CGD, „X-linked Chronic Granulomatous Disease“.

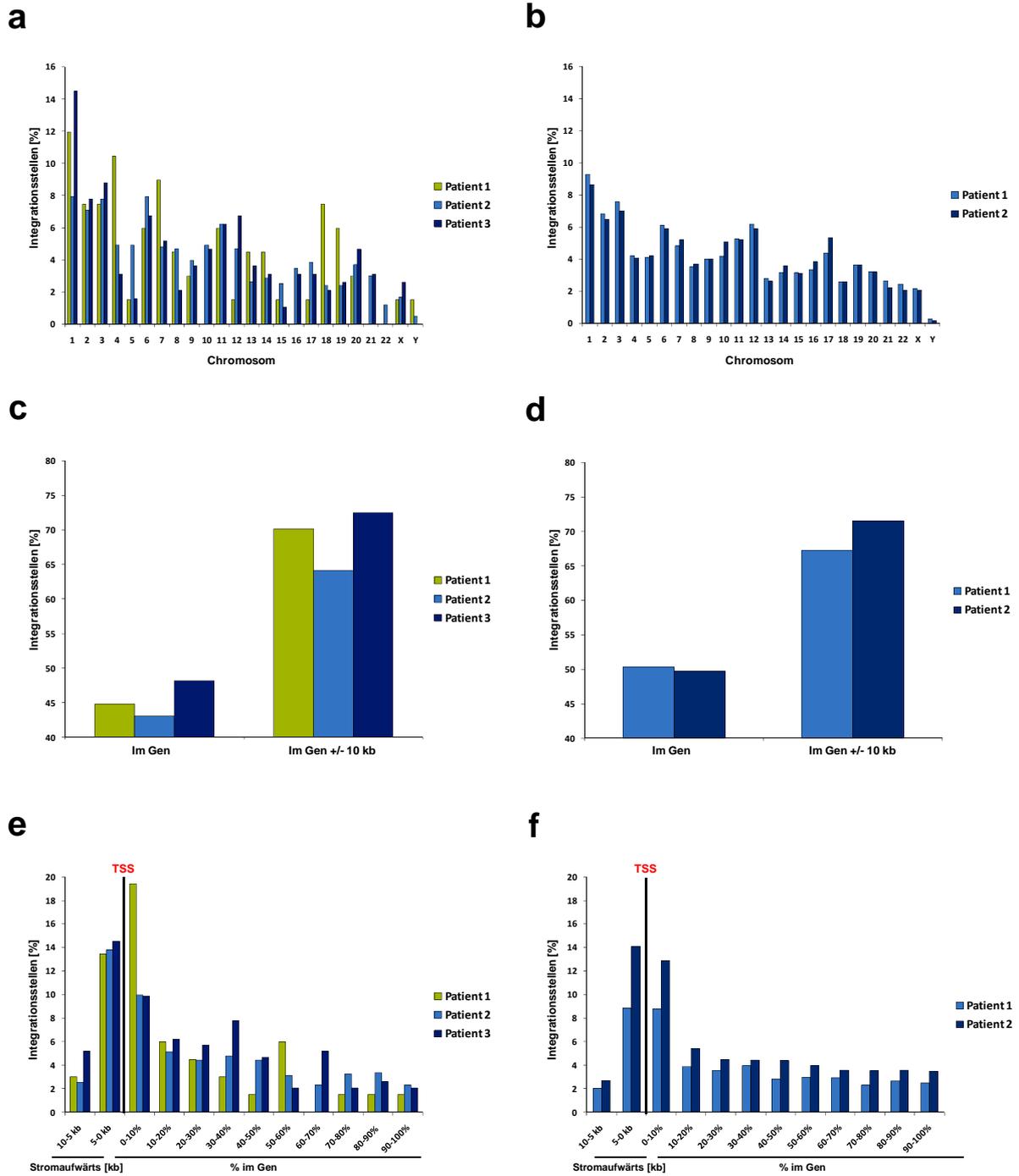


Abbildung 7.13: Verteilung der Integrationsstellen in der ADA-SCID und der WAS Genterapiestudie. Die chromosomale Verteilung der Integrationsstellen in der ADA-SCID (a) und in der WAS Genterapiestudie (b). Die Verteilung der Integrationsstellen innerhalb von Genen bzw. innerhalb von Genen und der umliegenden Bereiche (+/- 10 kb) für die ADA-SCID (c) und die WAS Genterapiestudie (d) zeigte, dass zwischen 64% und 73% der Integrationsstellen in Genen und den umliegenden Bereichen lagen. Die Analyse der Verteilung der Integrationsstellen innerhalb von Genen und bis zu 10 kb stromaufwärts der TSS für die ADA-SCID (e) und die WAS Studie (f) zeigte weiterhin, dass keine uniforme Verteilung der Integrationsstellen über das Gen, sondern eine Anhäufung in der Nähe der TSS vorliegt. ‚Hellblau‘, Patient 1 der jeweiligen Studie; ‚dunkelblau‘, Patient 2 der jeweiligen Studie; ‚grün‘, Patient 3 der ADA-SCID Studie; kb, Kilobasen; TSS, Transkriptionsstartstelle; ADA-SCID, „Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“; WAS, „Wiskott Aldrich Syndrome“.

DANKSAGUNG

Der erfolgreiche Abschluss einer Doktorarbeit ist nicht nur von dem Doktoranden selbst, sondern auch entscheidend von der Unterstützung der Arbeitskollegen, Freunde und der Familie abhängig. Daher möchte ich diese Seite nutzen, um allen Menschen, die mir immer mein Ziel vor Augen gehalten und mich in dieser Zeit begleitet haben, zu danken.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Christof von Kalle für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Unterstützung während meiner ganzen Doktorarbeit und für die fachlichen Ratschläge bedanken.

Bei Prof. Dr. Valerie Bosch und Prof. Dr. Oliver Fackler möchte ich mich ebenfalls bedanken für die Betreuung meiner Doktorarbeit als Erstgutachter bzw. dritter externer Gutachter. Die gemeinsamen Besprechungen über den Fortschritt meiner Doktorarbeit haben mir bei der weiteren Planung der Experimente sehr geholfen.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei Dr. Manfred Schmidt, der mir die Chance gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit zu machen. Für die gute Betreuung, für die vielen Ratschläge während meiner Doktorarbeit, für das gute Arbeitsklima, für die Geduld in der ganzen Zeit und für die vielen Möglichkeiten meine Ergebnisse auf Meetings mit anderen auszutauschen. Er hat mir geholfen, selbstständiger zu werden und meinen Weg zu finden.

Mein Dank gilt ebenfalls unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Reinhard Seger, Dr. Ulrich Siler, Prof. Dr. Adrian Thrasher, Prof. Dr. Bobby Gaspar, Prof. Dr. Christoph Klein, Dr. Kaan Boztug, Prof. Dr. Sunyoung Kim, Prof. Dr. Luigi Naldini, Prof. Dr. Fulvio Mavilio und Prof. Dr. Odile Cohen-Haguener für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials und Ralph Eckenberg für die gemeinsame Entwicklung des mathematischen Modells.

Bei all meinen Arbeitskollegen möchte ich mich bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit Ratschlägen zur Seite standen. Bei Richard und Cynthia für die gemeinsame Etablierung der nrLAM-PCR, bei der uns oft der Kopf rauschte. Aber auch für ihren Rat in allen Lebenslagen, für ihre Freundschaft und für die vielen schönen Abende in der Heidelberger Altstadt. Bei Annette für die Hilfe und den Einsatz bei der vergleichenden Integrationsstellenanalyse. Bei Kerstin, die mir bei der Integrationsstellenanalyse der Patientenproben immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mit der ich viele schöne Gespräche frühmorgens geführt habe. Bei meiner italienischen Kollegin Eliana, die mit ihrem netten, lustigen und humorvollen Wesen mich immer zum Lachen brachte und mit der mich mittlerweile eine wunderbare Freundschaft verbindet. Bei Simone für die vielen schönen Gespräche während unserer Heidelberger Altstadt Erkundungstouren, bei denen ich ihre lustige und lebensfrohe Art schätzen lernte und bei denen wir immer wieder gemeinsam unsere Ausdauer beweisen konnten. Bei Ina, Christina, Sandra, Nadine und Stefanie, die mir nicht nur oft bei meinen Experimenten geholfen haben, sondern mit denen ich immer eine schöne Mittagspause und lustige 45-Minuten-Besprechungen verbrachte. Bei Katrin für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung im Labor und die schönen Telefongespräche. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen, unter anderem auch bei Wei, Ali, Christine, Anne und den OMZlern für die gute Arbeitsatmosphäre und für die vielen Hilfestellungen während meiner Doktorarbeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden ganz herzlich danken, ohne die dieser Weg einfach nicht möglich gewesen wäre, denn sie haben mit ihrer Unterstützung entscheidend bei der Umsetzung meiner Ziele mitgeholfen. Meinem Mann Christian möchte ich besonders danken. Ich danke Dir für Deine bedingungslose Unterstützung, den Mut, den Du mir immer gemacht hast, Deine Geduld, wenn ich mal wieder erst spät abends Heim gekommen bin oder am Wochenende gearbeitet habe, das gute Essen, das trotz der langen Arbeitstage immer Zuhause auf mich wartete, Deine Liebe, die mich so stark gemacht und mir Halt gegeben hat. Meinen Eltern und meiner Schwester die immer ein offenes Ohr für mich hatten, stets hinter mir standen und mich in allen meinen Entscheidungen all die Jahre unterstützt haben. Meinen Schwiegereltern, meiner Schwägerin Lea und all meinen Freunden, die immer für mich da waren.

Ich danke Euch für Eure Unterstützung!

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Die Literatur, deren Ergebnisse in die Dissertation eingeflossen sind, ist vollständig angegeben. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Heidelberg, im März 2010

.....

Anna Paruzynski