

# **INAUGURAL – DISSERTATION**

**zur**

**Erlangung der Doktorwürde**

**der**

**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät**

**der**

**Ruprecht-Karls-Universität**

**Heidelberg**

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Simone Scholz

aus Backnang

Tag der mündlichen Prüfung:



**THEMA:**

**Die Quantifizierung der Genotoxizität  
Selbstinaktivierender Retroviraler Vektoren  
für die Gentherapie**

Gutachter:

Prof. Dr. Christof von Kalle

Prof. Dr. Frank Lyko



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>VI</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>1.1 Hämatopoese</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1.1 Aufbau und Funktion .....	- 1 -
1.1.2 Stamm- und Progenitorzellen.....	- 3 -
<b>1.2 Gentransfer</b> .....	<b>- 4 -</b>
1.2.1 Vektorsysteme für den Gentransfer .....	- 4 -
1.2.2 Retrovirale Gentransfervektoren .....	- 5 -
<b>1.3 Somatische Gentherapie</b> .....	<b>- 9 -</b>
1.3.1 Grundprinzip der Gentherapie .....	- 9 -
1.3.2 Retrovirale Gentherapiestudien .....	- 10 -
<b>1.4 Biologische Sicherheit der retroviralen Gentherapie</b> .....	<b>- 12 -</b>
1.4.1 Nebenwirkungen des retroviralen Gentransfers.....	- 12 -
1.4.2 Sicherheitsoptimierung retroviraler Vektoren.....	- 15 -
1.4.3 Systeme zur Einschätzung der biologischen Sicherheit retroviraler Vektoren .....	- 17 -
<b>1.5 Septische Granulomatose</b> .....	<b>- 20 -</b>
1.5.1 Krankheitsbild .....	- 20 -
1.5.2 Standardtherapie.....	- 21 -
1.5.3 Gentherapie der X-CGD .....	- 22 -
1.5.4 Ausblick .....	- 23 -
<b>1.6 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>- 24 -</b>

<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>- 25 -</b>
2.1.1 Transduzierte Zelllinien und primäre Zellen.....	- 25 -
2.1.2 Präklinisches Material .....	- 25 -
2.1.3 Patientenmaterial.....	- 26 -
2.1.4 Zelllinien.....	- 27 -
2.1.5 Oligonukleotide („Primer“) .....	- 27 -
2.1.6 DNA-Längenstandard, Enzyme und Kits.....	- 29 -
2.1.7 Chemikalien und Reagenzien.....	- 30 -
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	- 31 -
2.1.9 Sonstige Materialien .....	- 31 -
2.1.10 Geräte.....	- 32 -
2.1.11 Computerprogramme und Datenbanken .....	- 33 -
2.1.12 Fotomaterial.....	- 33 -
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>- 33 -</b>
2.2.1 Isolation und Transduktion ‚Lineage‘ negativer ( <i>lin</i> -) X-CGD Stammzellen .....	- 33 -
2.2.2 Zellkultur .....	- 34 -
2.2.3 Plasmidpräparation .....	- 34 -
2.2.4 Virusproduktion .....	- 34 -
2.2.4.1 Lentivirale Vektoren .....	- 34 -
2.2.4.2 Gammaretrovirale Vektoren.....	- 35 -
2.2.5 Bestimmung des Virustiters.....	- 36 -
2.2.6 Transduktion.....	- 37 -
2.2.6.1 Transduktion von HeLa-Zellen mit lentiviralen Vektoren .....	- 37 -
2.2.6.2 Transduktion von <i>lin</i> - X-CGD Zellen mit gammaretroviralen Vektoren.....	- 37 -
2.2.6.3 Transduktion von 32D-Zellen .....	- 37 -
2.2.7 Vorbereitung von Zellen für die FACS Analyse .....	- 38 -
2.2.8 Genotoxizitätsassay.....	- 38 -

---

2.2.9	DNA-Isolation.....	- 38 -
2.2.10	RNA-Isolation.....	- 39 -
2.2.11	cDNA-Synthese.....	- 39 -
2.2.12	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der DNA, RNA und cDNA .....	- 40 -
2.2.13	Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	- 41 -
2.2.14	Bestimmung der Transduktionseffizienz.....	- 42 -
2.2.15	Lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR).....	- 43 -
2.2.15.1	Lineare Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge .....	- 43 -
2.2.15.2	Immobilisierung an Magnetischen Partikeln („Magnetic Capture“).....	- 44 -
2.2.15.3	Herstellung der Linkerkassetten.....	- 44 -
2.2.15.4	DNA-Doppelstrangsynthese („Hexanukleotidpriming“).....	- 45 -
2.2.15.5	Restriktionsverdau.....	- 45 -
2.2.15.6	Ligation der Linkerkassette.....	- 46 -
2.2.15.7	Denaturierung der DNA-Partikel-Komplexe .....	- 46 -
2.2.15.8	Exponentielle Amplifikationen .....	- 47 -
2.2.16	Nicht-restriktive Lineare amplifikationsmedierte PCR (nrLAM-PCR).....	- 48 -
2.2.16.1	Lineare Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge bei der nrLAM-PCR.....	- 48 -
2.2.16.2	„Magnetic Capture“ .....	- 49 -
2.2.16.3	Ligation einer einzelsträngigen Linkerkassette.....	- 49 -
2.2.16.4	Exponentielle Amplifikationen der nrLAM-PCR .....	- 50 -
2.2.17	Abschätzung der Effizienz einzelsträngiger Ligation .....	- 51 -
2.2.18	Gelelektrophorese.....	- 52 -
2.2.19	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	- 52 -
2.2.20	Fusionsprimer-PCR.....	- 53 -
2.2.21	Pyrophosphatsequenzierung.....	- 54 -
2.2.22	Analyse aberranter Transkripte .....	- 54 -

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>- 55 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung einer funktionellen Integromanalyse</b> .....	<b>- 55 -</b>
3.1.1	Optimierung der nicht-restriktiven Integrationsstellenanalyse (nrLAM-PCR).....	- 55 -
3.1.2	Nachweis chimärer Transkripte .....	- 58 -
<b>3.2</b>	<b>Sicherheitsoptimierte Retrovirale Vektoren für die Gentherapie der Septischen Granulomatose (X-CGD)</b> .....	<b>- 59 -</b>
3.2.1	Untersuchung eines SIN-gammaretroviralen X-CGD Gentherapievektors .....	- 59 -
3.2.1.1	Klonalität der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation <i>in vivo</i> .....	- 60 -
3.2.1.2	Charakterisierung bevorzugter Integrationsorte.....	- 63 -
3.2.1.3	Transformationspotential.....	- 65 -
3.2.1.4	Inzidenz chimärer Transkripte .....	- 66 -
3.2.2	Untersuchung SIN-lentiviraler X-CGD Gentherapievektoren.....	- 69 -
3.2.2.1	Charakterisierung eines SIN-lentiviralen Integrationsstellenprofils <i>in vivo</i> .....	- 69 -
3.2.2.2	Untersuchung der genkorrigierten Hämatopoese nach klinischer Gentherapie..	- 71 -
3.2.2.3	Einfluss genetischer Faktoren auf die Integration .....	- 75 -
<b>3.3</b>	<b>Funktionelle Integromanalyse lentiviraler Vektoren</b> .....	<b>- 77 -</b>
3.3.1	Molekulare Auswirkungen einzelner Vektorelemente .....	- 77 -
3.3.1.1	Heterogenität transduzierter Zellpopulationen.....	- 78 -
3.3.1.2	Genomweite Integrationsstellenverteilung der lentiviralen Vektoren.....	- 80 -
3.3.1.3	Aberrante Genexpression .....	- 84 -
3.3.1.4	Transformationspotential in Abhängigkeit des Vektordesigns .....	- 88 -
3.3.2	Detailanalyse neuer Sicherheits Elemente .....	- 92 -
3.3.2.1	Auswirkungen von Insulatoren auf Integration und Selektion .....	- 92 -
3.3.2.2	Einfluss der $\beta$ -Globin Lokuskontrollregion ( $\beta$ -LCR) auf die Genexpression .....	- 95 -

<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>96 -</b>
<b>4.1 Genotoxizität und Wirksamkeit SIN-retroviraler X-CGD Vektoren</b> .....	<b>98 -</b>
4.1.1 Geringes genotoxisches Potential des SIN-gammaretroviralen X-CGD Vektors .....	98 -
4.1.2 Sicheres präklinisches Integrationsprofil eines SIN-lentiviralen X-CGD Vektors ..	101 -
4.1.3 Der klinische Einsatz von SIN-retroviralen X-CGD Vektoren.....	102 -
4.1.4 Klinische SIN-lentivirale X-CGD Gentherapie .....	103 -
4.1.5 ‚Engraftment‘ genkorrigierter X-CGD Zellen .....	104 -
<b>4.2 Einfluss des lentiviralen Vektordesigns auf Integration und Transkription</b> .....	<b>106 -</b>
4.2.1 Promotoren beeinflussen das initiale Integrationsstellenprofil .....	106 -
4.2.2 Die Aktivität des Promotors bestimmt das selektionierte Integrationsstellenprofil	107 -
4.2.3 Änderung des Integrationsstellenprofils durch Insulatoren .....	109 -
4.2.4 Art und Lage des Promotors sind entscheidend für die aberrante Genexpression..	110 -
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>115 -</b>
<b>6 Publikationen, Auszeichnungen und Kongressbeiträge</b> .....	<b>123 -</b>
<b>6.1 Publikationen</b> .....	<b>123 -</b>
6.1.1 Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit.....	123 -
6.1.2 Eingereichte Publikationen.....	123 -
6.1.3 Publikationen aus vorangegangener Tätigkeit.....	124 -
<b>6.2 Auszeichnungen</b> .....	<b>124 -</b>
<b>6.3 Kongressbeiträge (eigene Beiträge)</b> .....	<b>124 -</b>
6.3.1 Vorträge .....	124 -
6.3.2 Posterpräsentationen .....	125 -
<b>7 ANHANG</b> .....	<b>127 -</b>
<b>7.1 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>127 -</b>
<b>7.2 Zusätzliche Abbildung</b> .....	<b>131 -</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>132 -</b>
<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>134 -</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Die retrovirale Gentherapie wurde bereits in mehreren klinischen Studien erfolgreich zur Behandlung monogenetischer Erkrankungen eingesetzt. Die vektorassoziierte Aktivierung zellulärer Protoonkogene (z.B. *MDS1/EVI1*) und die Manifestation maligner Transformation in einzelnen Patienten verdeutlichten jedoch das Risiko, das mit dem Einsatz integrierender Vektorsysteme verbunden ist. Neben der Protoonkogen-Aktivierung existieren noch weitere vektorassoziierte Ereignisse mit potentiell toxischen Auswirkungen (z.B. Haploinsuffizienz, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, aberrante Transkripte und veränderte Proteine). Ein genaues Verständnis der unterschiedlichen Aspekte der Genotoxizität gentherapeutischer retroviraler Vektoren ist daher von größter Wichtigkeit für deren klinische Anwendung.

In dieser Arbeit wurden sicherheitsrelevante Parameter der Funktion SIN-retroviraler Vektoren für die Gentherapie der Septischen Granulomatose (X-CGD) systematisch quantifiziert. Vergleichende Integromanalysen wurden verwendet, um ein Aktivitätsprofil genetischer Nebenwirkungen *in vitro* und im präklinischen Mausmodell zu erheben. Die Vektoren verursachten keine vektorvermittelte klonale Selektion und wiesen eine signifikant geringere Inzidenz von Integraten im *MDS1/EVI1* Locus auf als die herkömmlichen Vektoren mit vollständigen ‚Long Terminal Repeats‘ (LTR). Die Untersuchung viral-zellulärer Spleißprodukte mit einem gammaretroviralen SIN-Vektor zeigte nur vereinzelte aberrante Fusionstranskripte.

Klonalitätsanalysen der frühen Hämatopoese nach klinischer SIN-lentiviraler Gentherapie (University College London) zeigten eine polyklonale genkorrigierte Repopulation, wobei die unzureichende Konditionierung des Patienten nach 6 Monaten zum Verlust der Genmarkierung führte. Im Gegensatz zu bisherigen X-CGD Gentherapiestudien fand hier keine bevorzugte Integration in den Genlocus *MDS1/EVI1* statt. Somit konnte gezeigt werden, dass der genetische Hintergrund der X-CGD keinen offensichtlichen Einfluss auf die präferentielle Integration in diesen Locus oder andere ausübt.

In primären hämatopoetischen Zellen und in einem Genotoxizitätsassay mit einer IL-3 abhängigen Zelllinie wurden die Auswirkungen verschiedener lentiviraler Vektoren untersucht. Die Art und Aktivität des internen Promotors in SIN-lentiviralen Vektoren bestimmt maßgeblich das Integrationsprofil sowie die Bildung chimärer Transkripte. Es wurde gezeigt, dass der interne Promotor die Restaktivität des 5'-SIN-LTRs und somit das Risiko zur Bildung viral-zellulärer Fusionstranskripte unter Beteiligung des kanonischen Spleißdonors erhöht. Mit einem schwachen Promotor sinkt hingegen die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung aberranter Transkripte. Durch den Genotoxizitätsassay wurde die Bedeutung der Inzidenz viral-zellulärer Fusionstranskripte für das genotoxische Potential lentiviraler Vektoren bestätigt.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass durch hochauflösende funktionelle Integromanalysen eine fundierte Einschätzung der biologischen Sicherheit gentherapeutischer retroviraler Vektoren möglich ist. Der Einfluss neuer struktureller Vektorelemente auf das Sicherheitsprofil wurde definiert und dessen biologische Relevanz anhand der generierten Transkripte und in angeschlossenen Genotoxizitätsassays bestimmt. Detaillierte präklinische Analysen gammaretro- und lentiviraler SIN-Vektoren ermöglichten den Nachweis der sicheren und effizienten retroviralen X-CGD Gentherapie und deren Translation in die Klinik. Ein sicherheitsoptimierter SIN-gammaretroviraler Vektor wurde für eine klinische Phase I/II X-CGD Studie zugelassen.

## SUMMARY

Retroviral gene therapy was successfully applied in several clinical trials for the treatment of monogenic diseases. However, vector-associated activation of cellular proto-oncogenes (e.g. *MDS1/EVI1*) and manifestation of malignant transformation in individual patients illustrated the risk that is associated with the use of integrating vector systems. Apart from proto-oncogene activation further vector-associated effects with potential toxic consequences exist (e.g. haploinsufficiency, inactivation of tumor suppressor genes, aberrant transcripts or altered proteins). Thus, a profound understanding of the different aspects contributing to the genotoxic potential of gene therapeutic vectors is essential for their clinical application.

In this study safety-relevant parameters of the function of SIN-retroviral vectors for the gene therapy of X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD) were systematically quantified. Comparative integrome analyses were used to establish an activity profile of genetic side effects *in vitro* and in preclinical mouse models. These vectors did not trigger vector-associated clonal selection and displayed a significantly reduced incidence of insertions in the *MDS1/EVI1* locus compared to conventional vectors with complete long terminal repeats (LTR). The dissection of viral-cellular fusion transcripts caused by a gammaretroviral SIN-vector revealed only rare aberrant fusion transcripts.

Clonality analyses of early hematopoiesis after SIN-lentiviral X-CGD gene therapy (University College London) showed a polyclonal gene-corrected repopulation, which was lost about 6 months later probably due to an insufficient conditioning before transplantation. In contrast to previous X-CGD gene therapy studies no preferred integration in the *MDS1/EVI1* gene locus was observed. Thus, the genetic background of X-CGD does not exert an obvious effect on the preferential integration in this or other loci.

In primary hematopoietic cells and in a genotoxicity assay with an IL-3-dependent cell line the effects of various lentiviral vectors were examined. The nature and strength of the internal promoter in SIN-lentiviral vectors is decisive for the integration site profile and the formation of chimeric transcripts. It was shown that the internal promoter affects the residual activity of the 5'-SIN-LTR, thereby potentially increasing the risk of viral-cellular fusion transcript formation by an elevated usage of the strong canonical splice donor. However, with a weak promoter the influence on aberrant transcript formation decreases. Using the genotoxicity assay the importance of the incidence of viral-cellular fusion transcripts for the genotoxic potential of lentiviral vectors was confirmed.

The results presented here demonstrate the feasibility of high-resolution functional integrome analyses for the sophisticated assessment of the biological safety of therapeutic retroviral vectors. The impact of new structural vector elements on the vector safety profile was defined and its biological relevance determined by the generated transcripts and in associated genotoxicity assays. Detailed preclinical analyses of gammaretro- and lentiviral SIN-vectors confirmed their potential as safe and efficient tools for the gene therapy of X-CGD and enabled the translation into the clinics. These analyses facilitated the approval of a safety-optimized SIN-gammaretroviral vector for a clinical phase I/II X-CGD gene therapy trial.

# 1 EINLEITUNG

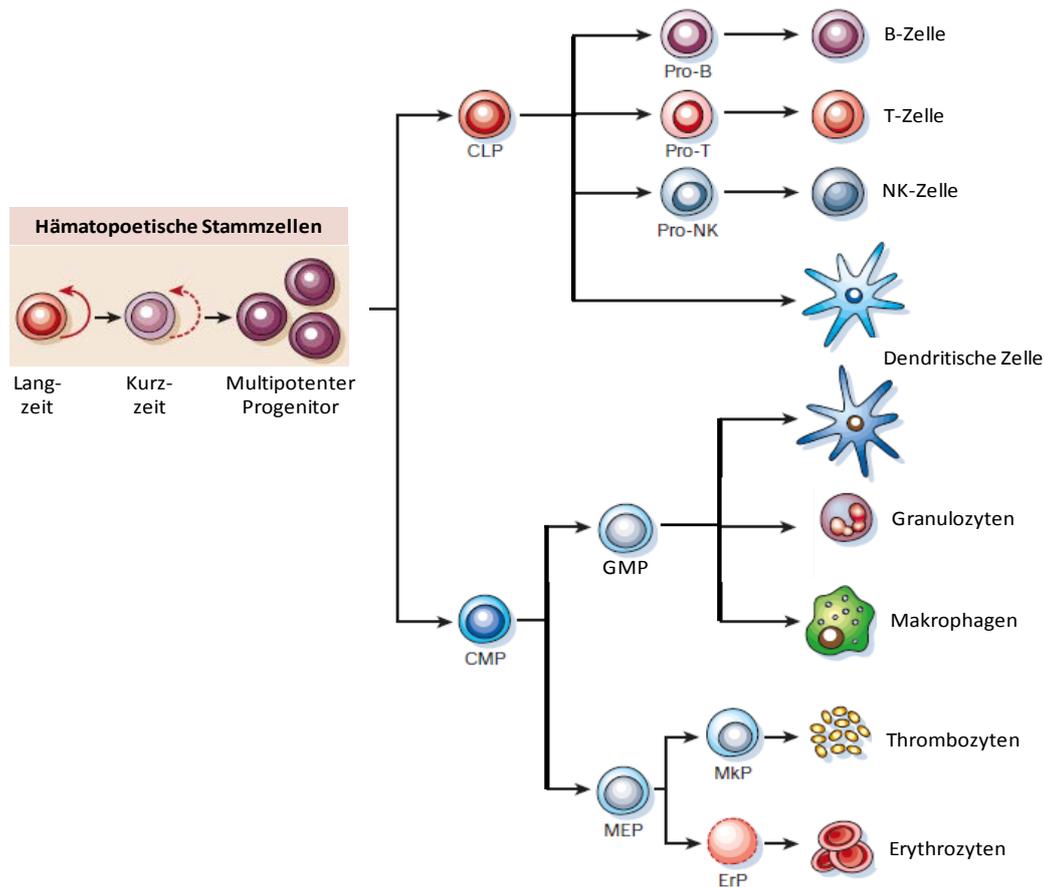
## 1.1 Hämatopoese

Blut setzt sich aus einem flüssigen (Plasma) und einem zellulären Bestandteil zusammen. Der zelluläre Bestandteil des Blutes besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zellen, die sich alle aus gemeinsamen Vorläuferzellen, den Blut- oder hämatopoetischen Stammzellen („Hematopoietic Stem Cells“, HSC), entwickeln. Der Prozess, in dem die Blutzellen gebildet werden, wird als Hämatopoese bezeichnet. Die Lebensdauer reifer Blutzellen ist sehr unterschiedlich und reicht von wenigen Stunden (Granulozyten) bis zu mehreren Jahren (Gedächtniszellen). Um ein konstantes Level zirkulierender Zellen zu erhalten, müssen täglich etwa  $10^{11}$ - $10^{12}$  neue Blutzellen gebildet werden (Dexter et al. 1987).

### 1.1.1 Aufbau und Funktion

Die Hämatopoese teilt sich in verschiedene Blutzelllinien, in denen die reifen Blutzellen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen hervorgehen. Durch Differenzierung der HSC werden zunächst die gemeinsamen myeloiden („common myeloid progenitor“, CMP) (Dexter 1984, Metcalf 1985) und die gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen („common lymphoid progenitor“, CLP) (Kondo et al. 1997) gebildet.

Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entstehen B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese sogenannten Lymphozyten sind wichtige Bestandteile der zellulären und humoralen Immunabwehr, die der Erkennung und Zerstörung von Fremdkörpern wie Bakterien und Viren dient. B-Lymphozyten erkennen Antigene von Krankheitserregern über die B-Zell-Rezeptoren, wodurch sie aktiviert werden und zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen ausdifferenzieren. T-Lymphozyten erkennen körperfremde Stoffe über die T-Zell-Rezeptoren (TCR). Sie sind im Gegensatz zu den B-Lymphozyten auf die Präsentation der Antigene durch den Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“, MHC) auf der Oberfläche anderer Zellen angewiesen. Zusammen bilden sie das adaptive Immunsystem. Die NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie erkennen die verminderte Expression von MHC-Molekülen auf Tumor- und infizierten Zellen, die den cytotoxischen T-Zellen entgehen, und führen zur Apoptose der Zielzellen (Abbas et al. 2011).



**Abbildung 1.1: Die Hämatopoese.** Hämatopoetische Stammzellen (HSC) können in HSC mit Langzeit- und Kurzzeit-Selbsterneuerungspotential und multipotente Vorläuferzellen ohne Selbsterneuerungspotential unterteilt werden. Aus den multipotenten Progenitorzellen gehen die gemeinsamen lymphoiden (CLP) und gemeinsamen myeloiden Progenitorzellen (CMP) hervor. B-Zellen, T-Zellen, und NK-Zellen bilden sich über verschiedene Zwischenstufen aus der lymphoiden Vorläuferzelle. Aus der myeloiden Vorläuferzelle geht eine Granulozyten/Makrophagen Progenitorzelle (GMP) und eine Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitorzelle (MEP) hervor. Aus der GMP entwickeln sich dendritische Zellen, Granulozyten und Makrophagen, während aus den MEPs die kernlosen Thrombozyten und Erythrozyten hervorgehen. 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.

Aus den myeloiden Vorläuferzellen gehen die Granulozyten/Makrophagen Progenitorzellen (GMP) und die Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitorzellen (MEP) hervor. GMPs sind die Vorläufer dendritischer Zellen, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Die Funktion der dendritischen Zellen ist die Antigenprozessierung und -präsentation und die Verstärkung der spezifischen Immunantwort durch die T-Lymphozyten. Granulozyten enthalten charakteristische Granula im Cytoplasma, aufgrund derer sie weiter in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterschieden werden können. Sie sind Teil der angeborenen unspezifischen Abwehr von Bakterien, Parasiten und Pilzen. Neutrophile Granulozyten, auch kurz Neutrophile genannt, sind die häufigsten Granulozyten und stellen die erste Abwehrlinie des Körpers dar. Sie können Mikroorganismen durch verschiedene Strategien bekämpfen: durch Phagozytose, die Ausschüttung löslicher antimikrobieller Substanzen oder die Bildung sogenannter ‚neutrophil

extracellular traps' (NETs)(Brinkmann et al. 2004). Die Aufgabe der Monozyten ist die Zerstörung körperfremder Stoffe durch Phagozytose sowie die Antigenpräsentation. Sie sind die Vorläufer der Makrophagen und eines Teils der Dendritischen Zellen. Makrophagen zählen wie die Neutrophilen zu den professionellen Phagozyten und sind Teil der angeborenen Immunabwehr. Darüber hinaus sind sie aber auch an vielfältigen anderen Prozessen wie der Narbenbildung und Angiogenese beteiligt.

Die MEPs sind die Vorläufer der kernlosen Thrombozyten und Erythrozyten. Thrombozyten (Blutplättchen) entstehen durch Abschnürung aus Megakaryozyten und spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung. Die Erythrozyten (rote Blutkörperchen) sind die häufigsten Zellen im Blut. Ihre Aufgaben sind der Transport von Sauerstoff aus der Lunge in die diversen Gewebe sowie der Abtransport von Kohlendioxid aus den Geweben heraus (Lensch et al. 2004).

### 1.1.2 Stamm- und Progenitorzellen

Stammzellen zeichnen sich durch ein großes Selbsterneuerungspotential aus, aufgrund dessen sie viele Zellteilungen durchlaufen können ohne auszudifferenzieren. Ihre Fähigkeit zur asymmetrischen Zellteilung stellt einen wichtigen Mechanismus zum Erhalt einer bestehenden Stammzellpopulation dar. Bei diesem Prozess entstehen aus einer Stammzelle eine identische Stammzelle mit gleichem Differenzierungs- und Selbsterneuerungspotential sowie eine differenzierte Tochterzelle. Stammzellen können über längere Zeit in einer mitotischen Ruhephase vorliegen, in der sie keiner Zellteilung untergehen. Bei entsprechendem Bedarf gehen sie in einen mitotisch aktiven Zustand über. Neben ihrem großen Selbsterneuerungspotential besitzen sie auch die Fähigkeit, in verschiedene Zell- und Gewebetypen auszudifferenzieren zu können, wobei frühe Stammzellen ein größeres Differenzierungspotential haben als späte.

Die ontogenetisch frühesten Stammzellen sind die pluripotenten bzw. totipotenten embryonalen Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich zu jedem Zelltyp eines Organismus entwickeln zu können. Aus ihnen gehen die somatischen Stammzellen (adulte Stammzellen) hervor, die in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkter sind als embryonale Stammzellen. Pluripotente adulte Stammzellen gibt es nur wenige; sie können in geringen Mengen z.B. im Nabelschnurblut gefunden werden. Im weiteren Reifungsprozess entstehen die Vorläuferzellen, die im Hinblick auf ihre künftigen Funktionsbereiche spezialisierter sind als somatische Stammzellen. Sie werden daher auch als determinierte Stammzellen bezeichnet. Mit steigendem Differenzierungsgrad sinkt das Selbsterneuerungspotential der Zellen während ihre mitotische Aktivität stetig zunimmt (Reya et al. 2001).

HSCs gehören zu den adulten Stammzellen. Sie setzen sich aus verschiedenen Populationen mit Langzeit- und Kurzzeit-Selbsterneuerungspotential und multipotenten Vorläuferzellen ohne Selbsterneuerungspotential zusammen. HSCs mit Langzeitselbsterneuerungspotential befinden sich größtenteils in einem ruhenden Zustand und machen einen vergleichsweise geringen Anteil der gesamten Stammzellpopulation aus. Da HSCs verhältnismäßig einfach aus verschiedenen Geweben (Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut) isoliert werden können und aus ihnen das gesamte Repertoire der Blutzellen und des Abwehrsystems gebildet wird, stellen sie ein gutes Ziel für die *ex vivo* Gentherapie (siehe **Abschnitt 1.3.1**) dar. Die Fähigkeit der HSC in lymphoide und myeloide Zellen ausdifferenzieren zu können, ermöglicht die Korrektur verschiedenster Zelltypen. Ihre Selbsterneuerungskapazität gewährleistet eine kontinuierliche Versorgung mit genkorrigierten Zellen. In Kombination mit integrierenden Vektorsystemen, die die stabile Expression eines therapeutischen Transgens erlauben (z.B. retrovirale Vektoren), kann somit eine lebenslange Korrektur eines genetischen Defekts erreicht werden.

## 1.2 Gentransfer

Als Gentransfer wird das gezielte Einbringen genetischen Materials in eine Wirtszelle bezeichnet. Dadurch können gentechnisch veränderte Organismen erzeugt werden, die z.B. zur Produktion eines bestimmten Proteins oder als Modellorganismus zur Untersuchung einer Krankheit dienen können. Der Gentransfer kann auch zur Behandlung von Krankheiten verwendet werden (Gentherapie), indem ein defektes oder deletiertes Gen durch eine funktionelle Kopie ersetzt wird. Zum Einbringen von Fremd-DNA/RNA in die Zielzellen werden sogenannte Vektoren (Genfähren) verwendet. Die Effizienz und Sicherheit des Gentransfers ist in großem Maß vom verwendeten Vektor und dessen Ursprung abhängig, so dass je nach Verwendungszweck unterschiedliche Vektorsysteme zum Einsatz kommen.

### 1.2.1 Vektorsysteme für den Gentransfer

Je nach Ursprung des Gentransfervektors wird zwischen viralen und nicht-viralen Vektorsystemen unterschieden. Der Gentransfer von nackter/Plasmid-DNA mittels nicht-viraler Vektoren wird als Transfektion bezeichnet und kann durch chemische, physikalische oder biologische Methoden erreicht werden. Nicht-virale Vektoren haben den Vorteil einer geringen Toxizität; die niedrige Effizienz und die überwiegend transiente Expression des therapeutischen Transgens mit diesen Systemen sind jedoch Gründe für den mehrheitlichen Einsatz viraler Vektoren in der klinischen Gentherapie (Kootstra et al. 2003).

Viren haben im Laufe der Zeit spezielle Mechanismen entwickelt, um ihr Genom effizient in Wirtszellen einzubringen und dort zu exprimieren. Von Viren abgeleitete Vektoren stellen daher leistungsfähige Vehikel für den Transfer von Genen in Zielzellen dar. Um eine unkontrollierte Verbreitung des therapeutischen Vektors zu verhindern, kommen in der Regel replikationsdefiziente Vektoren zum Einsatz. Diese können weiter unterteilt werden in integrierende und nicht-integrierende Vektoren. Nicht-integrierende Vektoren liegen episomal in der Zelle vor und werden bei der Zellteilung nicht repliziert. In mitotisch aktiven Zellen kommt es daher zu einer stetigen Verdünnung der Episomen, so dass nur eine transiente Expression des Transgens erreicht wird. Nicht-integrierende virale Vektoren werden meist von Adenoviren, Herpes Simplex Viren (HSV), Ebolaviren, Alphaviren, Hepatitis Viren, Vacciniaviren, Polioviren und SV40 abgeleitet (Flotte, 2007, Lufino et al., 2008). Adeno-assoziierte virale (AAV) Vektoren können sowohl episomal vorliegen als auch in das Wirtsgenom integrieren. AAVs haben einen nicht-pathogenen Charakter und sind ohne einen Helfervirus nicht in der Lage sich zu replizieren, weshalb sie gut für die klinische Gentherapie geeignet sind (Kay et al. 2001). Die Hauptvertreter integrierender Vektoren basieren auf Viren der Familie der *Retroviridae* (Retroviren). Durch die stabile Integration in das Wirtsgenom kann mit diesen Vektoren auch in mitotisch aktiven Zellen eine beständige Transgenexpression erreicht werden. Retrovirale Vektoren werden daher bevorzugt zur Korrektur genetischer Defekte u.a. des hämatopoetischen Systems eingesetzt, um einen dauerhaften Nutzen zu gewährleisten (Kootstra et al. 2003).

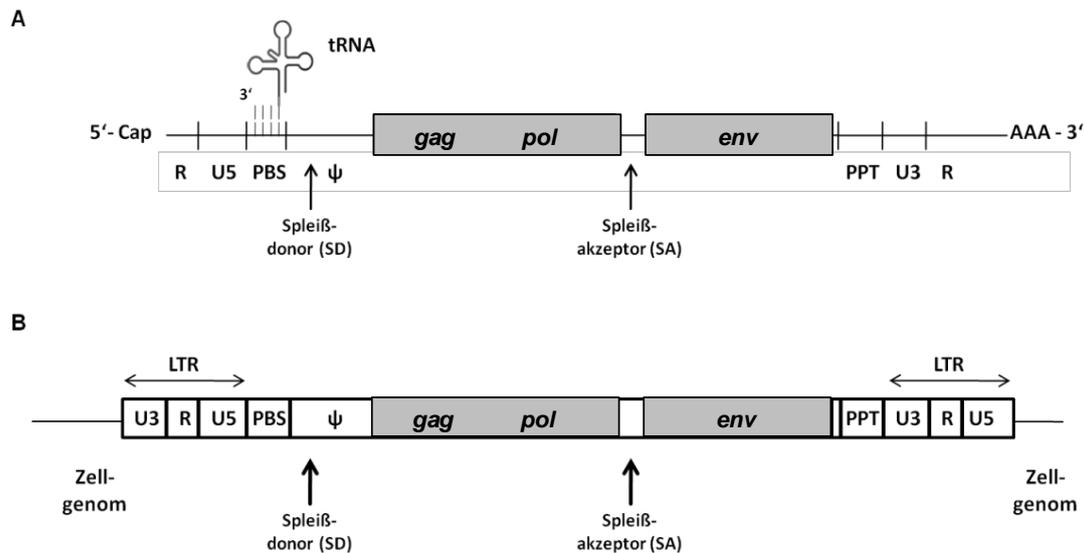
### 1.2.2 Retrovirale Gentransfervektoren

Retroviren sind RNA-Viren, deren charakteristisches Merkmal der umgekehrte Informationsfluss von RNA zu DNA ist. Nach Infektion einer Wirtszelle wird das virale RNA-Genom mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben und anschließend stabil in das Wirtsgenom eingebaut. Die Expression der viralen Gene erfolgt durch die wirtseigene Transkriptionsmaschinerie.

Die Familie der *Retroviridae* wird in 2 Unterfamilien (*Ortho- und Spumaretrovirinae*) unterteilt, die wiederum aus 7 Gattungen bestehen. Der einzige Vertreter der *Spumaretrovirinae* ist die Gattung der Foamyviren, welche insbesondere aufgrund ihrer Apathogenität und der großen genetischen Verpackungskapazität als Basis für therapeutische Vektoren geeignet sind (Coffin et al., 1997; Modrow et al., 1997). Zu den *Orthovirinae* gehören die einfachen Alpha-, Beta-, Gamma- und Epsilonviren, sowie die komplexen Delta- und Lentiviren. Das Murine Leukämie Virus (MLV) und das Humane Immundefizienz Virus (HIV) sind Basis für die am häufigsten verwendeten retroviralen Vektoren in der Gentherapie.

## Organisation des retroviralen Genoms

Die infektiösen Viruspartikel der Retroviren, die sogenannten Virionen, enthalten ihre genetische Information auf zwei identischen (+)Strang-orientierten RNA-Molekülen, umgeben von einem Kapsid und einer Virushülle. Das lineare RNA-Genom besitzt wie die zelluläre mRNA ein 5'-Cap und einen Poly(A)Schwanz am 3'-Ende. Die Replikation der Retroviren findet über ein doppelsträngiges DNA-Intermediat (Provirus) statt, welches durch reverse Transkription und Integration in das Wirtsgenom entsteht. Das Provirus beinhaltet in allen Retroviren die drei Gene *gag*, *pol* und *env*, die von den ‚Long Terminal Repeats‘ (LTRs) flankiert werden. Die LTRs sind an beiden Seiten identisch und bestehen aus den Regionen U3, R und U5. Während die R Region (‚Redundant‘) auch im RNA-Genom an beiden Enden vorhanden ist, existieren die U3 (‚Unique 3‘) und die U5 (‚Unique 5‘) Regionen nur an dessen 3‘- bzw. 5‘-Ende und werden erst im Zuge der reversen Transkription dupliziert (**Abbildung 1.2**). Die U3 Region enthält Promotor- und Verstärkerelemente, die die Transkription der viralen Gene steuern. In der R-U5 Region sind Signale zur Termination und Polyadenylierung lokalisiert. Da diese Signale im Provirus an beiden Enden vorhanden sind, entwickelten sich im Laufe der Zeit verschiedene Mechanismen, um eine frühzeitige Termination der Transkription im 5‘-LTR zu verhindern. Gammaretroviren besitzen nur sehr schwache Terminationssignale, die leicht überlesen werden, so dass genügend Transkripte voller Länge entstehen. In der U3 Region lokalisierte Sequenzen verstärken die Signale im 3‘-LTR, so dass ein Großteil der Transkripte dort polyadenyliert wird (Furger et al. 2001). Auch Lentiviren besitzen zusätzliche Terminationssignale in der U3 Region (Yang et al. 2007). Die effektiveren lentiviralen Terminationssignale machten zudem weitere Elemente zur Unterdrückung der Signale im 5‘-LTR erforderlich, unter anderem die Hauptspleißdonorstelle (Ashe et al. 1995) stromabwärts des 5‘-LTRs sowie weitere Sequenzen zwischen dem 5‘-Cap und der Poly(A)Stelle (Furger et al. 2001). Im Anschluss an den 5‘-LTR befindet sich die Primerbindungsstelle, an der die reverse Transkription durch Bindung einer zellulären tRNA initiiert wird, sowie das in *cis* agierende Verpackungssignal  $\psi$  ( $\psi$ ). Im 3‘-Bereich des Provirus ist der Polypurintrakt (PPT) zu finden, durch dessen Spaltung ein RNA-Primer für die Synthese des viralen Plusstrangs gebildet wird. Die Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für die internen Strukturproteine, aus denen die Matrix, das Kapsid und das Nukleokapsid aufgebaut sind (*gag*), die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase (*pol*) und die viralen Hüllproteine (*env*). Komplexe Retroviren wie HIV besitzen zusätzlich zu diesen Genen sogenannte akzessorische Gene, die zur Regulation der Synthese und Prozessierung der viralen RNA beitragen (Greene et al., 1990; Cullen, 1992; Lee et al., 1993).



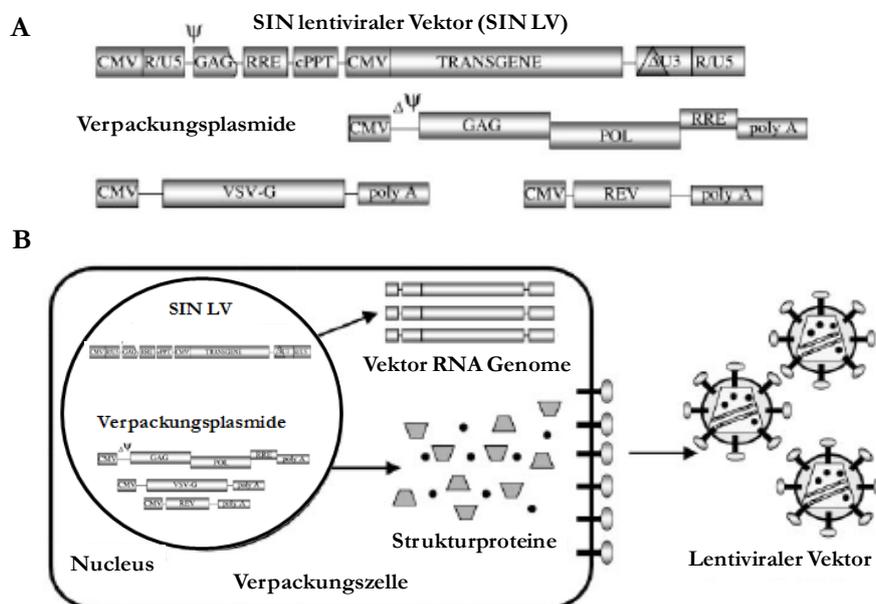
**Abbildung 1.2: Genomorganisation einfacher Retroviren.** (A) Anordnung im RNA-Genom aller Retroviren vorhandenen Elemente und Gene. Das RNA-Genom ist mit einer 5'-Cap-Gruppe sowie einem 3'-Poly(A)Schwanz versehen. An die Primerbindungsstelle ist eine tRNA gebunden, durch die die Transkription initiiert wird. Die mRNA zur Expression des *Env*-Proteins entsteht durch Spleißen an den gekennzeichneten Stellen. (B) Anordnung der Sequenzelemente und offenen Leserahmen im Genom des Provirus nach reverser Transkription und Integration in das Wirtsgenom. LTR („Long Terminal Repeat“) kennzeichnet die Anordnung jener Sequenzelemente, die im Verlauf der reversen Transkription gebildet werden. Die für Proteine kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt.  $\psi$ , Verpackungssequenz; R, wiederholte (redundante) Region; U3 und U5, einzigartige („unique“) Region am 3'-bzw. 5'-Ende; PBS, Primerbindungsstelle; PPT, Polypurintrakt. Modifiziert aus Modrow und Falke (1997).

## Entwicklung Retroviraler Vektoren

Die einfachen Gammaretroviren waren eine der ersten Virusgattungen, die zur Entwicklung retroviraler Vektoren verwendet wurden. Die geläufigsten gammaretroviralen Vektoren basieren auf MLV (Nathwani et al., 2005; Flotte, 2007). Im Gegensatz zu MLV-basierten Vektoren, die nur sich in Teilung befindende Zellen infizieren können, sind von HIV-1 abgeleitete lentivirale Vektoren auch in der Lage ruhende Zellen zu infizieren. Die hohe Komplexität der Lentiviren gestaltet die Entwicklung lentiviraler Vektoren deutlich schwieriger, so dass diese erst später zum Einsatz kamen.

Zur Herstellung replikationsdefizienter retroviraler Vektoren werden die viralen Gene weitestgehend deletiert und durch das gewünschte Transgen ersetzt, welches von einem exogenen Promotor exprimiert wird. Um eine effiziente Transduktion der Zielzellen zu gewährleisten, werden virale in *cis* agierende Elemente, die für die Verpackung, reverse Transkription und Integration notwendig sind, intakt gelassen. Der Transfervektor enthält neben dem Transgen somit das Verpackungssignal  $\psi$ , einen Teil des *gag*-Gens, die Primerbindungsstelle und die beiden LTRs (Miller et al. 1989). In lentiviralen Vektoren werden zudem das ‚*rev* responsive element‘ (RRE) und der zentrale PPT (cPPT) für die Transduktion benötigt. Das RRE

bindet das in *trans* zur Verfügung gestellte Protein *rev* und stellt den effizienten Export des ungespleißten RNA Genoms aus dem Nucleus sicher (Naldini et al. 1996). Der cPPT verbessert den nuklearen Import der proviralen DNA und beschleunigt dadurch die Transduktion (Follenzi et al. 2000). Um hohe Vektortiter zu erhalten, wurde die 5'-U3 durch den starken Promotor des ‚Cytomegalovirus‘ (CMV) ersetzt (Finer et al. 1994). Zur Produktion infektiöser replikationsdefizienter Viruspartikel wird eine Verpackungszelllinie benötigt, die die nötigen Strukturproteine bereit stellt. Um das Risiko der Entstehung replikationskompetenter Vektoren durch homologe Rekombination zu vermindern, werden die Proteine *gag-pol* und *env* in den Verpackungszelllinien der neuesten Generation von separaten Plasmiden exprimiert (Danos et al. 1988). Für die Produktion lentiviraler Partikel wird zudem ein Plasmid benötigt, welches das *rev* Protein exprimiert. Zuletzt erfolgt die Pseudotypisierung. Um einen breiten Wirtstropismus zu gewährleisten, werden die retroviralen Hüllproteine meist gegen das Glykoprotein G des ‚Vesicular Stomatitis Virus‘ (VSV-G) ausgetauscht (Naldini et al. 1996). Pseudotypisierung mit dem Hüllprotein des ‚Gibbon Ape Leukemia Virus‘ (GALV) ermöglicht wiederum die effiziente Transduktion von HSCs und ist daher besonders interessant für die Gentherapie hämatopoetischer Defekte (von Kalle et al. 1994).



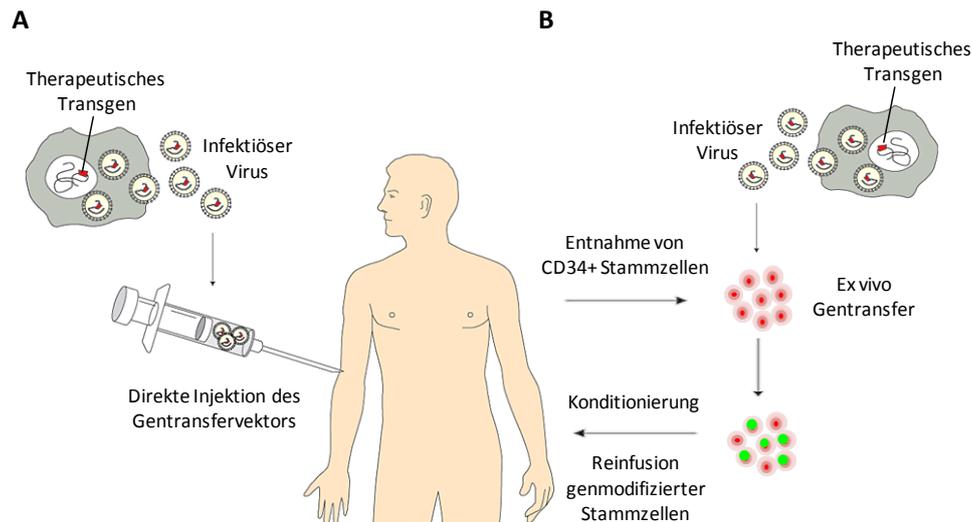
**Abbildung 1.3: Produktion infektiöser retroviraler Viruspartikel.** (A) Vektorkonstrukte zur Produktion lentiviraler Viruspartikel. Der SIN lentivirale Vektor stellt den Gentransfervektor dar, der das Transgen trägt und in die Zellen eingebracht werden soll. Um die Gefahr der Entstehung replikationskompetenter Viren durch Rekombination zu minimieren, werden die viralen Struktur- und Regulatorproteine von separaten Plasmiden zur Verfügung gestellt. (B) Produktion lentiviraler Viruspartikel mit einer Verpackungszelllinie. Nur der Gentransfervektor SIN LV enthält das RRE für den effektiven Export des ungespleißten RNA Genoms sowie ein funktionierendes Verpackungssignal, so dass nur dieses Konstrukt verpackt wird. CMV, Promotor des ‚Cytomegalovirus‘;  $\psi$ , Verpackungssequenz; R, wiederholte (redundante) Region; U3 und U5, einzigartige (‚unique‘) Region am 3'-bzw. 5'-Ende;  $\Delta$ U3, deletierte U3; RRE, ‚Rev Responsive Element‘; cPPT, zentraler Polypurintrakt; GAG, POL und REV, virale Struktur- und Regulatorgene; VSV-G, ‚Vesicular-Stomatitis-Virus Glykoprotein G‘; polyA, Polyadenylierungssignal. Modifiziert aus Koostra und Verma (2003).

### 1.3 Somatische Gentherapie

Das Ziel der Gentherapie ist die Heilung oder Linderung einer Krankheit durch den Transfer genetischen Materials in die Zellen des Patienten. Dabei kann es sich um den Ersatz eines defekten Gens mit einer funktionellen Kopie (Substitutionstherapie, z.B. bei monogenetischen Erbkrankheiten), die Verstärkung einer physiologischen Genfunktion (Additionstherapie, z.B. in der Immunabwehr bei Infektionskrankheiten und Krebs) oder die Unterdrückung pathogener Genaktivitäten (Suppressionstherapie, z.B. bei Virusinfektionen) handeln. Basierend auf dem behandelten Zelltyp wird zwischen Keimbahn- und somatischer Gentherapie unterschieden. Bei der Keimbahngentherapie werden Geschlechtszellen (Keimzellen) modifiziert, wodurch die genetischen Veränderungen an die Nachkommen weitergegeben werden. Die Keimbahngentherapie kam bislang noch nicht zur klinischen Anwendung, da das Embryonenschutzgesetz künstliche Veränderungen der Erbinformation in den Keimzellen verbietet (Fuchs 2006). Genetische Modifikationen somatischer Zellen (Körperzellen) werden dagegen nicht vererbt und die somatische Gentherapie findet seit Anfang der 1990er Jahre breite Anwendung bei der Krebstherapie (Gutierrez et al. 1992), der Bekämpfung von Infektionskrankheiten (Bunnell et al. 1998) und der Korrektur von Erbkrankheiten (Anderson 1984, Friedmann 1992, Scollay 2001, Seth 2005, Fischer et al. 2008).

#### 1.3.1 Grundprinzip der Gentherapie

Zur Korrektur eines genetischen Defekts kann die somatische Gentherapie entweder *in vivo* oder *ex vivo* erfolgen. Bei einer Anwendung *in vivo* wird der für das therapeutische Gen kodierende Vektor direkt in den Organismus injiziert. Hierbei besteht die Möglichkeit einer lokalen Applikation, bei der die Injektion direkt in das Zielorgan erfolgt, oder einer systemischen. Bei der systemischen Applikation wird der Vektor in die Blutbahn eingebracht, womit eine Verbreitung über den gesamten Blutkreislauf erreicht wird. Bei der *ex vivo* Gentherapie findet der Gentransfer außerhalb des Körpers statt. Dazu werden Zellen des Patienten entnommen, *ex vivo* transduziert, aufgereinigt und anschließend rücktransplantiert. Diese Art der Anwendung ist für die Behandlung von Krankheiten des hämatopoetischen Systems besonders geeignet. Die seltenen, mitotisch wenig aktiven hämatopoetischen Stammzellen können so vor der Transduktion angereichert und prästimuliert werden, um die Effizienz des Gentransfers zu erhöhen. Darüber hinaus kann die Dosis für die Anwendung besser kontrolliert und überschüssiger Vektor entfernt werden. Um ein 'Engraftment' der behandelten Zellen zu gewährleisten, kann vor der Rücktransplantation eine Konditionierung des Patienten erfolgen. Dabei werden körpereigene Zellen zerstört, um Nischen für die genetisch korrigierten Zellen zu schaffen.



**Abbildung 1.4: Prinzip der Gentherapie.** (A) *In vivo* Gentherapie. Der Gentransfervektor mit dem therapeutischen Gen wird direkt in den Organismus injiziert. Die Applikation kann systemisch über den Blutkreislauf oder lokal in das gewünschte Organ erfolgen. (B) *Ex vivo* Gentherapie hämatopoetischer Stammzellen. Blutstammzellen (CD34+) werden z.B. durch Gabe von G-CSF in das periphere Blut des Patienten mobilisiert, mittels Leukapherese entnommen und isoliert. Die Modifikation der Zellen erfolgt *ex vivo*. Nach einer Qualitätskontrolle der aufgereinigten Zellen und eventueller Konditionierung des Patienten werden die genmodifizierten Zellen reinfundiert. Genmodifizierte Zellen sind grün markiert. G-CSF, ‚Granulocyte-Colony Stimulating Factor‘.

### 1.3.2 Retrovirale Gentherapiestudien

Die erste Genmarkierungsstudie unter Verwendung eines retroviralen Vektors wurde 1989 mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten zur Immunotherapie maligner Melanome durchgeführt (Rosenberg et al. 1990). Seither wurden weltweit über 1800 klinische Gentransferstudien initiiert, in denen überwiegend virale Vektoren verwendet wurden, darunter hauptsächlich adeno- (23,2%) und retrovirale Vektoren (19,9%). Lentivirale Vektoren sind zu einem großen Teil noch in der Entwicklungsphase, so dass bislang erst 55 Studien (3%) mit diesem Vektortyp initiiert wurden. Die am häufigsten gentherapeutisch behandelten Indikationen sind Krebserkrankungen (64,4%), monogenetische Erbkrankheiten (8,7%), kardiovaskuläre Erkrankungen (8,4%) und Infektionskrankheiten (8%). Die Gentherapie ist eine relativ neue Behandlungsmethode und befindet sich zurzeit noch in einem experimentellen Stadium. Dies spiegelt sich in den Phasen der bislang durchgeführten klinischen Studien wider. Die Mehrzahl der genehmigten Gentherapiestudien sind klinische Phase I oder I/II Studien (78,6%), die zur Testung der Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit der Vektoren dienen. 21,2% der Studien befinden sich in den Phasen II bis III, deren Ziel die Findung der geeigneten Dosis, der Nachweis einer signifikanten Wirkung des Medikaments und dessen Marktzulassung sind. Nur 0,1% (n=2) sind in Phase IV, die zur Feststellung sehr seltener Nebenwirkungen bereits zugelassener Arzneimittel in großen Patientengruppen dient. (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>; Stand Dezember 2012).

Die erstmalige Zulassung eines genterapeutischen Arzneimittels erfolgte in China im Jahr 2000. Es basiert auf einem adenoviralen Vektor und wird zur Behandlung von Hals- und Kopftumoren eingesetzt. Die zugrundeliegenden Daten für diese Zulassung sind außerhalb Chinas jedoch sehr umstritten und es liegen nur wenige Informationen darüber vor (Peng 2005). Das erste Gentherapie-Medikament der westlichen Welt wurde erst kürzlich im November 2012 für die Behandlung der seltenen Lipoproteinlipase-Defizienz mithilfe eines AAV Vektors genehmigt. Retrovirale Vektoren wurden aufgrund verschiedener Schwierigkeiten bisher noch nicht als Arzneimittel zugelassen. In den frühen retroviralen Studien zur Behandlung hämatopoetischer Erkrankungen konnten zunächst keine therapeutischen Effekte erzielt werden, da die Transduktionseffizienz des Gentransfers in HSC zu gering war. Die ersten dauerhaften Therapieerfolge konnten bei der Behandlung der X-chromosomalen Form des schweren kombinierten Immundefekts („Severe Combined Immunodeficiency“, X-SCID) mit einem gammaretroviralen Vektor verzeichnet werden. In zwei in Frankreich und England durchgeführten X-SCID Gentherapiestudien konnten bislang 19 von 20 Patienten erfolgreich behandelt werden (Cavazzana-Calvo et al. 2000, Aiuti et al. 2002, Hacein-Bey-Abina et al. 2002, Gaspar et al. 2004, Hacein-Bey-Abina et al. 2010). Weitere Erfolge mit gammaretroviralen Vektoren wurden bei der Gentherapie des hereditären Adenosin-Desaminase-Mangels (ADA-SCID) (Aiuti et al. 2002, Gaspar et al. 2006, Aiuti et al. 2009), der X-chromosomalen Form der Septischen Granulomatose (X-CGD) (Ott et al. 2006, Bianchi et al. 2009, Kang et al. 2010, Kang et al. 2011) und des Wiskott-Aldrich-Syndroms (WAS) (Boztug et al. 2010) erzielt. Bedeutende Rückschläge erlitt die retrovirale Gentherapie durch das Auftreten schwerer Vektor-induzierter Nebenwirkungen, woraufhin es 2002 und 2005 (nach Wiederaufnahme 2004) zu einem Stopp laufender Gentherapiestudien mit retroviralen Vektoren kam (Check 2002, Check 2005).

Die erste lentivirale Gentherapiestudie wurde 2006 zur Behandlung der Adrenoleukodystrophie (X-ALD) initiiert. In dieser Studie wurde ein Fortschreiten der Krankheit durch den lentiviralen Gentransfer in 2 Patienten erfolgreich aufgehalten, in einem Patienten hat die Therapie nicht angeschlagen. Bei einem weiteren Patienten kann aufgrund der kurzen Beobachtungszeit seit Durchführung der Gentherapie bislang keine definitive Aussage getroffen werden, die Prognose ist jedoch positiv (Cartier et al. 2009, Vortrag Cartier et al. DG-GT 2013 und persönliche Kommunikation mit C. Bartholomä). Durch die lentivirale Gentherapie eines  $\beta$ -Thalassämie-Patienten, der seit frühester Kindheit auf Bluttransfusionen angewiesen war, wurde eine Verbesserung seines Zustandes erreicht, so dass er seit Monat 9 nach Gentherapie keine weiteren Transfusionen benötigt (Cavazzana-Calvo et al. 2010). Kürzlich initiierte lentivirale Gentherapiestudien zur Metachromatischen Leukodystrophie (MLD) und WAS zeigen eine stabile Genmarkierung über 6 Monate (jeweils 1 Patient) (Corrigan-Curay et al. 2012).

## 1.4 Biologische Sicherheit der retroviralen Gentherapie

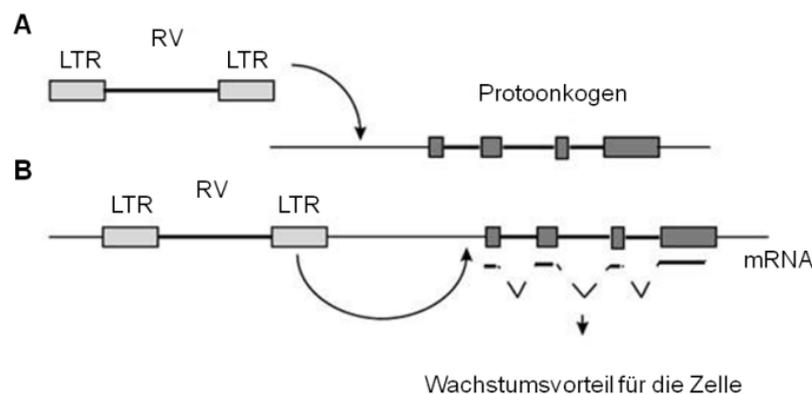
Die retrovirale Gentherapie ist für Patienten, bei denen Standardtherapien nicht (mehr) anschlagen, es keine Möglichkeiten einer Heilung gibt oder ein passender Spender für eine Knochenmarkspende fehlt, eine sehr vielversprechende Alternative. Sie ermöglicht die dauerhafte Korrektur des zugrundeliegenden Defekts unter Verwendung der körpereigenen Zellen. Die Modifikation autologer Zellen hat gegenüber der allogenen Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation den Vorteil, dass es nicht zu einer Abstoßung der transplantierten Zellen oder einer immunologischen Reaktion des Transplantats gegen den Wirt („Graft-versus-Host-Disease“, GvHD) kommen kann.

Effiziente und sichere Methoden sind die Grundvoraussetzungen für die therapeutische Anwendung der somatischen Gentherapie. Die Sicherheit des retroviralen *ex vivo* Gentransfers in HSC ist von zahlreichen Faktoren auf unterschiedlichen Ebenen der genetischen Manipulation abhängig, angefangen bei der Isolation und Kultur der hämatopoetischen Zellen *in vitro* bis hin zum Transplantationsprotokoll (Baum et al. 2003). Einer der Hauptfaktoren ist dabei die Genotoxizität, die durch die Integration des Gentransfervektors in das Wirtsgenom verursacht wird. Dadurch kann es zu Änderungen der zellulären Genexpression kommen, die das Wachstum der Zelle beeinflussen und zur malignen Transformation führen können (Insertionsmutagenese). Das Risiko einer vektorinduzierten Insertionsmutagenese durch replikationsdefiziente Vektoren wurde aufgrund der monoallelischen Integration und der Annahme einer zufälligen Verteilung der Integrationsereignisse im Genom zunächst als gering eingestuft (Cornetta et al. 1991, Moolten et al. 1992, Stocking et al. 1993). Das gehäufte Auftreten vektorinduzierter maligner Transformationen *in vitro* (Du et al. 2005, Modlich et al. 2006) als auch zum Teil schwerer Nebenwirkungen in präklinischen (Calmels et al. 2005, Kustikova et al. 2005) und klinischen (Hacein-Bey-Abina et al. 2003, Schmidt et al. 2003, Stein et al. 2010) Gentherapiestudien offenbarte jedoch das hohe genotoxische Potential retroviraler Vektoren und die Notwendigkeit die Sicherheit des retroviralen Gentransfers zu erhöhen.

### 1.4.1 Nebenwirkungen des retroviralen Gentransfers

Der Ausgang der Gentherapie wird durch die zugrundeliegende Krankheit, den verwendeten Gentransfervektor und den transduzierten Zelltyp beeinflusst. Bei der T-Zell-basierten Suizidgentherapie wird ein suizidales Gen durch retroviralen Gentransfer in ausgereifte Donor-T-Zellen eingebracht, die dadurch sensitiv gegenüber einem ansonsten unschädlichen Wirkstoff gemacht werden. Dies ermöglicht die Kontrolle einer eventuellen GvHD nach allogener Stammzelltransplantation durch Verabreichung dieses Wirkstoffs. Bei mehreren klinischen Phase

I/II Studien zur T-Zell-basierten Suizidtherapie, in denen insgesamt über 200 Patienten therapiert wurden, wurde bisher keine vektorinduzierte klonale Expansion oder maligne Transformation der behandelten Zellen beobachtet (Cattoglio et al. 2010, Lupo-Stanghellini et al. 2010). Auch zeigten klinische retrovirale Gentherapiestudien zur genetischen Korrektur der ADA-SCID von insgesamt 40 Patienten bislang keine unerwünschten Nebenwirkungen (Cavazzana-Calvo et al. 2012). Jedoch ist die Integration retroviraler Vektoren *per se* ein mutagenes Ereignis. Das Risiko einer malignen Transformation wird vor allem von der genomischen Lokalisation und dem Vektordesign des therapeutischen Vektors bestimmt. Verschiedene Virustypen weisen unterschiedliche Integrationspräferenzen auf. Die Integration gammaretroviraler Vektoren findet bevorzugt um den Transkriptionsstartpunkt („transcription start site“, TSS) von Genen statt (Wu et al. 2003), wodurch sie ein erhöhtes Risiko zur Deregulation zellulärer Gene aufweisen. Im Falle einer Integration in der Nähe von Protoonkogenen kann eine Aktivierung oder Überexpression des betroffenen Gens zu einem Wachstumsvorteil für die Zelle führen oder sogar zur malignen Transformation (**Abbildung 1.5**).



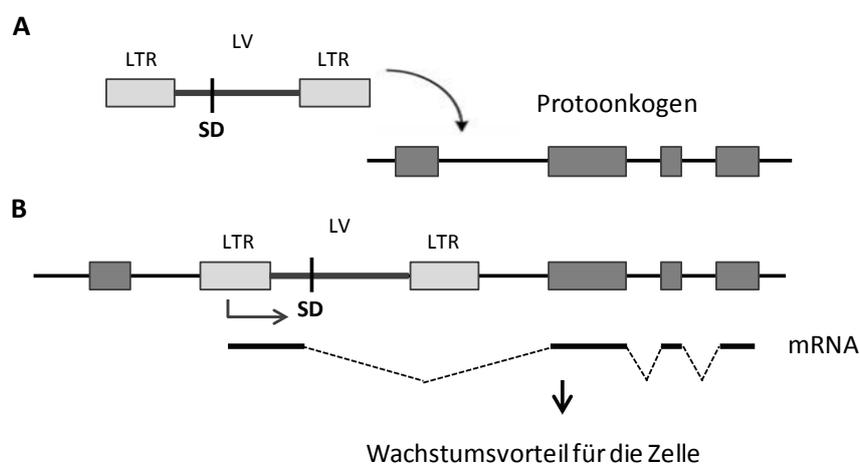
**Abbildung 1.5: Protoonkogen-Aktivierung durch Insertionsmutagenese.** (A) Ein retroviraler Vektor integriert in der Nähe eines nicht transkribierten Protoonkogens in das Genom. (B) Die Transkription des Protoonkogens wird durch die Integration des retroviralen Vektors induziert. LTR ‚Long Terminal Repeat‘; RV, retroviraler Vektor; mRNA, ‚messenger RNA‘. Modifiziert aus Dickson et al. (2000).

Im Rahmen einer Genmarkierungsstudie wurden erstmals Nebeneffekte des retroviralen Gentransfers *in vivo* beobachtet. Die insertionelle Aktivierung des Protoonkogens *Evi1* löste eine murine Leukämie aus (Li et al. 2002). Kurz darauf folgte der erste Bericht schwerer Nebenwirkungen in einer klinischen X-SCID Gentherapiestudie (Check 2002, Hacein-Bey-Abina et al. 2003). Die gentherapeutische Behandlung der X-SCID führte insgesamt bei 5 von 19 erfolgreich behandelten Kindern zu einer unkontrollierten klonalen Expansion genkorrigierter lymphoider Zellen (Hacein-Bey-Abina et al. 2003, Hacein-Bey-Abina et al. 2008, Howe et al. 2008). Vier dieser Patienten trugen eine Integration in oder in der Nähe des Protoonkogens

*LMO2*, die zu dessen Überexpression und der Transformation der betroffenen Zellen führte. Der dominante Klon des fünften Patienten trug eine Integration in dem Protoonkogen *CCND2*. Bei allen Patienten wurden weitere genetische Veränderungen wie Deletionen und Translokationen beobachtet (Deichmann et al. 2007, Schwarzwaelder et al. 2007, Hacein-Bey-Abina et al. 2008, Howe et al. 2008).

Auch bei der Gentherapie des WAS entwickelten 5 von 9 erfolgreich behandelten Patienten eine akute lymphatische Leukämie (T-ALL) durch Vektorinsertionen stromaufwärts von *LMO2* und *CCND2* sowie weiterer T-ALL-typischer genetischer Mutationen wie TCR Translokationen und Deletionen der Tumorsuppressoren *CDKN2A* und *CDKN2B*. Zudem wurden Klone mit Integrationen in den Genen *MDS1/EVI1* und *PRDM16* gehäuft detektiert (Persons et al. 2011, Corrigan-Curay et al. 2012 und A. Paruzynski, persönliche Kommunikation). Zellklone mit Vektorintegraten in *MDS1/EVI1* und *PRDM16* waren im Rahmen einer klinischen Gentherapiestudie zur Behandlung der X-CGD bei der Entstehung schwerer Nebenwirkungen von zentraler Bedeutung (siehe **Abschnitt 1.5.3**).

Bei lentiviralen Vektoren findet die Integration bevorzugt in genkodierenden Bereichen statt (Schroder et al. 2002). Das Risiko einer Verstärker/Promotor-vermittelten Aktivierung ist insbesondere mit lentiviralen selbst-inaktivierenden (SIN-) Vektoren (siehe **Abschnitt 1.4.2**) deutlich geringer als mit LTR-getriebenen gammaretroviralen Vektoren, jedoch könnte ein erhöhtes Risiko zur posttranskriptionellen Deregulation zellulärer Gene bestehen. Beispiele hierfür sind der frühzeitige Abbruch der Transkription durch die viralen Terminationssignale oder die Bildung viral-zelluläre Fusionstranskripte durch aberrantes Spleißen (**Abbildung 1.6**).



**Abbildung 1.6: Protoonkogen-Aktivierung durch Insertionsmutagenese lentiviraler Vektoren. (A)** Ein lentiviraler Vektor integriert in ein nicht transkribiertes Protoonkogen im Wirtsgenom. **(B)** Die Transkription wird im LTR des Provirus initiiert und läuft ins Wirtsgenom weiter. Durch aberrantes Spleißen unter Verwendung viraler und zellulärer Spleißstellen entsteht ein chimäres Fusionstranskript. LTR: ‚Long Terminal Repeat‘; LV: lentiviraler Vektor; SD: Spleißdonor; mRNA, ‚messenger RNA‘.

Das initiale Ereignis bei der Bildung vektorinduzierter viral-zellulärer Fusionstranskripte ist das Überlesen der viralen Terminationssignale, so dass die Transkription der Virus-DNA in genomische Regionen fortgesetzt wird („Readthrough“-Transkription). Die Aktivität und Effektivität dieser Signale ist in HIV-1 unter anderem vom kanonischen Spleißdonor (Ashe et al. 1995) sowie Sequenzen in den lentiviralen Verstärker/Promotorelementen der U3 (Yang et al. 2007) abhängig. Die Deletion der U3 in SIN-Vektoren führte in Lentivirus-basierten Vektoren daher zu einer Abschwächung der Signale und zur vermehrten „Readthrough“-Transkription.

Bokhoven et al. zeigten in einem *in vitro* Genotoxizitätstest, dass die Bildung chimärer Fusionstranskripte den Hauptmechanismus der lentiviral vermittelten Genotoxizität darstellt (Bokhoven et al. 2009). In einem *in vivo* Mausmodell trug die Bildung eines chimären Transkripts mit dem zellulären Protoonkogen *Braf* zur Genotoxizität eines LTR-getriebenen lentiviralen Vektors bei (Montini et al. 2009). In einer weiteren Studie verursachte die Bildung viral-zellulärer Transkripte eine verminderte Expression des vollständigen Transkripts von *Ebfl*, wodurch sich eine akute B-Zell akute lymphoblastische Leukämie (B-ALL) entwickelte (Heckl et al. 2012). Ähnliche aberrante Spleißereignisse wurden in einer lentiviralen Gentherapiestudie zur Behandlung der  $\beta$ -Thalassämie beobachtet. Hierbei führte die Fusion des SIN-lentiviralen Gentherapievektors mit dem zellulären Gen *HMG A2* zur Expression eines verkürzten Transkripts, durch das eine benigne klonale Expansion der Zellen ausgelöst wurde (Cavazzana-Calvo et al. 2010). Zu einer malignen Transformation kam es in diesem Fall bislang nicht.

#### 1.4.2 Sicherheitsoptimierung retroviraler Vektoren

Die Befunde präklinischer und klinischer Gentherapiestudien machten deutlich, dass eine Optimierung der retroviralen Vektorsysteme für eine sichere Anwendung dringend notwendig war. Aufgrund der weitreichenden Interaktionen der Verstärker/Promotor-Strukturen zählen diese Elemente zu den häufigsten Auslösern der retroviralen Insertionsmutagenese (Uren 2005; Kustikova 2006). Von essentieller Bedeutung für die retrovirale Gentherapie war daher die Entwicklung von SIN-Vektoren. Hierbei wird ein Großteil der 3'-U3 Region mit den viralen Verstärker- und Promotorsequenzen deletiert. Durch den Prozess der reversen Transkription wird diese Deletion auf den 5'-LTR übertragen, so dass die LTR-getriebene Transkription größtenteils verhindert wird. Das Risiko der insertionellen Aktivierung benachbarter zellulärer Protoonkogene wird dadurch deutlich gesenkt (Zufferey et al. 1998). Für die Expression des Transgens wird ein interner Promotor in den Transfervektor eingefügt. Die Verringerung des genotoxischen Potentials retroviraler Vektoren durch SIN-LTRs konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen erfolgreich demonstriert werden (Modlich et al. 2006, Montini et al. 2009).

Starke interne (virale) Promotoren weisen auch im Kontext mit SIN-Vektoren ein erhöhtes genotoxisches Potential auf (Modlich et al. 2008, Modlich et al. 2009). Die Sicherheit SIN-retroviraler Vektoren kann durch die sorgfältige Wahl des Promotors daher weiter verbessert werden. Dazu eignen sich vor allem physiologische Promotoren, die im optimalen Fall ein ähnliches Expressionslevel vermitteln wie das des endogenen Proteins (Zychlinski et al. 2008). Zelltyp-spezifische Promotoren erlauben eine zielgerichtete Expression ausschließlich im gewünschten Gewebe/System. In dieser Art wurden neue Vektoren für die Gentherapie von WAS (Charrier et al. 2007) oder X-CGD (Santilli et al. 2011) entwickelt. Bei anderen Funktionsstörungen, insbesondere bei Enzymdefekten wie sie bei ADA-SCID vorliegen, ist die Behandlung einer Vielzahl verschiedener Organsysteme/Zelltypen erforderlich. Erythrozyten stellen eine Möglichkeit zur systemischen Auslieferung therapeutischer Proteine über den Blutkreislauf dar. Um eine effiziente Behandlung der Krankheit zu gewährleisten, konstruierten Montiel-Equihua et al. einen lentiviralen Vektor, der den konstitutiv aktiven EFS (Elongation factor 1 $\alpha$ , short version) Promotor in Kombination mit Elementen der Kontrollregion des  $\beta$ -Globin-Gens ( $\beta$ -LCR) enthält. Durch das  $\beta$ -LCR Element wird eine erhöhte Transgenexpression spezifisch in erythroiden Zellen erreicht, während durch den EFS Promotor gleichzeitig eine konstitutive Expression des therapeutischen Transgens in allen Zellen bewirkt wird (Montiel-Equihua et al. 2012).

Virale Sequenzen können vom Wirtsorganismus erkannt und durch verschiedene Abwehrmechanismen bekämpft werden. Ein Beispiel hierfür ist die epigenetische Stilllegung des Promotors durch Methylierung (Herbst et al. 2012). Dieser Mechanismus wurde unter anderem in einer klinischen X-CGD Gentherapiestudie beobachtet, wodurch es zum Verlust der Expression des therapeutischen Transgens kam (Stein et al. 2010). Dies kann durch die Verwendung methylierungsresistenter endogener Promotoren verhindert werden (Almarza et al. 2007, Zhang et al. 2010, Santilli et al. 2011).

Eine weitere Maßnahme zur Verhinderung viral-zellulärer Wechselwirkungen ist der Einsatz Chromatin-remodelierender Elemente, wie z.B. genetischer Insulatoren. Diese verhindern sowohl die Aktivierung zellulärer Gene durch die viralen Verstärker- und Promotorelemente („enhancer-blocking activity“) als auch die Stilllegung der Transgenexpressionen („boundary effect“) (Emery 2011). Ein Beispiel ist das HS4 Element aus der  $\beta$ -Globin Lokuskontrollregion des Haushuhns („chicken  $\beta$ -globin locus control region HS4 element“, cHS4)(Chung et al. 1997). Chromatin-öffnende Elemente („Ubiquitously Chromatin Opening Element“, UCOE) vermitteln eine stabile und hohe Transgenexpression, sind resistent gegen DNA Methylierung und besitzen keine Verstärkerelemente, die die Transaktivierung zellulärer Gene verursachen können (Zhang et al. 2007, Zhang et al. 2010). Zusätzliche Vektorelemente bergen aber auch die Gefahr kryptische

Spleißstellen zu enthalten, die zu aberranten Transkripten führen können. Dies war bei der  $\beta$ -Thalassämie-Gentherapiestudie (siehe **Abschnitt 1.4.1**) der Fall, in der ein kryptischer Spleißakzeptor im cHS4 Insulator die Bildung eines verkürzten Transkripts verursachte (Cavazzana-Calvo et al. 2010). Das Auftreten aberranter Spleißprodukte unter Beteiligung des UCOEs wurde durch eine Sequenzoptimierung eliminiert (Müller-Kuller et al. 2012, Knight et al. 2012).

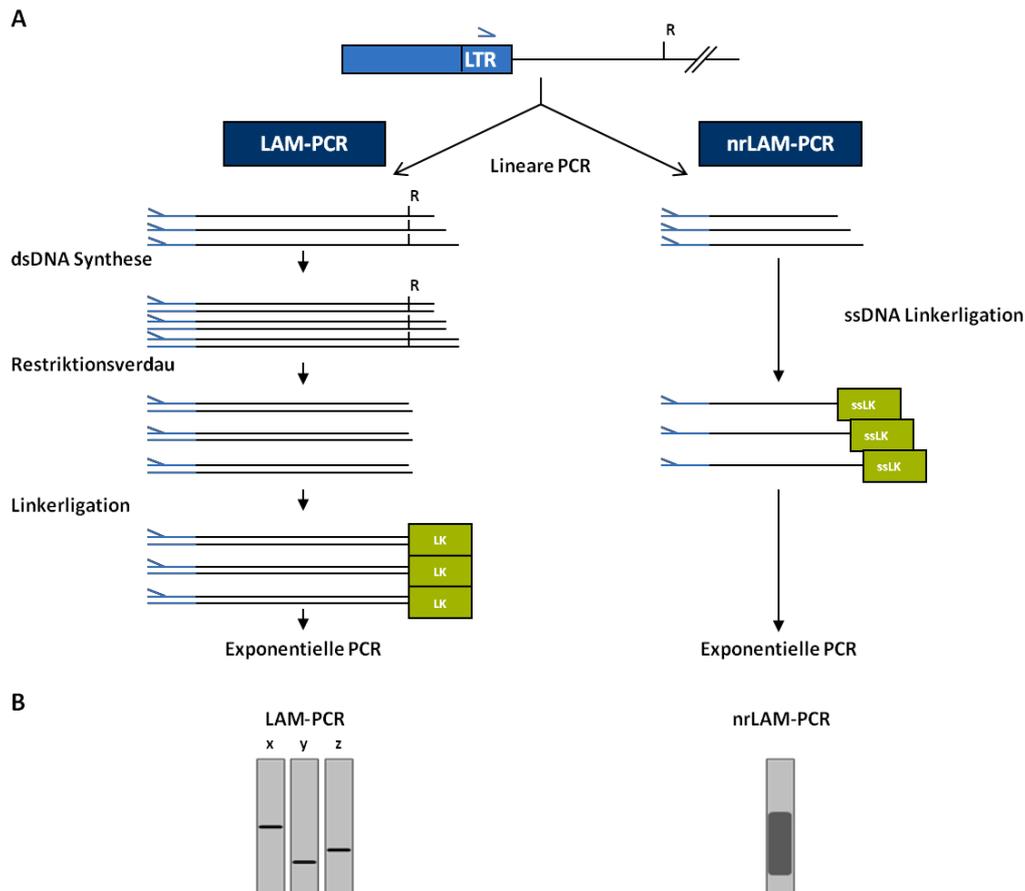
Die gezielte Integration in definierte, vermeintlich sichere genomische Bereiche ist eine weitere Möglichkeit die Genotoxizität retroviraler Vektoren zu senken. Dies kann über eine „Neuprogrammierung“ der viralen Integrase erfolgen, so dass die Integration z.B. bevorzugt in Gen-armen heterochromatischen Bereichen stattfindet (Corrigan-Curay et al. 2012). Zinkfingernukleasen (ZFN) sind synthetisch hergestellte Zinkfingerproteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und mit einer Nukleaseaktivität ausgestattet sind. Durch ihren modulartigen Aufbau können ZFN mit spezifischen Erkennungssequenzen hergestellt werden, die in Kombination mit nicht-integrierenden Vektoren eine zielgerichtete Integration in voraussichtlich sichere Genloki ermöglicht (Gabriel et al. 2011, Lombardo et al. 2011). Eine weitere Möglichkeit für die zielgerichtete Modifikation des Genoms sind TALENs (transcription activator-like effector nucleases) – Fusionsproteine aus der DNA-Bindungsdomäne von TAL-Effektoren und der Endonuklease FokI (Christian et al. 2010, Li et al. 2011) – die auf ähnlich einfache Weise konstruiert werden können, um nahezu jede beliebige DNA-Sequenz zu binden und zu schneiden (Boch 2011).

### 1.4.3 Systeme zur Einschätzung der biologischen Sicherheit retroviraler Vektoren

Die Zulassung neuer Vektoren zur klinischen Anwendung erfordert vielfältige Untersuchungen zur biologischen Sicherheit, Wirksamkeit und Effektivität. Für die Einschätzung der Genotoxizität retroviraler Vektoren wurden in den letzten Jahren mehrere *in vitro* und *in vivo* Systeme entwickelt. *In vitro* Systeme haben den Vorteil eine schnelle und kostengünstige Einschätzung der Vektorgenotoxizität zu liefern. Einer der geläufigsten *in vitro* Ansätze beruht auf der Immortalisierung muriner Knochenmarkzellen (*In Vitro* Immortalization Assay, IVIM Assay). Die Kulturbedingungen in diesem Genotoxizitätstest führen zu einer vermehrten Detektion myeloider Klone, die vor allem durch insertionelle Aktivierung von *Evi1* immortalisiert werden (Modlich et al. 2006). Andere *in vitro* Systeme machen sich die durch Insertionsmutagenese verursachte funktionelle Transformation von Zelllinien zunutze, die auf die Anwesenheit exogen zur Verfügung gestellter Wachstumsfaktoren angewiesen sind. Beispiele hierfür sind die IL-3-abhängigen Zelllinien 32D oder Bcl15, die nach Transduktion mit

genotoxischen Vektoren auf IL-3-unabhängige Kolonien selektiert werden können (Bokhoven et al. 2009, Li et al. 2009). *In vivo* Systeme sind für die Einschätzung der biologischen Sicherheit von besonderer Bedeutung, um mit Hilfe pharmakodynamischer und pharmakokinetischer Untersuchungen die Wirkung gentherapeutischer Vektoren auf den Organismus und *vice versa* observieren zu können. Im *Cdkn2a*<sup>-/-</sup> Mausstamm sind entscheidende Funktionen des RB1- bzw. p53-Signalwegs – wichtigen Regulatoren der Zellproliferation, Seneszenz und Apoptose – beeinträchtigt. *Cdkn2a*<sup>-/-</sup> Mäuse neigen daher zur beschleunigten Tumorentstehung (Sherr 2004) und eignen sich gut zum Vergleich der Genotoxizität verschiedener retroviraler Vektoren durch Insertionsmutagenese (Montini et al. 2006, Montini et al. 2009). Um die Sicherheit und Wirksamkeit neuer Behandlungsmethoden bestimmen zu können, sind in der Präklinik zudem krankheitsspezifische Modelle von hohem Nutzen. So wurde z.B. ein Mausmodell für die X-CGD generiert, bei dem hemizygoten männliche Mäuse mit einem Nullallel des *gp91box* Gens den typischen X-CGD Phänotyp (siehe **Abschnitt 1.5.1**) aufweisen (Pollock et al. 1995).

Ein wichtiger Bestandteil der molekulargenetischen Untersuchungen zur Einschätzung der biologischen Sicherheit ist die Lokalisation der Integrationsstellen im Wirtsgenom. Diese stellen eine einzigartige molekulare Markierung für einzelne Zellen und ihre Nachkommen dar und erlauben die Nachverfolgung einzelner Zellklone der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation. Durch die Analyse der Integrationsstellenverteilung von retroviralen Vektoren im Wirtsgenom können potentiell gefährliche Integrationspräferenzen, wie z.B. die bevorzugte Integration in oder in der Nähe von Protoonkogenen, identifiziert werden. Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms (Lander et al. 2001, International Human Genome Sequencing 2004) und des Genoms verschiedener Modellorganismen (Waterston et al. 2002) ermöglichten die genaue Kartierung von amplifizierten Vektor-Genom-Übergängen. Die am weitesten verbreiteten PCR-basierten Methoden zur Identifikation der Integrationsorte sind die ligationsmedierte PCR (LM-PCR) (Mueller et al. 1989), die inverse PCR (Silver et al. 1989) sowie die hochsensitive lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR) (Schmidt et al. 2007) und die nicht-restriktive (nr)LAM-PCR (Paruzynski et al. 2010). Mit Ausnahme der nrLAM-PCR wird das Genom bei allen Methoden vor der Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge mit Hilfe von Restriktionsenzymen fragmentiert. Die kompetitive Amplifikation verschieden langer Fragmente, die durch die Fragmentierung für einzelne Integrationsklone entstehen, kann eine verzerrte Abbildung des klonalen Inventars zur Folge haben (Gabriel et al. 2009). Die nrLAM-PCR umgeht den Restriktionsverdau durch eine einzelsträngige Ligation (**Abbildung 1.7**) und erlaubt daher eine quantitative Bestimmung der Beiträge einzelner Integrationsklone. Eine Einschränkung ist die herabgesetzte Sensitivität aufgrund der wenig effektiven Einzelstrangligation, so dass deutlich mehr Probenmaterial benötigt wird, um eine umfassende Analyse des klonalen Repertoires zu ermöglichen.



**Abbildung 1.7: Vergleich von LAM-PCR und nrLAM-PCR.** (A) Beide Methoden beginnen mit einer linearen Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge. Bei der LAM-PCR werden die Fragmente nach einer Doppelstrangsynthese mit Restriktionsenzymen verdaut und an die entstehenden überhängenden Enden eine Linkerkassette mit bekannter Sequenz ligiert. Dies ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung der Vektor-Genom-Übergänge. Bei der nrLAM-PCR wird der Restriktionsverdau umgangen indem direkt an die linearen PCR-Produkte ein einzelsträngiger Linker ligiert wird. Die Ligationsprodukte werden in exponentiellen PCR-Reaktionen vervielfältigt. (B) Durch den Restriktionsverdau während der LAM-PCR ist jedes Integrat durch eine charakteristische Fragmentlänge repräsentiert. Nach Gelelektrophorese sind definierte Banden im Agarosegel zu sehen. Die Variablen x, y, z könnten daher dasselbe Integrat analysiert mit unterschiedlichen Enzymen oder unterschiedliche Integrationsstellen analysiert mit demselben Enzym darstellen. Bei der nrLAM-PCR ist hingegen jede Integrationsstelle durch unterschiedlich lange PCR-Produkte repräsentiert. Daher ist nach gelelektrophoretischer Auftrennung ein „Schmier“ auf dem Agarosegel vorhanden. LTR, „long terminal repeat“; dsDNA, doppelsträngige DNA; ssDNA, einzelsträngige DNA; LK, Linkerkassette; R, Restriktionsschnittstelle. Modifiziert aus Gabriel et al. (2010).

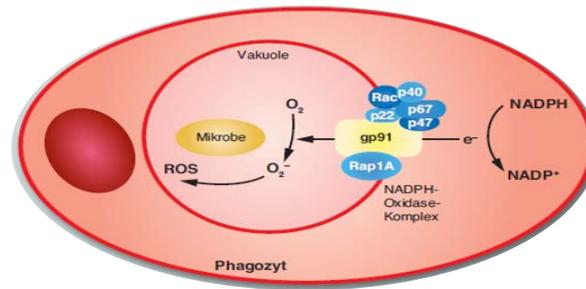
Mit der Entwicklung neuer Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologien wie das 454-System (Roche) oder Illumina (Solexa) können heutzutage tausende Integrationsstellen in nur einem Sequenzierlauf identifiziert werden (Ansorge 2009). In Kombination mit der sensitiven LAM-PCR bzw. der quantitativen nrLAM-PCR können hochauflösende Vektorprofile erstellt werden, die Aufschluss über Unterschiede im Integrationsverhalten und nachfolgende Selektionsereignisse geben können.

## 1.5 Septische Granulomatose

Die Septische Granulomatose („Chronic Granulomatous Disease“, CGD) ist eine seltene vererbte Immundefizienz, die von schweren wiederkehrenden und oftmals lebensgefährlichen Bakterien- und Pilzinfektionen und der Bildung von Granuloma an inneren Organen und auf der Haut geprägt ist. Die Inzidenz der Neuerkrankungen liegt bei 1:200.000 bis 1:250.000 Neugeborenen pro Jahr (Holland 2010, Grez et al. 2011).

### 1.5.1 Krankheitsbild

CGD wird durch Mutationen in einer der Untereinheiten des Nicotinamid-Dinukleotidphosphat-Oxidase-Komplexes (NADPH-Oxidase) verursacht, wodurch die Phagozyten in ihrer Funktion Krankheitserreger zu bekämpfen stark eingeschränkt sind. Die NADPH-Oxidase besteht aus zwei Transmembranproteinen (gp91phox und p22phox) und drei cytosolischen Komponenten (p47phox, p67phox und p40phox). Durch die NADPH-Oxidase werden in Granulozyten und Monozyten reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) gebildet, mit denen phagozytierte Mikroben abgetötet werden (**Abbildung 1.8**). Die häufigste Form der Erkrankung – etwa 65% aller Fälle – wird durch Mutationen in der gp91phox-Untereinheit hervorgerufen (Roos 1994). Sie wird X-chromosomal-rezessiv vererbt (X-CGD), so dass hauptsächlich männliche Patienten von der X-CGD betroffen sind. Die Unfähigkeit der Phagozyten aufgenommene Mikroben abtöten zu können, resultiert in schweren wiederkehrenden bakteriellen Erkrankungen, Entzündungen und Pilzinfektionen. Da die Krankheitserreger innerhalb der Zellen unversehrt bleiben, werden sie – vor äußeren Einflüssen geschützt – durch den gesamten Körper transportiert, wodurch es zu Entzündungen in den verschiedensten Organen kommen kann. Die häufigsten Infektionen werden durch das Bakterium *Staphylococcus aureus* verursacht, währenddessen sind die am weitesten verbreiteten Todesursachen Lungenentzündungen und Sepsis aufgrund von Infekten mit *Aspergillus* Spezies oder *Burkholderia cepacia* (Winkelstein et al. 2000). Neben wiederkehrenden Infektion ist das Krankheitsbild der CGD von überschießenden Entzündungsreaktionen geprägt, die durch erhöhte Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen, fehlerhafte Sekretion von anti-inflammatorischen Signalen durch aktivierte Neutrophile und verminderte Apoptose aktivierter Immunzellen hervorgerufen werden (Brown et al. 2003, Rosenzweig 2008). Die Lebenserwartung von CGD Patienten liegt bei 35 Jahren mit einer jährlichen Sterblichkeitsrate von 2% für autosomal-rezessive CGD und 5% für X-CGD, wobei viele Patienten bereits im Kindesalter sterben (Segal et al. 2000).



**Abbildung 1.8: Abwehr von Mikroben durch Phagozytose.** Der membranständige NADPH-Oxidase-Komplex vermittelt den Elektronentransfer von NADPH auf O<sub>2</sub>, wodurch ROS entstehen. Innerhalb der Phagozytenvakuole können so z.B. Bakterien und Pilze abgetötet werden. Diese angeborene Immunreaktion ist bei CGD-Patienten defekt, aufgrund von Mutationen in den Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes. Daher leiden diese Patienten unter wiederkehrenden lebensbedrohlichen Infektionen. NADPH/NADP<sup>+</sup>, reduzierte und oxidierte Form des Nicotinamid-Dinucleotidphosphats; O<sub>2</sub>, Sauerstoff; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, Hyperoxid; ROS, Reaktive Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“); CGD, „Chronic Granulomatous Disease“. Adaptiert aus Schwäble et al. 2011.

### 1.5.2 Standardtherapie

Die Standardtherapie der CGD ist die prophylaktische Gabe von Antibiotika und Antimykotika sowie von Gamma-Interferon, um Infektionen vorzubeugen. Diese Maßnahmen verbessern die Symptome der Krankheit und steigern die Überlebensrate der Patienten. Lebensbedrohliche und Therapie-resistente Infektionen können zusätzlich mit allogenen Granulozyteninfusionen behandelt werden, wobei bei mehrfacher Gabe die Gefahr einer Immunisierung gegen die fremden Leukozyten-Antigene besteht. Um größere Abszesse und Obstruktionen zu entfernen, können wiederholt chirurgische Eingriffe nötig sein, wobei die beeinträchtigte Wundheilung von X-CGD Patienten zu beachten ist (Seger 2008, van den Berg et al. 2009).

Abgesehen von diesen Maßnahmen, die lediglich die Symptome der Krankheit bekämpfen, besteht die Möglichkeit einer Hämatopoetischen Stammzelltransplantation („Hematopoietic Stem Cell Transplantation“, HSCT), die eine kurative Therapie darstellt. Die Hauptrisikofaktoren bei dieser Therapie sind potentielle zytotoxischen Reaktionen der transplantierten Zellen gegen den Wirtsorganismus (GvHD) und schwere Entzündungsreaktionen im Laufe der Behandlung. Die Erfolgsrate der HSCT ist in den letzten Jahren für Patienten mit passendem humanem Leukozyten-Antigen-System („Human Leukocyte Antigen“, HLA) gestiegen und liegt bei 81% mit einer Sterblichkeitsrate von 15% (Seger et al. 2002).

Viele Patienten verfügen jedoch nicht über einen passenden HLA-Spender. Insbesondere für Patienten, die unter schweren chronischen Infektionen und Therapie-resistenten Entzündungen leiden und keinen passenden Spender haben, ist die Gentherapie autologer Zellen eine geeignete Alternative.

### 1.5.3 Gentherapie der X-CGD

Die X-CGD ist eine monogenetische Krankheit des hämatopoetischen Systems, weshalb sie ein gutes Ziel für die *ex vivo* Gentherapie darstellt. Zudem zeigten Daten von gesunden Trägerinnen, dass bereits ein geringer Anteil funktionierender neutrophiler Granulozyten (5 - 10%) ausreichend ist, um die Symptome der Krankheit zu mindern (Woodman et al. 1995). Es wird angenommen, dass funktionstüchtige Granulozyten keinen Wachstums- oder Selektionsvorteil gegenüber ihren defekten Pendanten haben. In frühen retroviralen X-CGD Gentherapiestudien wurde vor der Infusion der genkorrigierten Zellen keine Konditionierung des Knochenmarks vorgenommen. Trotz anfangs sehr hoher Transduktionseffizienzen wurde in diesen Fällen keine anhaltende Genmarkierung erreicht (Malech 1999, Goebel et al. 2003).

In den letzten Jahren wurden weltweit mehrere gammaretrovirale Gentherapiestudien initiiert, in denen eine Konditionierung mit reduzierter Intensität (nicht-myeloablativ) durchgeführt wurde (Ott et al. 2006, Bianchi et al. 2009, Kang et al. 2010, Kang et al. 2011). Obwohl in allen Studien eine schnelle und dauerhafte Resolution bestehender lebensgefährlicher Infektionen beobachtet wurde, erfolgte auch unter diesen Bedingungen kein signifikantes 'Engraftment' der genkorrigierten Zellen. Die einzigen Ausnahmen waren eine Frankfurter und eine Züricher Studie, in denen 2 Erwachsene (Frankfurt) bzw. 2 Kinder (Zürich) mit einem gammaretroviralen Vektor mit SFFV Promotoren in den LTRs (SF71gp91phox) therapiert wurden. In der Frankfurter Studie wurde während der ersten 5 Monate ein konstanter Anteil genmarkierter Zellen nachgewiesen (ca. 15%), der nach 26 - 36 Monaten auf 50 bzw. 65% anstieg. Dies konnte auf die Expansion myeloider Zellen durch die insertionelle Aktivierung der Protoonkogene *EVI1*, *PRDM16* und *SETBP1* zurückgeführt werden (Ott et al. 2006). Im weiteren Verlauf wurde ein zunehmender Verlust der Expression des therapeutischen Transgens und somit des klinischen Nutzens der Gentherapie festgestellt. Die Stilllegung der Transgenexpression war auf die Hypermethylierung des viralen Promotors zurückzuführen. Währenddessen blieb der virale Verstärker weiter aktiv, so dass die Aktivierung der Protoonkogene aufrecht erhalten wurde. Die Aktivierung von *EVI1* führte schließlich zur klonalen Dominanz und genomischen Destabilisierung, die in die Entwicklung eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) mit Monosomie 7 mündeten. Ein Patient verstarb zweieinhalb Jahre nach Gentherapie an einer schweren Sepsis. Für den zweiten Patienten wurde 45 Monate nach Gentherapie ein passender HLA-Donor für eine allogene Stammzelltransplantation gefunden (Stein et al. 2010). Nach mehreren Rückfällen durch die wiederkehrende klonale Expansion des transformierten *EVI1* Klons und wiederholten Transplantationen verstarb auch dieser Patient (persönliche Kommunikation mit M. Grez). In der Züricher Gentherapiestudie entwickelte eines der Kinder aufgrund eines dominanten *EVI1-STAT3* Klons ein MDS mit Monosomie 7, welches sich Therapie-resistent gegen eine allogene HSCT zeigte. Beim anderen Kind wurde eine

myelo-poetische Expansion eines *MDS1* Klon ohne ein Fortschreiten zu einem MDS beobachtet. Dieser Patient konnte durch eine allogene Stammzelltransplantation geheilt werden (Seger et al. 2012).

#### 1.5.4 Ausblick

Gentherapiestudien der X-CGD zeigten, dass eine Korrektur der Krankheit durch retrovirale Gentherapie prinzipiell möglich ist. Jedoch wurde ein signifikantes 'Engraftment' genkorrigierter Zellen nur in Zusammenhang mit einer Insertionsmutagenese beobachtet. Für zukünftige Anwendungen werden daher Vektoren mit verminderter Genotoxizität und erhöhter und andauernder Effektivität benötigt, um eine sichere und langanhaltende Behandlung ohne schwere Nebenwirkungen zu gewährleisten. Zu diesem Zweck werden zurzeit gammaretro- und lentivirale SIN-Vektoren mit myeloid-spezifischen Promotoren entwickelt und getestet, die in Kombination mit einer intensivierten Konditionierung verwendet werden sollen.

2011 wurde am 'Great Ormond Street Hospital for Children' erstmals ein X-CGD Patient mit einem SIN-lentiviralen Vektor behandelt. Der Patient litt unter lebensgefährlichen therapieresistenten Infektionen, so dass eine Behandlung schnellstmöglich durchgeführt werden musste. Aufgrund der Nicht-Verfügbarkeit eines passenden Spenders war die somatische Gentherapie autologer HSC die einzig mögliche Therapieform. Die Behandlung des Patienten wurde aufgrund der Dringlichkeit nicht im Rahmen einer klinischen Studie mit einem bislang noch nicht zugelassenen lentiviralen Vektor durchgeführt. Das Kodon-optimierte *GP91PHOX* Transgen wird in diesem Vektor von einem chimären myeloid-spezifischen Promotor exprimiert (Santilli et al. 2011).  $CD34^+$  Zellen wurden mittels G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) und Plerixafor mobilisiert und *ex vivo* transduziert. Nach Reinfusion der genkorrigierten Zellen lag die Genmarkierung bei 23%. Kurz nach der Behandlung wurde die Expression des funktionsfähigen *GP91PHOX* Gens und die Wiederherstellung der NADPH-Oxidase-Aktivität hauptsächlich in Granulozyten und Monozyten sowie ein Rückgang bestehender Infektionen und Granulome beobachtet. Die Genmarkierung ging jedoch verloren und lag 6 Monaten nach Therapie unter 0,5%. Die Untersuchung des klonalen Repertoires der genkorrigierten Hämatopoese dieses Patienten ist Bestandteil dieser Arbeit.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Retrovirale Vektoren werden seit mehr als zwei Jahrzehnten erfolgreich in klinischen Gentherapiestudien eingesetzt. Mit dem Auftreten therapieverbundener Leukämien und Myelodysplasien in einzelnen Patienten sind die biologische Sicherheit gentherapeutischer Vektoren sowie deren Optimierung in den Fokus des Interesses gerückt. Krankheiten wie X-CGD stellen eine große Herausforderung für die effiziente und dennoch sichere Gentherapie dar. Für die Erhöhung der biologischen Sicherheit integrierender Vektorsysteme sind die genaue Kenntnis des Integrationsverhaltens verschiedener retroviraler Vektoren und die Entschlüsselung der Auswirkungen einzelner Vektorelemente von höchster Wichtigkeit. In dieser Arbeit wurde die Zielsetzung verfolgt, das Integrations- und Expressionsverhalten neuer integrierender Vektorsysteme zu quantifizieren. Im Einzelnen wurden dabei folgende Fragestellungen untersucht:

1. Woraus besteht das klonale Inventar genkorrigierter Hämatopoese?
2. Welchen Einfluss haben Promotoren und Insulatoren auf das Integrom?
3. Welchen Einfluss haben die Lage und Art der Promotoren auf die Genexpression?

Für die im Folgenden beschriebenen toxikologischen und pharmakokinetischen Analysen neuer SIN-retroviraler Vektoren (gammaretro- und lentiviral) wurden methodische Verbesserungen der (nr)LAM-PCR entwickelt. Es wurde gezeigt, dass bei der Verwendung SIN-gammaretro- und lentiviraler Vektoren für die X-CGD Gentherapie im Gegensatz zu herkömmlichen LTR-getriebenen Vektoren keine vektorvermittelte klonale Selektion stattfand und weniger Integrate in den Protoonkogenen *MDS1/EVI1* detektiert wurden. Durch funktionelle Integromanalysen konnte nachgewiesen werden, dass Promotoren und Insulatoren Einfluss auf das lentivirale Integrationsprofil haben. Die transkriptomweite Charakterisierung vektorinduzierter viral-zellulärer Transkripte zeigte, dass SIN-LTRs und Promotoren bei der Bildung lentiviral induzierter chimärer Transkripte und die dadurch verursachte Deregulation der Genexpression eine maßgebliche Rolle spielen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

Zellen und DNA-Proben aus präklinischen und klinischen Gentherapiestudien zur Untersuchung gammaretroviraler oder lentiviraler Vektoren dienten als Ausgangsmaterial für diese Arbeit und wurden uns freundlicherweise im Rahmen von verschiedenen Kooperationen zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.1 Transduzierte Zelllinien und primäre Zellen

##### DNA aus lentiviral transduzierten HeLa-Zellen

Lentiviral transduzierte HeLa-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Odile Cohen-Haguenaier zur Verfügung gestellt. Die Zellen enthielten HIV-1 abgeleitete insulierte oder nicht-insulierte SIN-Vektoren mit Verstärker- und Promotorelementen des Fr-MuLV („Friend Murine Leukemia Virus“) oder der Phosphoglyceratkinase (PGK), CTCF oder CTF Insulatoren im LTR und das „enhanced Green Fluorescent Protein“ (eGFP) als Transgen. An verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion wurde in unserem Labor DNA aus diesen Zellen isoliert.

##### DNA und RNA aus lentiviral transduzierten ‚Lineage‘ negativen (*lin*-) Zellen

Lentiviral transduzierte ‚Lineage‘-negative (*lin*-) Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Luigi Naldini zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit SIN-lentiviralen Vektoren mit internem SFFV Promotor (SIN.LV.SF), PGK Promotor (SIN.LV.PGK) oder ohne Promotor (LV.W) bzw. mit LTR-getriebenen Vektoren mit leberspezifischem ET-Promotor (LV.WET) oder SFFV Promotor (LV.SF.LTR) transduziert (Montini et al., 2006; Montini et al., 2009). 14, 30, 45 und 60 Tage nach Transduktion wurden in unserem Labor DNA und RNA isoliert.

#### 2.1.2 Präklinisches Material

##### DNA aus einer Serientransplantation gammaretroviral transduzierter *lin*- X-CGD Zellen

DNA von SINfes.gp91s- bzw. SF91eGFP-transduzierten X-CGD Zellen aus einer murinen Serientransplantation wurden uns im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Manuel Grez (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. *Lin*- X-CGD Zellen (X-CGD C57BL/6 CD45.2, (Pollock et al. 1995) wurden in Retronectin-beschichteten Platten an zwei aufeinander folgenden

Tagen transduziert. Nach 7 Tagen *in vitro* Expansion wurden die Zellen in primäre Mäuse (C57BL/6 CD45.1) transplantiert, welchen an verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation Blutproben für die Analyse entnommen wurden. Nach 30 Wochen wurde eine Organentnahme vorgenommen und Blut, Milz und Knochenmarkproben präpariert. Das Knochenmark der primären Rezipienten wurde in sekundäre Rezipienten transplantiert, deren Knochenmark nach 16 Wochen untersucht wurde. Zusätzlich zu den DNA-Proben wurden uns PCR-Produkte der Ligationsmedierten (LM-)PCR zur Analyse der Integrationsstellen zur Verfügung gestellt.

### **DNA aus einer Serientransplantation lentiviral transduzierter *lin*- X-CGD Zellen**

SIN-lentiviral transduzierte X-CGD Zellen einer murinen Serientransplantation zur Untersuchung des pCCL.chim.gp91s.WPRE Vektors wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Adrian Thrasher (University College London, UK) untersucht. Knochenmarkzellen von X-CGD Mäusen (X-CGD C57BL/6 CD45.2 (Pollock et al. 1995) wurden mit dem SIN-lentiviralen Vektor transduziert und jeweils 100.000 Zellen in sublethal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert (C57BL/6 CD45.1; BM 5 - 10). BM 1 - 4 sind sekundär transplantierte Rezipienten, die insgesamt  $1,5 \times 10^7$  Knochenmarkzellen von primär transduzierten Tieren erhielten. DNA aus dem Knochenmark primärer und sekundärer Rezipienten wurde uns im Rahmen dieser Kooperation zur Analyse des Integrationsprofils zur Verfügung gestellt.

### **2.1.3 Patientenmaterial**

#### **Patientenmaterial eines X-CGD Patienten nach lentiviraler Gentherapie (London, UK)**

Die Behandlung eines X-CGD Patienten mit einem lentiviralen Vektor erfolgte in London unter der Leitung von Prof. Dr. Adrian Thrasher und Prof. Dr. Bobby Gaspar im ‚Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust‘. CD34+ Zellen des Patienten wurden *ex vivo* mit einem GALV-pseudotypisierten SIN-lentiviralen Vektor transduziert, welcher die kodonoptimierte cDNA des therapeutischen Transgens *GP91PHOX* unter der transkriptionellen Kontrolle eines internen chimären Promotors (Santilli et al., 2011) enthielt. Die transduzierten Zellen wurden dem Patienten nach nicht-myeloablativer Konditionierung mit Melphalan rücktransplantiert. Prof. Dr. Adrian Thrasher stellte uns freundlicherweise DNA aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC, ‚Peripheral Blood Mononuclear Cells‘) sowie aus neutrophilen Granulozyten dieses Patienten zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden Proben von Tag 21 und 33 (PBMC und Neutrophile) sowie 3 und 6 Monate (Neutrophile) nach Gentherapie untersucht.

## 2.1.4 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Zelllinie	Beschreibung
293T (HEK)	Humane embryonale Nierenzellen, die das ‚SV40 large T-Antigen‘ stabil exprimieren
32D Clone 3	Murine IL-3-abhängige Zelllinie aus dem Knochenmark (myeloid)
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie

## 2.1.5 Oligonukleotide („Primer“)

Die für die Integrationsstellenanalyse und Amplifikation von genomischen Bereichen verwendeten Oligonukleotide sind in den folgenden Abschnitten angegeben. Alle Oligonukleotide wurden HPLC-aufgereinigt bestellt.

Standard-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
Myoglobin	Myo 461-439	5'-CTCCCAGTGGCACAGCAGTTAGG-3'
Myoglobin	Myo 122-143	5'-TGTGCCCCAGGTTTCTCATTTG-3'
Aktin	Actin-1	5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3'
Aktin	Actin-2	5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'
HPRT	HPRT down	5'-GCTGGTGAAAAGGACCTC T-3'
HPRT	HPRT middle rev.	5'-CCAACAACAAACTTGTCTGG-3'
HPRT	HPRT In6 for2	5' GAAGCTGTCTTATTTCTGAATGC-3'
HPRT	HPRT In7 rev2	5' GGGCATCTACTTACAGTCTGG-3'
Vektor-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
LV	SK LTR 1 bio	(B) 5'-GAGCTCTCTGGCTAACTAGG-3'
LV	SK LTR 9 rev	5'-GCTAGAGATTTCCACACTG-3'
LV	SK LTR 2 bio	(B) 5'-GAACCCACTGCTTAAGCCTCA-3'
LV	SK LTR 8 rev	5'-CTAAAAGGGTCTGAGGGATC-3'
GFP	GFP1 for	5'AAACGGCCACAAGTTCAGCG-3'
GFP	GFP2 for	5' GATGCCACCTACGGCAAGCT-3'
GFP	GFP3 rev	5'GTTGTACTCCAGCTTGTGCC-3'
GFP	GFP4 rev	5'TCTTCTGCTTGTTCGGCCATG-3'
gp91s	gp91s-2for	5'- AAAGAGTGCCCCATCCCCAGTTC-3'
gp91s	gp91s-2rev	5'-CGCCCACGATTCTGATGT-3'
RT-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
GFP	GFP1 for	5'AAACGGCCACAAGTTCAGCG-3'
GFP	GFP4 rev	5'TCTTCTGCTTGTTCGGCCATG-3'

qPCR	Name	Sequenz (5'-3')
HPRT	qPCR HPRT 1	5' GAAGCTGTCTTATTTCTGAATGC-3'
HPRT	qPCR HPRT 2	5' GGGCATCTACTTACAGTCTGG-3'
GFP	qPCR GFP 1	5'ACCACATGAAGCAGCACGAC-3'
GFP	qPCR GFP 2	5'GATGTTGCCGTCCCTCTTG-3'
(nr)LAM-PCR	Name	Sequenz (5'-3')
3'-LTR; LV	SK LTR 3 bio	(B) 5'-AGCTTGCTTGAGTGCTTCA-3'
3'-LTR; LV	SK LTR 4(bio)	(B) 5'-AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT-3'
3'-LTR; LV	SK LTR 5(bio)	(B) 5'-GTGTGACTCTGGTAACTAGAG -3'
3'-LTR; LV	SK LTR5 ½	5'-AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT-3'
3'-LTR; LV	FP LV 1 bio	(B) 5'-CAGTGGCGCCCGAACAG-3'
3'-LTR; LV	FP LV 2	5'-GAAAGCGAAAGGGAAACCAG-3'
5'-LTR; SFFV	A1 RV	(B) 5'-CTGGGGACCATCTGTTCTTGGCCTC-3'
5'-LTR; SFFV	LTR SFFV bio	(B) 5'-GTTTGGCCCAACGTTAGCTATT-3'
5'-LTR; SFFV	LTR II SFFV bio	(B) 5'-CGCCCTTGATCTGAACTTCTC-3'
5'-LTR; SFFV	LTR III	5'-TTCCATGCCTTGCAAAATGGC-3'
3'-LTR; SFFV	U5 V SFFV bio	(B) 5'-GGTACCCGTATTCCCAATA-3'
3'-LTR; SFFV	U5 VI SFFV bio	(B) 5'-TCTTGCTGTTTGCATCCGAA-3'
3'-LTR; SFFV	LTR 25 SFFV (bio)	(B) 5'-GTGGACTCGCTGATCCIT -3'
3'-LTR; SFFV	LTR 25 SFFV nested	5'-GTCTCCTCAGATTGATTGAC-3'
3'-LTR; SFFV	FP RV 1 bio	(B) 5'-TGGAGGTTCCACCGAGATTTG-3'
3'-LTR; SFFV	FP RV 2	5'-AGATTTGGAGACCCCTGCC
Linkerkassette	Name	Sequenz (5'-3')
LK	LCI	5'-GACCCGGGAGATCTGAATTC-3'
LK	LCII	5'-GATCTGAATTCAGTGGCACAG-3'
Fusionsprimer	Name	Sequenz (5'-3')
LV	FuP A-LTR; LV 1	5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG(N) <sub>6-10</sub> TGTGTGACTCTGGTAACTAG-3'
LV	FuP A-LTR; LV 2	5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG(N) <sub>6-10</sub> ATCCCTCAGACCCTTTTAGTC -3'
RV	FuP A-LTR; RV	5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG(N) <sub>6-10</sub> GTCTCCTCTGAGTGATTGAC-3'
LK	FuP B-LK	(B) 5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTGGCA CAGCAGTTAGG-3'
LV	FuP Titanium A-LTR; LV 1	5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG(N) <sub>6-10</sub> TGTGTGACTCTGGTAACTAG-3'
LV	FuP Titanium A-LTR; LV 2	5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG(N) <sub>6-10</sub> ATCCCTCAGACCCTTTTAGTC-3'

RV	FuP Titanium A-LTR; RV	5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG(N) <sub>6-10</sub> GTCTCCTCTGAGTGATTGAC-3'
LK	FuP Titanium B-LK	(B) 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC TCAGAGTGGCACAGCAGTTAGG-3'
Herstellung LK	Name	Sequenz (5'-3')
Herstellung LK	LC1	5'-GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGG CACAGCAGTTAGG(N) <sub>4</sub> -3'
Herstellung LK	LC2	5'-CCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGA TC-3'
Herstellung LK	LC3	5'(N) <sub>2,4</sub> CCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATC-3'
nrLAM-PCR (LK)	LC1rev	(P)5'CCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATCTCCC GGGTddC-3'

### 2.1.6 DNA-Längenstandard, Enzyme und Kits

Enzyme/Kits	Bezugsquelle
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs
Fast-Link Ligation Kit	Epicentre
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Klenow Polymerase	Roche
Lineage Cell Depletion Kit	Miltenyi
Microcon -30, -50 Kit	Millipore
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
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen/Genaxxon
Verso™ cDNA Kit	Thermo Scientific

## 2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsquelle
Agarose LE	Sigma
Aqua ad iniectabilia	Braun
$\beta$ -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- $\text{CoCl}_2$	Fluka
Hexanukleotidgemisch (10x)	Roche
Humane genomische DNA	Roche
Lithiumchlorid	Sigma
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen
Loading Buffer 5x	Elchrom Scientific
Magnetische Partikel: Dynabeads M-280 Streptavidin	Dynal
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Sigma
MethoCult H4230	Stem Cell Technologies
Murine Interleukin-3 Culture Supplement	BD Biosciences
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 $\text{H}_2\text{O}$	Ambion
RPMI Medium 1640	Invitrogen
Tris-Acetat-Essigsäure (TAE) Buffer 40x	Elchrom Scientific
Tris-Borat-Essigsäure (TBE) Buffer 10x	Amresco
Trizma HCl	Appllichem

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Substanz	Endkonzentration
Denaturierungslösung	NaOH	0,1 M
Ladepuffer (5x)	Tris-HCl (pH 7)	25 mM
	EDTA (pH 8)	150 mM
	Bromphenol-Blau	0,05%
	Glycerol	25%
Lösungen 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 <sub>2</sub>		10 mM

### 2.1.9 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
6/24/48 well Platten Zellkultur	BD Beckton Dickinson
35/60 mm Zellkultur Schalen	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
Amicon-30, -50	Millipore
Deckel für 96 well Platten	Greiner bio-one
Filter (0,22 µm; 500 ml)	Millipore
Pipettierspitzen	Starlab GmbH
Pipettierspitzen für LightCycler LC480	Starlab GmbH
Zellkulturflaschen	Nunc Brand Products

### 2.1.10 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
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

### 2.1.11 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramme und Datenbanken	Bezugsquelle
Ingenuity Pathways Analysis	www.ingenuity.com
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/

### 2.1.12 Fotomaterial

Fotomaterial	Bezugsquelle
Videoprinter	Mitsubishi
Printerfilme VM 65 H	Mitsubishi

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation und Transduktion ‚Lineage‘ negativer (*lin*-) X-CGD Stammzellen

Die Isolation *lin*- X-CGD Zellen sowie deren Transduktion und Kultivierung wurden bei einem Laboraufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) entsprechend der dort gültigen SOP („Standard Operating Procedure“) durchgeführt. 13 Wochen alte männliche X-CGD Mäuse der hauseigenen Zucht wurden mit Isofluran betäubt und durch Genickbruch getötet. Zur Isolation der Knochenmarkzellen aus Femur und Tibia wurden die Hinterbeine der Tiere von Haut und umliegendem Gewebe befreit und das Knochenmark mit PBS und einer 23 ‚Gauge‘ Nadel aus den Knochen gespült. Anschließend wurden mit Hilfe des ‚Lineage Cell Depletion Kits‘ (Miltenyi) nach Angaben des Herstellers *lin*- Stammzellen selektiert. Die Reinheit der Zellen wurde durch FACS bestimmt.

### 2.2.2 Zellkultur

Die Inkubation der Zellen erfolgte stets bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Primäre *lin*-X-CGD Stammzellen wurden in SFEM (Serum-Free Expansion Medium) versetzt mit 1% Pen/Strep, mSCF, mTPO, mIGF-2 und hFGF-1 kultiviert. Zelllinien wurden in den geeigneten Kulturmedien versetzt mit 10% FBS und 2 mM Pen/Strep inkubiert. HeLa-Zellen wurden in DMEM, 293T-Zellen in IMDM und 32D Zellen in RPMI 1640 Medium mit 5% ‚IL-3 Culture Supplement‘ (falls nicht anderweitig angegeben) kultiviert. Die adhärenenten 293T und HeLa Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% mit 0,05% Trypsin (Invitrogen) abgelöst und 1:10 verdünnt. Die semi-adhärenenten 32D Zellen wurden alle 2 - 3 Tage nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min 1:5 bis 1:10 verdünnt. Die für die Vektorproduktion und Transduktionsexperimente benötigte Zellzahl wurde mithilfe der ‚Neubauer improved‘-Zählkammer bestimmt.

### 2.2.3 Plasmidpräparation

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden 200 ml LB-Medium versetzt mit 0,1 mg/ml Ampicillin mit Bakterien aus in unserem Labor vorhandenen Glycerol-Stocks angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 300 rpm wurde die Plasmid-DNA mit dem ‚QIAGEN Plasmid Maxi Kit‘ (Qiagen) laut Angaben des Herstellers isoliert. 1 µg der isolierten Plasmid-DNA wurde einem Kontrollverdau unterzogen und zur Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennt (**Abschnitt 2.2.18**).

### 2.2.4 Virusproduktion

#### 2.2.4.1 Lentivirale Vektoren

##### **Transfektion der Plasmid-DNA durch Polyethylenimin (PEI)**

Für die Produktion lentiviraler Viruspartikel wurden  $1 \times 10^7$  293T-Zellen in einer 15 cm Schale in 15 ml IMDM versetzt mit 10% FBS und 2 mM Pen/Strep ausgesät und 24 h inkubiert. Etwa 1 h vor der Transfektion mit Plasmid-DNA wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Pro Schale wurden eine PEI-Lösung (167,25 µg PEI (1 mg/ml) in 2,5 ml IMDM ohne Zusätze) sowie eine DNA-Lösung mit den zur Virusproduktion benötigten DNA-Plasmiden in IMDM (**Tabelle 2.1**) hergestellt. Nachdem die beiden Lösungen miteinander gemischt wurden, wurde der Transfektionsmix 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 12 - 16 h Inkubation wurde das Medium gewechselt.

**Tabelle 2.1:** Komponenten der DNA-Lösung für die Produktion lentiviraler Viruspartikel\*.

Reagenzien	Vektorbezeichnung	Menge
Verpackungsplasmid	pMDLg/p-RRE	12,5 µg
REV-Plasmid	pRSV-REV	12,5 µg
Plasmid mit Hüllproteine	pENV-VSV-G	9 µg
Transfektor	pCCLsin.PPT.SFFV.eGFP.WPRE oder pCCLsin.PPT.PGK.eGFP.WPRE	25 µg

\*Angaben pro 15cm-Schale

### Ernten der lentiviralen Viruspartikel

Nach weiteren 30 h Inkubation wurden die lentiviralen Viruspartikel geerntet. Das virushaltige Medium wurde abgenommen und über einen 0,22 µm-Filter (Millipore) filtriert. Je 35 ml des Filtrats wurden in einen Ultrazentrifugenbecher überführt und bei 20000 rpm für 2 h zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zentrifugenbecher kopfüber auf ein Papierhandtuch gestellt und ca. 10 min stehen gelassen, um das restliche Medium zu entfernen. Die Vektorpellets wurden bei 4°C in je 70 µl PBS über Nacht resuspendiert und am nächsten Tag vereinigt. Um eine einheitliche Suspension zu erhalten wurde das Gemisch 20 min langsam rotiert. Anschließend wurden Aliquots von 5 - 20 µl hergestellt und diese bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte wie in **Abschnitt 2.2.5** beschrieben.

#### 2.2.4.2 Gammaretrovirale Vektoren

##### Transfektion der Plasmid-DNA durch Calcium-Phosphat-Präzipitation

Für die Produktion gammaretroviraler Viruspartikel wurden  $5 \times 10^6$  293T-Zellen in 9 ml Standard DMEM in 10 cm Schalen ausgesät und 24 h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde 4 µl Chloroquine zu den Zellen gegeben und dann der Transfektionsmix angesetzt (**Tabelle 2.2**). Dafür wurden zunächst alle Komponenten bis auf HBS gemischt und dieses anschließend langsam unter Vortexen tropfenweise zugegeben. Nach 4 h und weiteren 16 h Inkubation wurde jeweils das Medium gewechselt und die Zellen jeweils in 5 ml frischem Medium aufgenommen.

**Tabelle 2.2:** Transfektionsmix für die Produktion gammaretroviraler Viruspartikel\*.

Reagenzien	Vektorbezeichnung	Menge
H <sub>2</sub> O		435,5 µl
CaCl <sub>2</sub> (2,5 M)		50 µl
Verpackungsplasmid (1 µg/µl)	M634	7,5 µl
Plasmid mit Hüllproteine (1 µg/µl)	VSV-G	2 µl
Transfektorvektor (1 µg/µl)	SINfes.gp91s, SINfes.eGFP oder SF91eGFP	5 µl
HBS (2x)		500 µl

\*Angaben pro 10 cm-Schale

### Ernten der gammaretroviralen Viruspartikel

24 h nach dem letzten Mediumwechsel wurde der virushaltige Überstand abgenommen und durch einen 0,22 µm-Filter (Millipore) filtriert. Für eine etwa 100fache Konzentrierung des Virusüberstandes wurden je 30 ml Filtrat vereinigt und 2 h 20 min bei 20500 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Röhrchen kopfüber auf Papiertücher gestellt, so dass die Restflüssigkeit ablaufen konnte. Die Viruspartikel wurden anschließend über Nacht bei 4°C in 300 µl SFEM resuspendiert und zu je 5 - 20 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte auf die relevanten Zellen (*lin*- X-CGD Zellen bzw. 32D Zellen) wie in **Abschnitt 2.2.5** beschrieben.

#### 2.2.5 Bestimmung des Virustiters

Die Konzentration der infektiösen Viruspartikel pro Volumeneinheit (TU/ml) wurde durch Transduktion der jeweiligen Zelllinie bzw. primärer Zellen und anschließender Messung der Vektor-positiven Zellen durch FACS bestimmt. Dafür wurden  $5 \times 10^4$  (Hela) bis  $1 \times 10^5$  Zellen (32D) in 6 well-Platten ausgesät. Hela-Zellen wurden am Tag zuvor ausgesät und für 24 h inkubiert. Für die sogenannte Virustitration wurden Verdünnungen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  des konzentrierten Virusüberstandes im jeweiligen Zellkulturmedium hergestellt und zu den Zellen gegeben. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und für die FACS (Fluorescence activated cell sorting) Analyse vorbereitet (**Abschnitt 2.2.7**).

Der Titer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T = \frac{n \times G}{V}$$

Wobei: T, Virustiter (TU/ml); n, Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion ( $=1 \times 10^5$ ); G, Prozentualer Anteil GFP-positiver Zellen; V, Verdünnungsfaktor. Für die Berechnung des Titers wurde die FACS-Analyse der Verdünnung verwendet, bei der der Anteil Vektor-positiver Zellen zwischen 1 und 20% lag.

## 2.2.6 Transduktion

### 2.2.6.1 Transduktion von HeLa-Zellen mit lentiviralen Vektoren

Für die Transduktion von HeLa-Zellen wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen in einer 6 well Platte ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM (10% FBS, 2 mM Gln und 2 mM Pen/Strep) kultiviert. Nach 24 h wurde das Wachstumsmedium durch DMEM (10% FBS, 2 mM Gln, 2 mM Pen/Strep) mit 8  $\mu$ g/ml Polybren ersetzt. Die Zellen wurden für 24 h mit dem jeweiligen lentiviralen Vektor (LV.SF.LTR, SIN.LV.SF oder SIN.LV.PGK) inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und in DMEM versetzt mit 10% FBS und 2 mM Pen/Strep aufgenommen.

### 2.2.6.2 Transduktion von *lin*- X-CGD Zellen mit gammaretroviralen Vektoren

Zur Transduktion der *lin*- X-CGD Zellen wurden  $3 \times 10^5$  Zellen/well in Retronectin-beschichteten 24 well Platten ausgesät. Pro ‚well‘ wurden 5  $\mu$ l des jeweiligen Vektors zugegeben. Die Platten wurden anschließend 90 min bei 32°C und 2500 rpm zentrifugiert und die Zellen über Nacht inkubiert. Die Transduktion wurde am nächsten Tag wiederholt, um eine bessere Transduktionseffizienz zu erreichen. Nach 14 Tagen wurde aus den Zellen DNA- und RNA isoliert.

### 2.2.6.3 Transduktion von 32D-Zellen

Für die Transduktion von 32D Zellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in einer 24 well-Platte in RPMI Medium mit 5% IL-3 ausgesät. Nach Zugabe von 8  $\mu$ g/ml Polybren wurden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend der jeweilige Vektor zugegeben. Für gammaretrovirale Vektoren wurde die Transduktion am darauffolgenden Tag wiederholt. 24 h nach der letzten Transduktion wurde das Medium abgenommen und die Zellen in frischem Medium (mit IL-3) aufgenommen.

### 2.2.7 Vorbereitung von Zellen für die FACS Analyse

Bis zu  $2 \times 10^5$  Zellen wurden pelletiert und mit 2% FBS in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen in 2% FBS/PBS + 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Propidiumiodid resuspendiert. Nach der Färbung wurden die Zellen zentrifugiert und in 2% FBS/PBS aufgenommen. SINfes.gp91s-transduzierte Zellen wurden zusätzlich mit dem 7D5 Antikörper, der das *GP91PHOX* Transgen erkennt, eingefärbt (Nakamura et al. 1987). Nach 15 min Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen nochmals mit 2% FBS/PBS gewaschen. Der Anteil lebender Vektor-positiver Zellen wurde danach im FACS bestimmt.

Die Reinheit muriner *lin*- Zellen wurde durch Färbung mit den ‚Lineage‘-Markern CD11b, B220, CD3, CD45.2 und Gr1 geprüft.

### 2.2.8 Genotoxizitätsassay

32D-Zellen ( $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$ ) wurden mit verschiedenen Virusmengen (‚Multiplicity of Infection‘ (MOI) bis 10) transduziert. 24 h nach der letzten Transduktion wurde das Medium gewechselt und die Zellen einige Tage in Anwesenheit von IL-3 kultiviert. 5 - 9 Tage nach Transduktion wurden  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen in Methylcellulose ohne IL-3 ausgesät und nach 14 - 16 Tagen die gewachsenen Kolonien gezählt. IL-3-unabhängige Kolonien wurden gepickt und in RPMI Medium ohne IL-3 expandiert. In allen Experimenten wurden parallel dazu nicht-transduzierte Zellen kultiviert, um mögliche Hintergrund-Transformationsraten zu bestimmen.

### 2.2.9 DNA-Isolation

Die genomische DNA aus Zellen wurde mit dem ‚High Pure PCR Template Preparation Kit‘ von Roche durchgeführt. Bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen wurden pelletiert und in 200  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer und 40  $\mu\text{l}$  Proteinase K wurden die Proben 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde 100  $\mu\text{l}$  Isopropanol dazugegeben und gut gemischt. Die Proben wurden dann auf die mitgelieferten Säulen geladen und bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 500  $\mu\text{l}$  ‚Inhibitor Removal‘-Puffer und zwei Mal mit 500  $\mu\text{l}$  Wasch-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Säule 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Abschließend wurde die Säule nochmals 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, um restliches Ethanol zu entfernen. Zuletzt wurde die DNA in 3 Elutionsschritten mit 50/50/100  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.2.10 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das ‚RNeasy Kit‘ von Qiagen verwendet. Etwa  $1 \times 10^6$  pelletierte Zellen wurden in 350  $\mu$ l Puffer RLT mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und zur Homogenisierung auf eine ‚Qiashredder‘-Säule (Qiagen) geladen. Nach Zentrifugation bei höchster Geschwindigkeit für 2 min wurde das homogenisierte Lysat mit 350  $\mu$ l 70% Ethanol versetzt, auf eine RNA-Säule geladen und 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde ein DNA-Verdau auf der Säule gemacht. Dazu wurde die Säule mit 350  $\mu$ l des Puffers RW1 gewaschen (Zentrifugation für 30 s bei 8000 x g) und anschließend 80  $\mu$ l frisch zubereitete DNase I-Lösung (10  $\mu$ l ‚DNaseI Stock‘ + 70  $\mu$ l RDD Puffer) direkt auf die Membran gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule nochmals mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer sowie 2 Mal mit 500  $\mu$ l RPE Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurde immer 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 min bei höchster Geschwindigkeit wurde die RNA in 30  $\mu$ l RNase-freiem dH<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurde ein weiterer DNA-Verdau mit dem ‚Turbo DNA-free Kit‘ von Invitrogen durchgeführt. Dafür wurden 0,1 Volumen 10x DNase Puffer und 0,5  $\mu$ l Turbo DNase zur eluierten RNA gegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden weitere 0,5  $\mu$ l Turbo DNase zugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch Zugabe von 0,1 Volumen ‚DNase Inactivation Reagent‘, 5 min Inkubation bei Raumtemperatur und gelegentlichem Mischendurch inaktiviert. Die RNA wurde nach 1,5 min Zentrifugation bei 10000 x g abgenommen und entweder direkt in cDNA umgeschrieben oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.2.11 cDNA-Synthese

Zur Analyse von chimären Transkripten bzw. für Genexpressionsanalysen durch RT-PCR wurde die isolierte RNA mit dem ‚Verso™ cDNA Kit‘ von Thermo Scientific in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde zunächst 5 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen zu zerstören, die die Reaktion beeinträchtigen könnten. Nach Zugabe der Reagenzien wurde das Reaktionsgemisch (**Tabelle 2.3**) für 30 min bei 42°C inkubiert. Abschließend wurde das Enzym bei 95°C für 2 min inaktiviert. Die cDNA wurde mit dem Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigt (**Abschnitt 2.2.19**) und bei -20°C gelagert.

**Tabelle 2.3:** Reagenzien für die cDNA-Synthese.

dH <sub>2</sub> O	7 µl
cDNA Synthesepuffer (5x)	4 µl
dNTP (500 µM)	2 µl
Oligo-dt-Primer (500 ng/µl)	1 µl
Verso Enzym-Mix	1 µl
RNA	5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

### 2.2.12 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der DNA, RNA und cDNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA, RNA und cDNA erfolgte zumeist spektrophotometrisch (NanoDrop 1000). Zusätzlich dazu und zur Qualitätskontrolle wurden der Agilent 2100 Bioanalyzer (durchgeführt von der hausinternen Genomics & Proteomics Core Facility) sowie Standard-PCRs auf Myoglobin, Aktin oder HPRT<sup>1</sup> angewendet. Die verwendeten Primer liegen zum einen in Introns (Myoglobin für humane Proben, HPRT<sup>1</sup> für murine Proben) und können daher zur Abschätzung der DNA-Konzentration bzw. von DNA-Kontaminationen in RNA/cDNA-Proben verwendet werden. Zur Bestimmung der cDNA-Konzentration wurden dagegen Primer verwendet, die in unterschiedlichen Exons hybridisieren (Aktin bzw. HPRT<sup>2</sup>). Die **Tabellen 2.4** und **2.5** zeigen die benötigten Reagenzien sowie das PCR-Programm. Als Standard für die PCR Reaktionen wurde eine Verdünnungsreihe (100 ng - 0,01 ng) einer bekannten humanen bzw. murinen DNA-Probe verwendet.

**Tabelle 2.4:** Reagenzien für die exponentiellen Standard-PCR Reaktionen.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
DNA-Probe	x µl	
dH <sub>2</sub> O	42,5 – x µl	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl	1x
dNTPs (10 mM)	1 µl	0,2 mM
Primer 1 (16,7 µM)	0,5 µl	167 nM
Primer 2 (16,7 µM)	0,5 µl	167 nM
Taq DNA-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl	2,5 U

**Tabelle 2.5:** Programmparameter der Standard-PCRs.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	} 35
Primeranlagerung	58°C	1 min	
Primerverlängerung	72°C	1 min	
Terminierung	72°C	10 min	

### 2.2.13 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Für die Analyse der Genexpression wurde eine genspezifische PCR auf die zuvor in cDNA umgeschriebene RNA gemacht. Hierfür wurden 10 ng cDNA in eine exponentielle PCR eingesetzt. In den **Tabellen 2.6** und **2.7** sind die benötigten Reagenzien und das PCR-Programm dargestellt.

**Tabelle 2.6:** Reagenzien für die exponentielle RT-PCR Reaktion.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
DNA-Probe	x µl	
dH <sub>2</sub> O	42,5 - x µl	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl	1x
dNTPs (10 mM)	1 µl	0,2 mM
RT-Primer 1 (16,7 µM)	0,5 µl	167 nM
RT-Primer 2 (16,7 µM)	0,5 µl	167 nM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U

**Tabelle 2.7:** Programmparameter der RT-PCR Reaktionen.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 35
Primeranlagerung	54°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	1 min	
Terminierung	72°C	5 min	

### 2.2.14 Bestimmung der Transduktionseffizienz

Neben einer FACS-Analyse (**Abschnitt 2.2.7**) wurde zur Bestimmung der Transduktionseffizienz verschiedener lentiviral und gammaretroviral transduzierter Proben eine exponentielle PCR mit vektorspezifischen Primern durchgeführt. Im Falle sehr geringer Genmarkierungen wurde 1  $\mu\text{l}$  dieses PCR-Produkts für eine zweite exponentielle PCR mit versetzten Primern verwendet. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe (100 ng - 0,01 ng) einer Probe mit bekannter Markierung. Die **Tabellen 2.8** und **2.9** zeigen die verwendeten Reagenzien und das PCR-Programm.

**Tabelle 2.8:** Reagenzien für die exponentiellen Vektor-PCR Reaktionen.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
DNA-Probe	x $\mu\text{l}$	
dH <sub>2</sub> O	42,5 - x $\mu\text{l}$	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 $\mu\text{l}$	1x
dNTPs (10 mM)	1 $\mu\text{l}$	0,2 mM
Vektor-Primer 1 (16,7 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{l}$	167 nM
Vektor-Primer 2 (16,7 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{l}$	167 nM
Taq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$	2,5 U

**Tabelle 2.9:** Programmparameter der exponentiellen Vektor-PCR Reaktionen.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 35
Primeranlagerung	60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	1 min	
Terminierung	72°C	5 min	

### 2.2.15 Lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR)

Die Bestimmung der Integrationsloki retroviraler Vektoren erfolgte größtenteils mit der LAM-PCR (Schmidt et al. 2007, Schmidt et al. 2009). Darüber hinaus wurde die LAM-PCR in dieser Arbeit zur Detektion aberranter Transkripte auf cDNA angewendet. Die hochsensitive Methode besteht aus mehreren Einzelschritten, die mit einer initialen lineare Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge beginnt. Diese findet meist aus dem LTR des Vektors statt und kann in 5'-oder in 3'-Richtung durchgeführt werden. Durch die Verwendung biotinylierter Primer können die resultierenden einzelsträngigen DNA-Fragmente selektiv an mit Streptavidin beladene magnetische Partikel gebunden werden. Die darauf folgenden Reaktionen werden an der Festphase durchgeführt, so dass die Komponenten der einzelnen Reaktionen nach deren Beendigung mithilfe eines magnetischen Felds wieder aus dem Gemisch entfernt werden können. Nach der Synthese des komplementären Zweitstrangs wird mithilfe von Restriktionsenzymen ein definierter Überhang am unbekanntem Ende der genomischen DNA generiert, an den anschließend eine entsprechende Linkerkassette ligiert wird. Dadurch sind beide Enden der Vektor-Genom-Fragmente bekannt und sie können exponentiell amplifiziert und sequenziert werden. Die Einzelreaktionen sind in den folgenden Abschnitten im Detail beschrieben.

#### 2.2.15.1 Lineare Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge

In die lineare PCR wurden 100 ng - 1 µg genomische DNA oder 150 - 200 ng cDNA eingesetzt. Bei den Patientenproben wurden zudem 10 ng und 1 ng verwendet, um eventuelle prädominante Integrationsklone erkennbar zu machen. Nach 50 Zyklen wurden 0,5 µl Taq Polymerase zu den PCR-Reaktionen dazu gegeben und weitere 50 Zyklen durchgeführt. In den **Tabellen 2.10** und **2.11** sind die benötigten Reagenzien und das PCR-Programm dargestellt. Die Primer müssen stets biotinyliert sein. Die Temperatur zur Primeranlagerung variierte von 58°C (gammaretroviral transduzierte Proben) bis 60°C (lentiviral transduzierte Proben).

**Tabelle 2.10:** Reagenzien für die lineare Amplifikation bei der LAM-PCR.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
DNA/cDNA	x µl	
dH <sub>2</sub> O	43,25 – x µl	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl	1x
dNTPs (10 mM)	1 µl	0,2 mM
Primer 1 (0,167 µM)	0,25 µl	0,85 nM
Primer 2 (0,167 µM)	0,25 µl	0,84 nM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U

**Tabelle 2.11:** PCR-Parameter der linearen Amplifikation bei der LAM-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 2 x 50
Primeranlagerung	58 - 60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	1 min	
Terminierung	72°C	5 min	

### 2.2.15.2 Immobilisierung an Magnetischen Partikeln („Magnetic Capture“)

Die biotinylierten einzelsträngigen PCR-Produkte wurden über die Bindung an Streptavidin gekoppelte magnetische Partikel aus dem Reaktionsgemisch extrahiert. Dazu wurden 200 µg magnetische Partikel in der Vorratslösung einem magnetischen Feld ausgesetzt und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit 40 µl 0,1% BSA/PBS-Lösung und einmal mit 20 µl 3 M LiCl Lösung wurden die magnetischen Partikel in 50 µl 6 M LiCl Lösung resuspendiert und im Verhältnis 1:1 zu dem Reaktionsgemisch der linearen PCR-Reaktion gegeben. Diese Suspension wurde auf einem Schüttler (300 rpm) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

### 2.2.15.3 Herstellung der Linkerkassetten

Die Linkerkassetten wurden durch Hybridisierung von jeweils zwei Oligonukleotiden hergestellt. Dabei wurden abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym die Oligonukleotide LC1 bzw. LC2 und LC3 mit den entsprechenden Endungen miteinander kombiniert (siehe **Abschnitt 2.1.5**). Dadurch entsteht an einem Ende der Linkerkassette ein Überhang, der komplementär zu dem durch den Restriktionsverdau der genomischen DNA entstandenen Überhang ist. Die in **Tabelle 2.12** aufgeführten Reagenzien wurden gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht durch langsames Abkühlen des Reaktionsgemischs im abgeschalteten Heizblock. Am nächsten Tag wurde das Gemisch mit dH<sub>2</sub>O auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und über eine Microcon-30 Säule (Millipore) aufkonzentriert (Zentrifugation für 12 min bei 12600 rpm; invertieren der Säule und Elution in neues Reaktionsgefäß für 3 min bei 3600 rpm). Das Konzentrat wurde auf 80 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

**Tabelle 2.12:** Herstellung der Linkerkassetten bei der LAM-PCR.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
LC1 oder LC2 (100 µM)	40 µl	20 µM
LC3 (100 µM)	40 µl	20 µM
Tris-HCl pH 7,5 (250 mM)	110 µl	137,5 mM
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	10 µl	5 mM

#### 2.2.15.4 DNA-Doppelstrangsynthese („Hexanukleotidpriming“)

Nach Bindung der einzelsträngigen Vektor-Genom-Übergänge an die magnetischen Partikel (im folgenden DNA-Partikel-Komplexe genannt) wurden die Proben in eine 96 well Platte überführt, einem magnetischen Feld ausgesetzt und der Überstand verworfen. Zur Synthese des Zweitstranges wurden die DNA-Partikel-Komplexe mit 100 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in dem in **Tabelle 2.13** beschriebenen Reaktionsgemisch resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert.

**Tabelle 2.13:** DNA-Doppelstrangsynthese durch „Hexanukleotidpriming“.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
dH <sub>2</sub> O	16,5 µl	
Hexanukleotidgemisch (10x) (Roche)	2 µl	1x
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
Klenow Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	1 U

#### 2.2.15.5 Restriktionsverdau

Zum Abstoppen des „Hexanukleotidprimings“ wurden 80 µl dH<sub>2</sub>O zu den Proben gegeben und nach Exposition gegen ein magnetisches Feld der Überstand verworfen. Nach einem Waschschrift mit 100 µl dH<sub>2</sub>O wurden die in **Tabelle 2.14** aufgeführten Reagenzien für den Restriktionsverdau zugegeben. Die Proben wurden für mindestens 1 h bei der für das Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Das Restriktionsenzym wurde dabei so gewählt, dass seine Erkennungssequenz nicht in der amplifizierten Sequenz des Vektoranteils vorhanden war.

**Tabelle 2.14:** Restriktionsverdau der amplifizierten Vektor-Genom-Übergänge bei der LAM-PCR.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
dH <sub>2</sub> O	17,6 µl/15,6 µl	
10x Puffer (NEB 1 - 4)	2 µl/2 µl	1x
Restriktionsenzym (5 U/µl) (New England Biolabs)	0,4 µl /0,4 µl	2 U
Optional: BSA (10x)	--/2 µl	1x

### 2.2.15.6 Ligation der Linkerkassette

Zur Beendigung des Restriktionsverdau wurden 80 µl dH<sub>2</sub>O zugegeben und der Überstand nach Separation in einem magnetischen Feld verworfen. Die Proben wurden mit 100 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit dem Reaktionsgemisch für die Ligation versetzt (**Tabelle 2.15**). Die doppelsträngige Linkerkassette muss dabei entsprechend dem verwendeten Restriktionsenzym ausgewählt werden. Die Ligation erfolgte mit dem ‚Fast-Link Ligation Kit‘ (Epicentre) für 5 min bei Raumtemperatur.

**Tabelle 2.15:** Ligation der doppelsträngigen Linkerkassette.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
dH <sub>2</sub> O	5 µl	-
10x Fast Link Ligation-Puffer	1 µl	1x
ATP (10mM)	1 µl	1 mM
Spezifische Linkerkassette	2 µl	1:10-Verdünnung
Fast-Link-Ligase (2 U/µl)	1 µl	0,2 U

### 2.2.15.7 Denaturierung der DNA-Partikel-Komplexe

Um die Ligation abzustoppen wurde das Reaktionsgemisch mit 90 µl dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und die DNA-Partikel-Komplexe wie zuvor im magnetischen Feld separiert und mit 100 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden diese in 5 µl 0,1 M NaOH resuspendiert und auf einem Schüttler bei 300 rpm für 10 min inkubiert. Nach erneuter Exposition in einem magnetischen Feld wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.15.8 Exponentielle Amplifikationen

Die exponentielle Vervielfältigung der Vektor-Genom-Übergänge erfolgte durch zwei geschachtelte PCR-Reaktionen („nested PCR“). In die erste exponentielle PCR-Reaktion wurden 2 µl der einzelsträngigen DNA aus der Denaturierungsreaktion eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde durch ein „Magnetic Capture“ und anschließende Denaturierung in 10 µl 0,1 M NaOH aufgereinigt (**Abschnitt 2.2.15.2** und **2.2.15.7**). Der Überstand wurde in einen neues Reaktionsgefäß transferiert und bei -20°C gelagert.

1 µl des Denaturierungsproduktes der ersten exponentiellen PCR wurde in die zweite exponentielle PCR-Reaktion eingesetzt. In den **Tabellen 2.16** und **2.17** sind die Reagenzien und Parameter der beiden exponentiellen PCR-Reaktionen dargestellt. Nach der zweiten exponentiellen PCR wurden die PCR-Produkte durch Gelelektrophorese visuell analysiert (**Abschnitt 2.2.18**) und für die Sequenzierung vorbereitet (**Abschnitte 2.2.19** und **2.2.20**).

**Tabelle 2.16:** Reagenzien für die exponentielle Vervielfältigung bei der LAM-PCR

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Denaturierte DNA-Probe	1 - 2 µl	
dH <sub>2</sub> O	41 - 42 µl	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl	1x
dNTPs (10 mM)	1 µl	0,2 mM
Primer 1 (16,7 µM)	0,5 µl	0,85 nM
Primer 2 (16,7 µM)	0,5 µl	0,84 nM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U

**Tabelle 2.17:** Parameter der exponentiellen PCR-Reaktionen bei der LAM-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 35
Primeranlagerung	58 - 60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	1 min	
Terminierung	72°C	5 min	

### 2.2.16 Nicht-restriktive Lineare amplifikationsmedierte PCR (nrLAM-PCR)

Die nrLAM-PCR ist eine Weiterentwicklung der in **Abschnitt 2.2.15** beschriebenen LAM-PCR, bei der auf die Fragmentierung der DNA verzichtet wird. Sie beginnt ebenfalls mit einer linearen Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge und einer Anreicherung dieser Fragmente mit magnetischen Partikeln. Zur Umgehung des Restriktionsverdau wird direkt im Anschluss eine einzelsträngige Linkerkassette an das unbekannte genomische Ende der linear amplifizierten Fragmente ligiert. Diese Einzelstrangligation ermöglicht anschließend die exponentielle Vervielfältigung der Vektor-Genom-Übergänge. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ursprünglich veröffentlichte Protokoll (Paruzynski et al. 2010) zur genomweiten Detektion retroviraler Integrationen und veränderter zellulärer Transkripte modifiziert.

#### 2.2.16.1 Lineare Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge bei der nrLAM-PCR

Bei der linearen Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge durch die nrLAM-PCR wurden 0,5 ng - 500 ng genomischer DNA oder 150 - 200 ng cDNA aus transduzierten Zellen eingesetzt. Um die Detektion des Vektor-Genom-Übergangs zu garantieren und den Anteil an Vektorfragmenten, die kein oder nur einen sehr kurzen Anteil genomischer DNA enthalten möglichst gering zu halten, wurden die verwendeten Primer so weit wie möglich an die Enden der LTR-Regionen gelegt. In den **Tabellen 2.18** und **2.19** sind die Reagenzien und die PCR-Parameter der PCR-Reaktion wiedergegeben. Nach den ersten 50 Zyklen wurden nochmals 0,5 µl Taq DNA-Polymerase zu den Proben zugegeben und die Reaktion für weitere 50 Zyklen gestartet.

**Tabelle 2.18:** Reagenzien für die lineare Amplifikation bei der nrLAM-PCR

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
DNA/cDNA	x µl	
dH <sub>2</sub> O	43,25 - x µl	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl	1x
dNTPs (0,5 mM)	1 µl	10 µM
Primer 1 (0,167 µM)	0,5 µl	1,67 nM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U

**Tabelle 2.19:** PCR-Parameter der linearen Amplifikation bei der nrLAM-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 2 x 50
Primeranlagerung	58 - 60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	5 - 10 s	

### 2.2.16.2 ‚Magnetic Capture‘

Das PCR-Produkt wurde wie in **Abschnitt 2.2.15.2** beschrieben an magnetische Partikel gebunden. Die Inkubationszeit betrug mindestens 2 h.

### 2.2.16.3 Ligation einer einzelsträngigen Linkerkassette

Die Ligation der Linkerkassette erfolgte an der Festphase. Nach magnetischer Separation wurde der Überstand verworfen, die Proben mit 100 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen und in 10 µl Ligationsmix (**Tabelle 2.20**) resuspendiert. Die Ligation der einzelsträngigen Linkerkassette erfolgte durch das Enzym CircLigase<sup>TM</sup> (New England Biolabs). Für die Analyse mono-/oligoklonaler Proben wurde der PEG 8000 Anteil durch dH<sub>2</sub>O ersetzt, um die Handhabung zu erleichtern und die Sensitivität für die Analyse solcher Proben ausreichend war. Die Reaktion wurde 1 h bei 60°C und 300 rpm inkubiert. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte eher zu einer Reduktion der Ausbeute. Um die Reaktion abzustoppen wurden 90 µl dH<sub>2</sub>O zugegeben und der Überstand nach Separation in einem magnetischen Feld verworfen. Die Proben wurden mit 100 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen, in 10 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und bei -20°C gelagert. 2 µl wurden in die erste exponentielle PCR-Reaktion eingesetzt.

**Tabelle 2.20:** Ligation der einzelsträngigen Linkerkassette durch die CircLigase<sup>TM</sup>.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
dH <sub>2</sub> O	1 - 6,5 µl	-
CircLigase <sup>TM</sup>	1 µl	1
10x CircLigase <sup>TM</sup> -Puffer	1 µl	1x
ssDNA-Linkerkassette LC1-rev (10 µM)	1 µl	1 µM
Mn <sub>2</sub> Cl (10 mM)		
ATP (10 mM)	1 µl	1 mM
Optional: 50% PEG 8000, vorgewärmt auf 60°C	5 µl	25%

### 2.2.16.4 Exponentielle Amplifikationen der nrLAM-PCR

Die exponentielle Vervielfältigung der Vektor-Genom-Übergänge erfolgte wie bei der LAM-PCR durch zwei geschachtelte PCR-Reaktionen. In die erste exponentielle PCR-Reaktion wurden 2 µl der resuspendierten Proben aus **Abschnitt 2.2.16.3** eingesetzt. Anschließend wurde das PCR-Produkt wie zuvor beschrieben (**Abschnitt 2.2.15.7**) mit magnetischen Partikeln aufgereinigt und in 5 µl 0,1 M NaOH denaturiert. Davon wurde 2 µl in die zweite exponentielle PCR-Reaktion eingesetzt. **Tabelle 2.21** gibt die in die beiden exponentiellen PCR-Reaktionen eingesetzten Reagenzien wieder, die **Tabellen 2.22** und **2.23** die verwendeten PCR-Programme. Nach der exponentiellen Amplifikation der Vektor-Genom-Übergänge wurde die Reinheit der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese visualisiert und die Produkte für die Sequenzierung vorbereitet (**Abschnitte 2.2.18-2.2.20**).

**Tabelle 2.21:** Reagenzien der exponentiellen PCR-Reaktionen bei der nrLAM-PCR.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
DNA-Partikel-Komplex/Denaturierte DNA-Probe	2 µl	
dH <sub>2</sub> O	41 µl	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl	1x
dNTPs (10 mM)	1 µl	0,2 mM
Primer 1 (16,7 µM)	0,5 µl	167 nM
Primer 2 (16,7 µM)	0,5 µl	167 nM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U

**Tabelle 2.22:** Parameter der ersten exponentiellen PCR-Reaktion bei der nrLAM-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 10
Primeranlagerung	58 - 60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	5 - 10 s	
Denaturierung	90°C	2 min	
Denaturierung	90°C	45 s	} 25
Primeranlagerung	58 - 60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	5 - 10 s	

**Tabelle 2.23:** Parameter der zweiten exponentiellen PCR-Reaktion bei der nrLAM-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 10
Primeranlagerung	58 - 60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	5 - 10 s	
Denaturierung	90°C	2 min	
Denaturierung	90°C	45 s	} 25
Primeranlagerung	58 - 60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	5 - 10 s	
Terminierung	72°C	2 min	

### 2.2.17 Abschätzung der Effizienz einzelsträngiger Ligation

Ein einzelsträngiges DNA-Fragment definierter Länge wurde durch PCR-Amplifikation eines entsprechenden Fragments von einem lentiviralen Plasmid, Immobilisierung an magnetischen Partikeln für mindestens 1 h (**Abschnitt 2.2.15.2**) und anschließender Denaturierung in 0,1 M NaOH hergestellt. Das Denaturierungsprodukt wurde verworfen und das an die magnetischen Partikel gebundene einzelsträngige DNA-Fragment weiterverwendet. Nach Resuspension in dH<sub>2</sub>O wurden die DNA-Partikel-Komplexe zu gleichen Teilen gesplittet, um verschiedene Ligasen und Ligationsbedingungen parallel und unter gleichen Voraussetzungen testen zu können. Ein Zehntel des jeweiligen Ligationsprodukts wurde zur exponentiellen Amplifikation mit plasmid- und linkerspezifischen Primern verwendet. Zum Vergleich der Ligationseffizienz wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel visualisiert. Die **Tabellen 2.24** und **2.25** zeigen die Reagenzien und verwendeten PCR-Programme.

**Tabelle 2.24:** Reagenzien für die lineare Amplifikation bei der nrLAM-PCR

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Plasmid DNA	1 µl	0,1 - 100 fg
dH <sub>2</sub> O	20,25 µl	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	2,5 µl	1x
dNTPs (0,5 mM)	0,5 µl	10 µM
SK LTR 2 bio / SK LTR 3 (16,7 µM)	0,25 µl	1,67 nM
SiP_200 / LCI (16,7 µM)	0,25 µl	1,67 nM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	1,25 U

**Tabelle 2.25:** PCR-Parameter der linearen Amplifikation bei der nrLAM-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 s	} 25
Primeranlagerung	55°C/60°C	30 s	
Primerverlängerung	72°C	30 s	
Terminierung	72°C	5 min	

### 2.2.18 Gelelektrophorese

Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung in 2%igen Agarosegelen oder in hochauflösenden Kunststoffgelen (Spreadex<sup>®</sup>, nur LAM-PCR Produkte). Dafür wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl 5x ‚Loading Buffer‘ versetzt und das Gemisch ins Gel geladen. Die Auftrennung in Spreadex<sup>®</sup>-Gelen erfolgte in speziellen Gelelektrophoresekammern bei einer Spannung von 120 V und einer stetigen Umwälzung des Puffers durch eine Pumpe, die nach Einlaufen der Proben in das Gel eingeschaltet wurde. Die DNA in den Gelen wurde in einem Gel-Dokumentationssystem im UV-Licht sichtbar gemacht.

### 2.2.19 Aufreinigung der PCR-Produkte

(nr)LAM-PCR-Produkte wurden vor und nach der Fusionsprimer-PCR (**Abschnitt 1.2.20**) zur Vorbereitung für die Hochdurchsatzsequenzierung durch magnetische Partikel aufgereinigt („Ampure Beads“). Dazu wurden 30 - 40 µl PCR-Produkt mit der 1,1fachen Menge ‚Ampure Beads‘ vermischt und zur Ausbildung des DNA-Partikel-Komplexes 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese wurden mit Hilfe einer magnetischen Einheit von den restlichen Reagenzien separiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit 70%igen EtOH wurde die DNA mit 20 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch mit dem NanoDrop (Thermo Scientific) bestimmt.

cDNA-Proben wurden mithilfe des Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Zentrifugation erfolgte jeweils 1 min bei 13.000 rpm. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. 100 µl PBI Puffer wurden mit 20 µl PCR-Produkt gemischt, auf eine ‚QIAquick‘ Säule (Qiagen) geladen und zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution der cDNA wurden 30 µl dH<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2.20 Fusionsprimer-PCR

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte im Hochdurchsatzverfahren mit der Pyrophosphat-Sequenzierertechnologie (GS FLX und GS FLX Titanium, 454/Roche). Dafür mussten zunächst mithilfe einer Fusionsprimer-PCR spezifische DNA-Sequenzen (Adaptoren) an die Enden der PCR-Produkte angefügt werden. 40 ng aufgereinigtes PCR-Produkt wurden in die Fusionsprimer-PCR eingesetzt und mit den in **Tabelle 2.26** angegebenen Reagenzien versetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 2.27** dargestellt. Die Fusionsprimer setzen sich aus den 454-spezifischen Adaptoren A (5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG-3' (GS FLX) bzw. (Titanium) und B (5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3' (GS FLX) bzw. (Titanium) und einem vektor- bzw. linkerspezifischen Anteil zusammen.

**Tabelle 2.26:** Reagenzien bei der Fusionsprimer-PCR.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
DNA-Probe	x µl	40 ng
dH <sub>2</sub> O	42,5 – x µl	
10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl	1x
dNTPs (0,5 mM)	1 µl	10 µM
FuP A-§ (10µM)	0,5 µl	100 nM
FuP B-§ (10µM)	0,5 µl	100 nM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U

§, vektorspezifischer Sequenzanteil; §, linkerspezifischer Sequenzanteil.

**Tabelle 2.27:** PCR-Bedingungen bei der Fusionsprimer-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	} 12
Primeranlagerung	58 - 60°C	45 s	
Primerverlängerung	72°C	5 - 10 s	
Terminierung	72°C	5 min	

Die Verwendung spezifischer Erkennungssequenzen, die zwischen dem 454-spezifischen Anteil und der vektorspezifischen Sequenz eingefügt wurden, ermöglichte zudem die individuelle Markierung einzelner Proben, so dass hunderte Proben in einem einzigen Sequenzierlauf parallel sequenziert werden konnten (Paruzynski et al. 2010).

### 2.2.21 Pyrophosphatsequenzierung

Die Pyrophosphatsequenzierung von PCR-Produkten wurde von GATC (Konstanz) oder von der ‚Genomics and Proteomics Core Facility‘ am Deutschen Krebsforschungszentrum nach modifizierten Herstellerangaben durchgeführt. Nach Vorbereitung der Proben entsprechend **Abschnitt 2.2.20** und spektrophotometrischer Bestimmung der Konzentration im NanoDrop (Thermo Scientific) wurden die aufgereinigten Fusionsprimer-PCR-Produkte in unterschiedlichen Mengenverhältnissen (je nach gewünschter Sequenziertiefe) mit zahlreichen anderen Proben gemischt und gemeinsam sequenziert.

Die Zuordnung der Sequenzen zu den entsprechenden Proben erfolgte anhand spezifischer Erkennungssequenzen (**Abschnitt 1.2.20**) durch eigens in der Arbeitsgruppe entwickelte bioinformatische Programme, ebenso wie die automatisierte Analyse der Sequenzen (Arens et al. 2012) und Fronza et al., unveröffentlicht). Zudem wurden für die Analyse verschiedene frei zugängliche und käuflich erwerbliche Programme (z.B. DNA STAR Lasergene, IPA Software, BLAST/BLAT) genutzt. Der Abgleich der Sequenzen erfolgte für das humane Genom mit der Genomversion NCBI37/HG19 vom März 2006, für die murinen Sequenzen mit der Genomversion NCBI37/MM9 vom Juli 2007.

### 2.2.22 Analyse aberranter Transkripte

Die Auswertung aberranter Transkripte erfolgte zunächst manuell mithilfe der frei zugänglichen ‚BLAST Alignment Tool‘ (BLAT) Software (<http://genome.ucsc.edu/>) der University of California, Santa Cruz (UCSC). In Zusammenarbeit mit Dr. Anne Arens wurde zudem an der Etablierung eines bioinformatischen Programmes zur automatisierten Analyse gearbeitet. Hierbei werden zunächst diejenigen Sequenzen aussortiert, die beginnend mit der vektorspezifischen Sequenz des Fusionsprimers in mehr als 90% und ohne Unterbrechungen mit dem jeweiligen Vektor übereinstimmen (Sequenzidentität >95%). Bei den verbleibenden Sequenzen wird der Vektoranteil am Anfang (mindestens 20 bp) sowie – falls vorhanden – die linkerspezifische Sequenz am Ende entfernt und identischen Sequenzen kombiniert. Die Stelle, an dem die Vektorsequenz abbricht, stellt die Spleißstelle dar. Anschließend werden diese Sequenzen nochmals mit dem Vektor abgeglichen, um vektorinterne Spleißprozesse zu dokumentieren und auch diese im Folgenden auszuschließen. Schließlich werden die übrigen Sequenzen mit dem entsprechenden Genom und der mRNA des Wirtsorganismus abgeglichen. Die Sequenzidentität muss wiederum >95% betragen. Die Ausgabe der Informationen erfolgt in einer Exceltabelle.

### 3 ERGEBNISSE

Grundlegende Fragestellung dieser Arbeit war die Quantifizierung der Vorgänge und Wechselwirkungen, die bei der Integration retroviraler Vektoren vonstattengehen und wie sich Änderungen im Vektordesign auf die Integrationspräferenz und aberrante Genexpression auswirken. Um dies zu erreichen, sollte eine umfassende funktionelle Integromanalyse etabliert werden, die es ermöglicht, die Auswirkungen retroviraler Integration nicht nur auf DNA-, sondern auch auf RNA-Ebene zu untersuchen und auch geringe Änderungen mit hoher Sensitivität zu detektieren. Im Folgenden werden mithilfe umfassender Integromanalysen neue SIN-retrovirale Vektoren für die Gentherapie der X-CGD auf ihre biologische Sicherheit und das klonale Inventar der genkorrigierten Hämatopoese untersucht. Funktionelle Integromanalysen lentiviraler Vektoren werden verwendet, um den Einfluss verschiedener Vektor- und Sicherheitselemente, wie z.B. Promotoren und Insulatoren, auf die Integration und zelluläre Genexpression zu untersuchen.

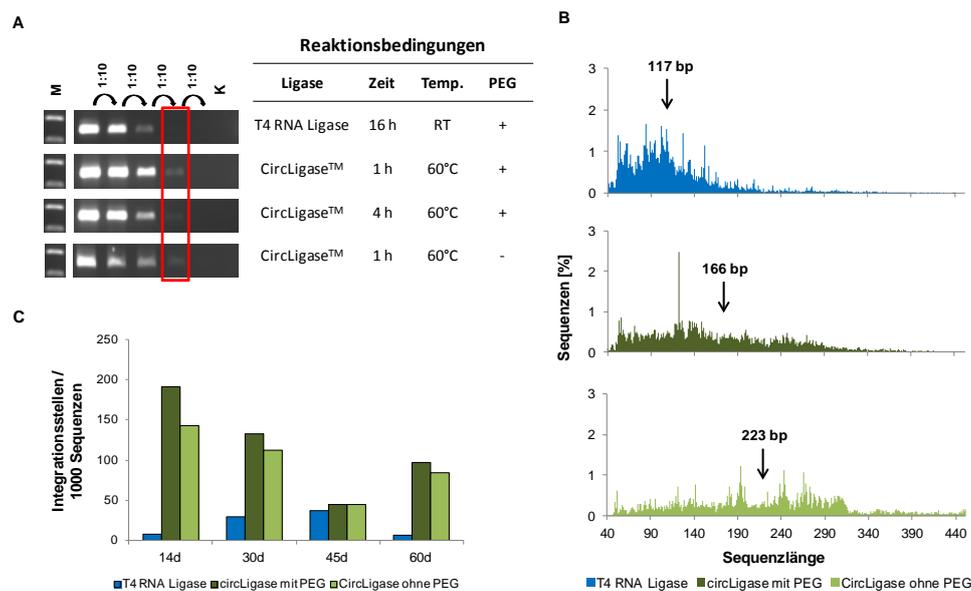
#### 3.1 Etablierung einer funktionellen Integromanalyse

Um das Integrations- und Expressionsverhalten integrierender Vektorsysteme zu untersuchen, sollten funktionellen Integromanalysen auf Basis der LAM-PCR/nrLAM-PCR in Kombination mit Hochdurchsatzsequenzierung etabliert werden. Während die LAM-PCR höchste Sensitivität gewährleistet, ermöglicht die nrLAM-PCR maximale genomische Zugänglichkeit – jedoch auf Kosten der Sensitivität. Um auch bei geringen Mengen verfügbarer DNA/RNA eine uneingeschränkte Analyse des klonalen Repertoires genkorrigierter Zellen und die detaillierte Analyse von chimären Transkripten zu ermöglichen, war es nötig, die nrLAM-PCR zu adaptieren und optimieren.

##### 3.1.1 Optimierung der nicht-restriktiven Integrationsstellenanalyse (nrLAM-PCR)

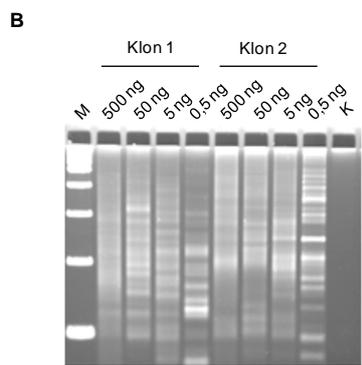
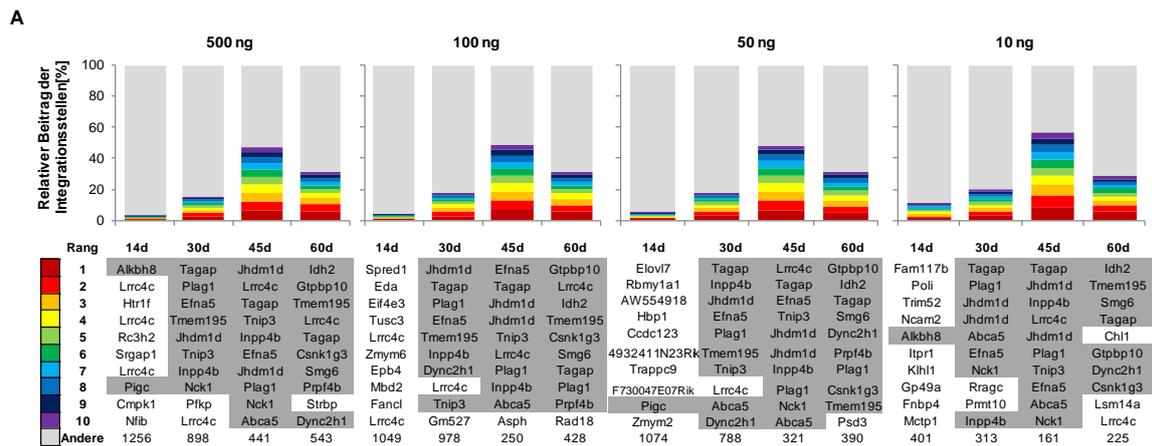
Die geringere Sensitivität der nrLAM-PCR im Vergleich zur hochsensitiven LAM-PCR resultiert aus der wenig effizienten Einzelstrangligation durch die T4 RNA Ligase. Um die Sensitivität und Robustheit der Ligation zu erhöhen, wurden verschiedene Reaktionsbedingungen und Ligasen getestet und verglichen. Durch die Entstehung einer Vielzahl verschieden langer nrLAM-PCR Amplikons auch für einzelne Integrationsstellen, die bei der gelelektrophoretischen Auftrennung als „Schmier“ zu erkennen sind, sind Änderungen in der Ligationseffizienz ohne nachfolgende Sequenzierung nicht abzuschätzen. Für die initialen Untersuchungen wurde daher ein vergleichender Assay entwickelt, der eine einfache und schnelle Evaluation der Ligationseffizienz

anhand der Ligation eines einzelnen Fragments unter realitätsnahen Bedingungen ermöglicht (**Abschnitt 2.2.17**). Mithilfe dieses Assays wurde die CircLigase™ mit einer etwa 10fach erhöhten Ligationseffizienz als vielversprechendster Kandidat für die einzelsträngige Ligation identifiziert (**Abbildung 3.1A**). Die Analyse von lentiviral transduzierten, polyklonalen Proben durch nrLAM-PCR unter Verwendung der CircLigase™ und nachfolgender Sequenzierung zeigte eine gleichmäßige Sequenzlänge bei hoher Sequenzqualität. Die höchste Ausbeute an Integrationsstellen wurde durch Zugabe von Polyethylenglykol 8000 (PEG) erreicht, welche jedoch zu einer Reduktion der durchschnittlichen Sequenzlänge führte (**Abbildung 3.1B und C**).



**Abbildung 3.1: Vergleich der Effizienz der Einzelstrangligation unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.** (A) Die Effizienz der Einzelstrangligation wurde anhand der Ligation eines einzelsträngigen, 330 bp langen und an magnetische Partikel gebundenen Fragments mit einer einzelsträngigen Linkerkassette und nachfolgender Amplifikation mit Fragment- und linkerspezifischen Primern bestimmt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu keiner höheren Ausbeute des Ligationsprodukts. (B)+(C) nrLAM-PCR Analyse lentiviral transduzierter, polyklonaler Proben an verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion. (B) Die Länge der von der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen weist auf eine gleichmäßige Ligation von Fragmenten bis 450 bp durch die CircLigase™ hin. (C) Die Ausbeute an Integrationsstellen wurde durch die Ligation mit CircLigase™ deutlich erhöht. Die höchste Ausbeute wurde durch Zugabe von PEG zum Reaktionsgemisch erreicht. M, Marker; K, Negativkontrolle; Temp., Temperatur; PEG, Polyethylenglykol 8000; h, Stunden; d, Tage nach Transduktion; bp, Basenpaare; nrLAM-PCR, nicht-restriktive lineare amplifikationsmedierte PCR.

Desweiteren wurde mit Hilfe der polyklonalen Proben gezeigt, dass der Einsatz von nur 10 ng DNA (bisher: 500 ng - 1000 ng) ausreichte, um die Klonalität auch dieser sehr komplexen Proben korrekt erfassen zu können und prädominante Klone frühzeitig und zuverlässig zu detektieren (**Abbildung 3.2A**). An zwei lentiviral transduzierten NK-92-Einzelzellklonen wurde gezeigt, dass für eine verlässliche Analyse mono- bzw. oligoklonaler Proben die DNA-Menge von 100 - 500 ng auf nur 0,5 ng reduziert werden konnte. Erst bei dieser Menge konnte anhand des Gelbildes eine Reduktion der Ligationseffizienz beobachtet werden (**Abbildung 3.2B und C**).



**C**

3'nrLAM-PCR									
Probe	Genomische Länge	Chrom	Sense	Lokus	RefSeq Gen	500 ng	50 ng	5 ng	0,5 ng
Klon 1	225	2	+	235364118	ARL4C	✓	✓	✓	✓
Klon 1	260	9	+	139816820	TRAF2	✓	✓	✓	✓
Klon 2	401	6	-	123136301	SMPDL3A	✓	✓	✓	✓

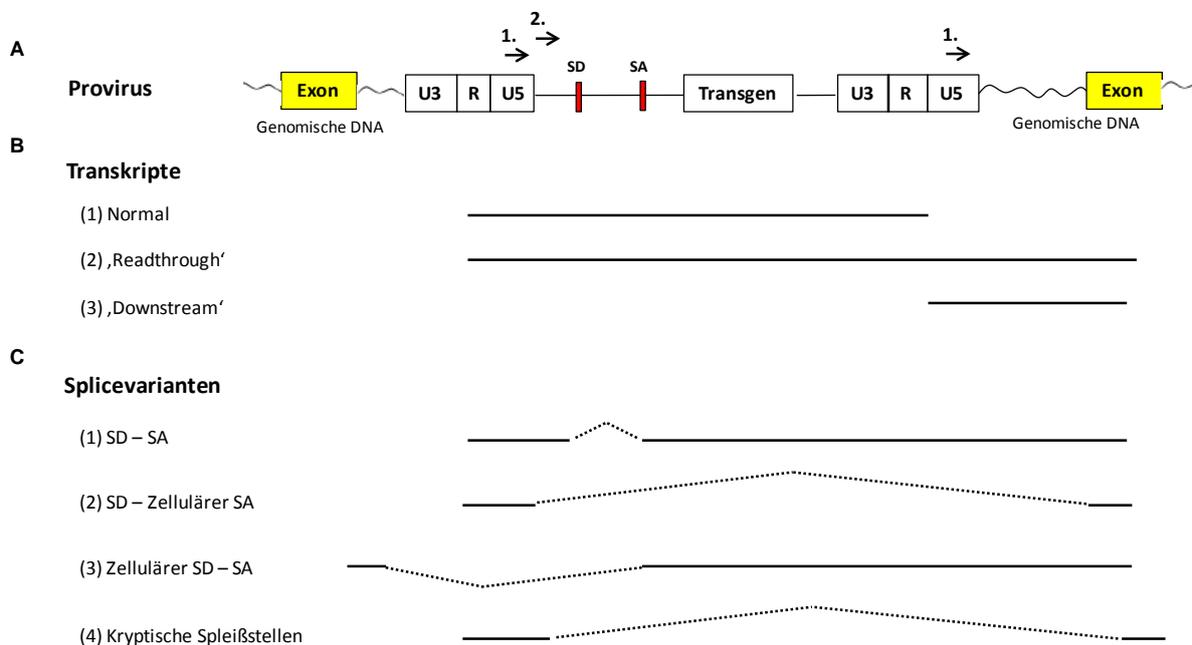
5'nrLAM-PCR									
Probe	Genomische Länge	Chrom	Sense	Lokus	RefSeq Gen	500 ng	50 ng	5 ng	0,5 ng
Klon 1	357	2	+	235364122	ARL4C	✓	✓	✓	✓
Klon 1	233	9	+	139816824	TRAF2	✓	✓	✓	✓
Klon 2	77	6	-	123136296	SMPDL3A	✓	✓	✓	✓

**Abbildung 3.2: Bestimmung des Mindesteinsatzes für die Integrationsstellenanalyse mit nrLAM-PCR.** (A) Mindesteinsatz für die Analyse polyklonaler Proben. Lentiviral transduziert murine „Lineage“-negative Zellen wurden durch nrLAM-PCR und anschließender Pyrosequenzierung analysiert. An verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion wurde der Beitrag der 10 am häufigsten detektierten Integrationsstellen ermittelt. „Rot“ unterlegt stellt dabei die am häufigsten detektierte Integrationsstelle und „lila“ unterlegt die 10. Häufigste Integrationsstelle dar. 10 ng DNA genügten für die korrekte Wiedergabe der Klonalität und die zuverlässige Detektion der Integrate mit den höchsten Beiträgen. Grau unterlegte Gene markieren Integrationsstellen, die mit unterschiedlichen Ansätzen unter den 10 stärksten Integrationsstellen an dem jeweiligen Zeitpunkt detektiert wurden. (B)+(C) Mindesteinsatz für mono-/oligoklonale Proben. Lentiviral transduzierte NK-92-Einzelzellklone mit 1 - 2 Integrationsstellen wurden durch 5'- und 3'nrLAM-PCR und anschließender Pyrosequenzierung analysiert. (B) Die gelektrophoretische Auftrennung der nrLAM-PCR Amplikons zeigte bei 0,5 ng eingesetzter DNA eine Reduktion der Ligationseffizienz. (C) Durch Sequenzierung der nrLAM-PCR Produkte konnten die Integrate dennoch eindeutig identifiziert werden. Ein Häkchen markiert die erfolgreiche Identifikation der Integrationsstelle. nrLAM-PCR, nicht-restriktive lineare amplifikationsmedierte PCR; ng, Nanogramm; d, Tage nach Transduktion; M, Marker; K, untransduzierte Kontroll-DNA; Chrom, Chromosom.

Durch Testung diverser Ligasen (DNA/RNA) und Reaktionsbedingungen konnte somit im Rahmen dieser Arbeit eine etwa 10fach erhöhte Sensitivität der nrLAM-PCR erreicht werden, zudem bei deutlich kürzerer Inkubationszeit (1 h vs. 16 - 24 h).

### 3.1.2 Nachweis chimärer Transkripte

Um die Auswirkungen retroviraler Integration auf die Genexpression zellulärer Gene quantifizieren zu können, wurde eine Methode zur Untersuchung vektorinduzierter aberranter Transkripte im Hochdurchsatzverfahren entwickelt. Intakte Retroviren und abgeleitete virale Vektoren mit vollständigen LTRs prozessieren die RNA beginnend am Start der im 5'-LTR gelegenen R Region bis zum Ende der R Region des 3'-LTRs, wo sie geschnitten und polyadenyliert wird. Erfolgt ein Überlesen der retroviralen Terminationssignale, wird die Transkription ins Wirtsgenom fortgesetzt und es kann zur Bildung viral-zellulärer Transkripte kommen. Zur transkriptomweiten Detektion dieser ‚Readthrough‘-Transkripte und resultierender viral-zellulärer Fusionstranskripte durch (nr)LAM-PCR wurden 2 Primer-Sets entworfen (**Abbildung 3.3** und **7.1 + 7.2**), die an die revers transkribierte mRNA hybridisieren. Die Primer von Set 1 liegen in der R/U5 Region des LTRs. Letztere wird bei Überlesen der Terminationssignale auch im 3'-LTR transkribiert, so dass diese Primer der Detektion von ‚Readthrough‘-Transkripten dienen. Darüber hinaus werden bei dieser Anwendung auch im 3'-LTR initiierte Transkripte erfasst. Die exponentiellen Primer des zweiten Sets hybridisieren an die U5 Region und die stromabwärts des 5'-LTRs und stromaufwärts des viralen Spleißdonors (SD) gelegene Leadersequenz. Sie dienen zur Detektion viral-zellulärer Fusionstranskripte unter Verwendung der SD bzw. nahe gelegener kryptischer Spleißstellen.



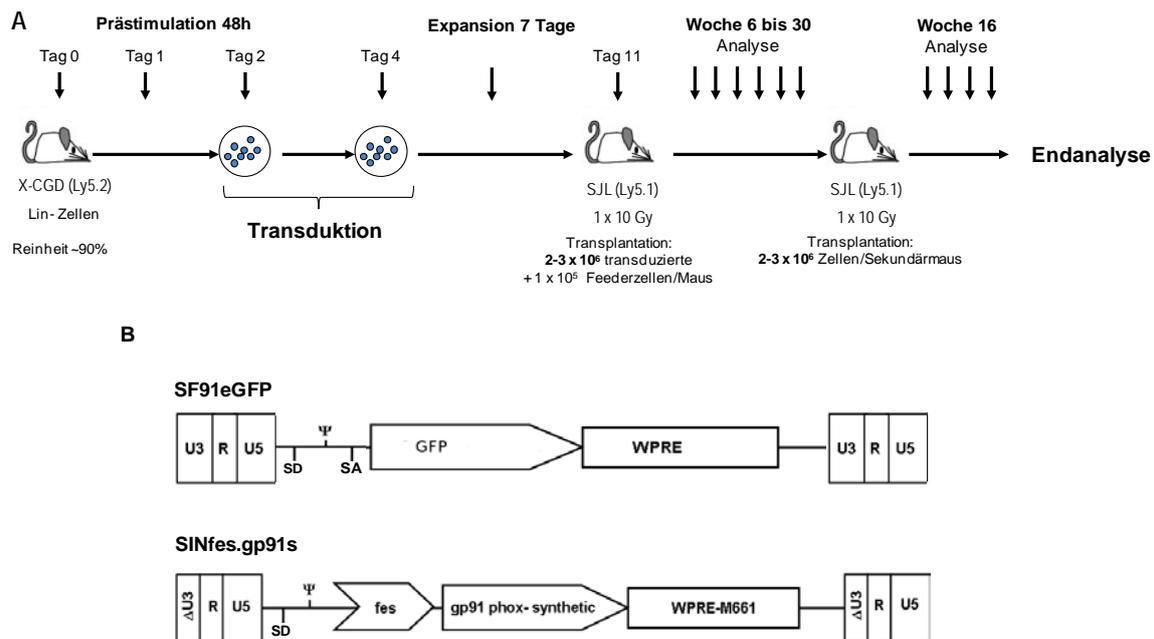
**Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Provirus und der möglichen Vektor-initiierten Transkripte und Spleißvarianten.** SD: Spleißdonor; SA: Spleißakzeptor. 1. und 2.: Lage der Primer-Sets zum Nachweis chimärer Transkripte; U3: ‚Unique 3‘; R: ‚Redundant‘; U5: ‚Unique 5‘. Die durchgezogenen Linien zeigen das mRNA Transkript, gestrichelte Linien deuten die möglichen Spleißprozesse an.

## 3.2 Sicherheitsoptimierte Retrovirale Vektoren für die Gentherapie der Septischen Granulomatose (X-CGD)

Die Anwendung neuer gentherapeutischer Vektoren erfordert eine Vielzahl pharmakokinetischer, pharmakodynamischer und toxikologischer Untersuchungen. Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit bestand aus der Charakterisierung neuer gentherapeutischer gammaretro- und lentiviraler SIN-Vektoren zur Behandlung der X-CGD. Im Rahmen multizentrischer Kooperationsprojekte zur präklinischen und klinischen Evaluation dieser Vektoren führten wir detaillierte Untersuchungen durch, die unter anderem die Analyse des klonalen Inventars der genkorrigierten Hämatopoese, Bestimmung prädominanter Klone und die Charakterisierung der viralen Integrationsstellenprofile umfassten. Aufgrund der schweren Nebenwirkungen, die in früheren klinischen X-CGD Studien durch transkriptionelle Aktivierung von *MDS1/EVI1* auftraten (Ott et al. 2006, Stein et al. 2010), waren Integrationen in diesem Locus hierbei von besonderer Relevanz und wurden zusätzlich auch unabhängig von ihrem klonalen Beitrag zur genmarkierten Hämatopoese untersucht. Die im Folgenden beschriebenen Analysen sind Bestandteil eines Antrags zur Zulassung einer gentherapeutischen klinischen Phase I/II, die vom Paul-Ehrlich-Institut am 16. Januar 2013 genehmigt wurde.

### 3.2.1 Untersuchung eines SIN-gammaretroviralen X-CGD Gentherapievektors

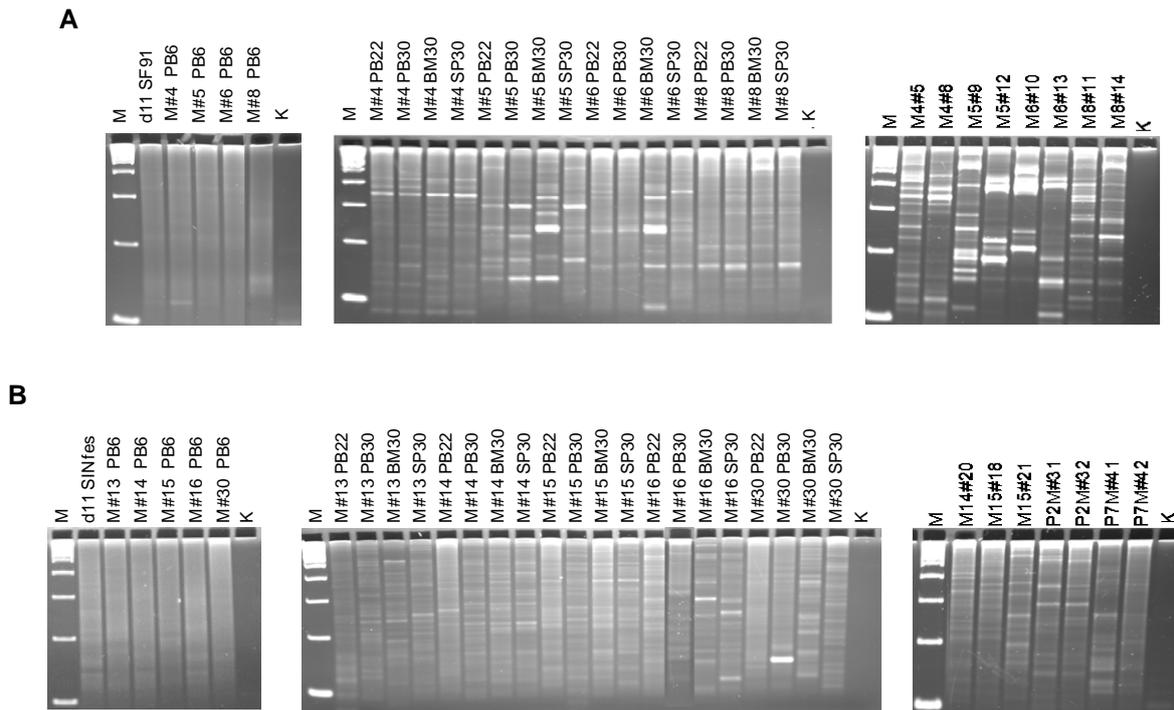
Um das Integrationsverhalten eines gammaretroviralen SIN-Vektors (SINfes.gp91s) zu verstehen und die daraus resultierende Genotoxizität einschätzen zu können, wurde in Kooperation mit Dr. Manuel Grez (GSH, Frankfurt) sukzessive das klonale Repertoire der murinen hämatopoetischen Repopulation genkorrigierter X-CGD Zellen in einer Langzeit-*in-vivo*-Studie untersucht (**Abbildung 3.4**). Der Vektor SINfes.gp91s ist mit einem internen gewebespezifischen Promotor (*c-fes*), der die Expression des Transgens in myeloide Zellen dirigiert, und einem Kodon-optimierten Transgen ausgestattet. Primäre *lin*- Knochenmarkzellen von X-CGD Mäusen wurden mit SINfes.gp91s oder mit dem SFFV LTR-getriebenen Kontrollvektor SF91eGFP transduziert und in einer Serientransplantation in primäre und sekundäre Rezipienten transplantiert. Der SF91eGFP Vektor löst klonale Dominanz und die Bildung eines Myelodysplastischen Syndroms in Patienten und Leukämien Mäusen aus (Ott et al. 2006, Modlich et al. 2008, Modlich et al. 2009, Stein et al. 2010).



**Abbildung 3.4: Versuchsaufbau einer präklinischen Langzeit-*in-vivo*-Studie zur Einschätzung des genotoxischen Potentials retroviraler Vektoren zur Genterapie der X-CGD.** (A) Zeitlicher Ablauf des Versuchs. *Lin*- X-CGD Zellen wurden mit einer ‚Multiplicity of Infection‘ (MOI) von 6,6 (SINfes.gp91s) bzw. 5,2 (SF91eGFP) transduziert und nach einer *in vitro* Expansionsphase zur Steigerung genotoxischer Effekte *in vivo* in sublethal bestrahlte Mäuse transplantiert. Die Effizienz der *ex vivo* Transduktion betrug 17,2% bei einer durchschnittlichen Vektorkopienzahl (‚Vector Copy Number‘, VCN) von 2,8 für SINfes.gp91s und 68,2% bei 1,6 Kopien pro Zelle für SF91eGFP. 30 Wochen nach Transplantation wurde Knochenmark der primären Rezipienten in sekundäre Empfänger-mäuse transplantiert. Die Endanalyse wurde 16 Wochen nach der 2. Transplantation durchgeführt. (B) Schematische Darstellung des Kontrollvektors SF91eGFP und des neuen genterapeutischen X-CGD Vektors SINfes.gp91s. X-CGD, ‚X-linked Chronic Granulomatous Disease‘; *lin*-, ‚Lineage‘-negative Stamm- und Progenitorzellen; Gy, Grey; h, Stunden; U3 und U5, einzigartige (unique) Region des 3‘-bzw. 5‘-LTR; R, wiederholte (redundante) Region;  $\psi$ , Verpackungssequenz; SD, Spleißdonor, SA, Spleißakzeptor, GFP, ‚Green Fluorescent Protein‘, WPRE, ‚Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element‘, WPRE-M661, optimiertes WPRE;  $\Delta$ U3, Deletion der U3; fes, zellulärer myeloid-spezifischer Promotor. Modifiziert aus Stein, Scholz et al. (Eingereicht bei HGT Clinical Trials)

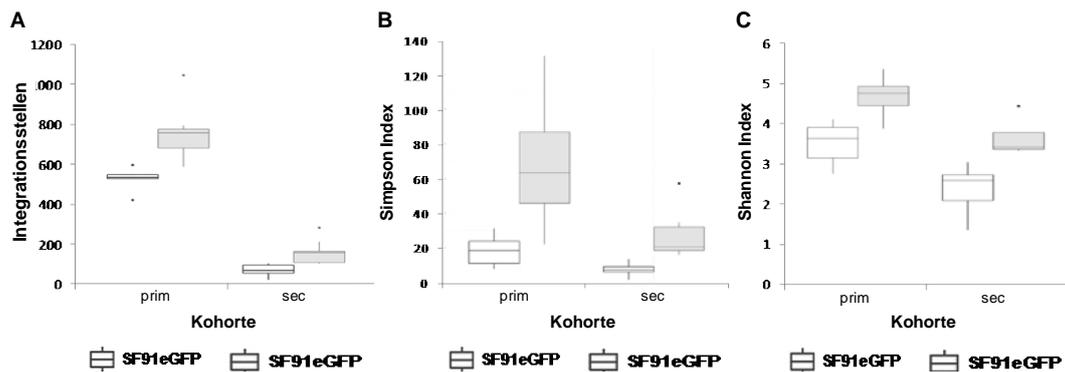
### 3.2.1.1 Klonalität der genkorrigierten hämatopoetischen Repopulation *in vivo*

Um zu beantworten, ob eine vektorvermittelte klonale Selektion *in vivo* stattgefunden hat, wurde das klonale Inventar der genmodifizierten Hämatopoese in Prätransplantproben 11 Tage nach Transduktion sowie in Blut-, Milz- und Knochenmarkproben primärer und sekundärer Rezipienten an verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation durch LM- und LAM-PCR in Kombination mit Hochdurchsatzsequenzierung analysiert. Insgesamt wurden vier (SF91eGFP) bzw. fünf (SINfes.gp91s) primäre Mäuse und deren jeweilige Nachkommenschaft untersucht (8 bzw. 7 sekundäre Mäuse). Die Klonalitätsanalyse der genmodifizierten Hämatopoese durch hochauflösende Gelelektrophorese der LM- und LAM-PCR Amplikons zeigte in allen SINfes.gp91s Mäusen ein polyklonales Muster. Bei den SF91eGFP Kontrollmäusen konnte dagegen eine deutliche Abnahme der Klonalität insbesondere in sekundären Mäusen beobachtet werden (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5: LM-/LAM-PCR Klonalitätsanalyse primärer und sekundärer Rezipienten von (A) SF91eGFP und (B) SINfes.gp91s transduzierten ‚Lineage‘-negativen X-CGD Zellen.** Gezeigt sind exemplarische hochauflösende Spreadex-Gelbilder repetitiver Klonalitätsanalysen. Jeweils 250 ng DNA aus peripherem Blut, Knochenmark oder Milzgewebe dienten als Ausgangsmaterial für LM- bzw. LAM-PCR Analysen. SINfes.gp91s-Rezipienten zeigten bis zum letzten analysierten Zeitpunkt eine polyklonale hämatopoetische Repopulation. Im Gegensatz dazu wurde in den Kontrolltieren (SF91eGFP) eine deutliche Abnahme der Klonalität beobachtet. M, 100 bp Marker; M#, Maus, -C, untransduzierte Kontroll-DNA; PB, peripheres Blut; BM, Knochenmark; SP, Milz; LAM-PCR, Lineare amplifikationsmedierte PCR.

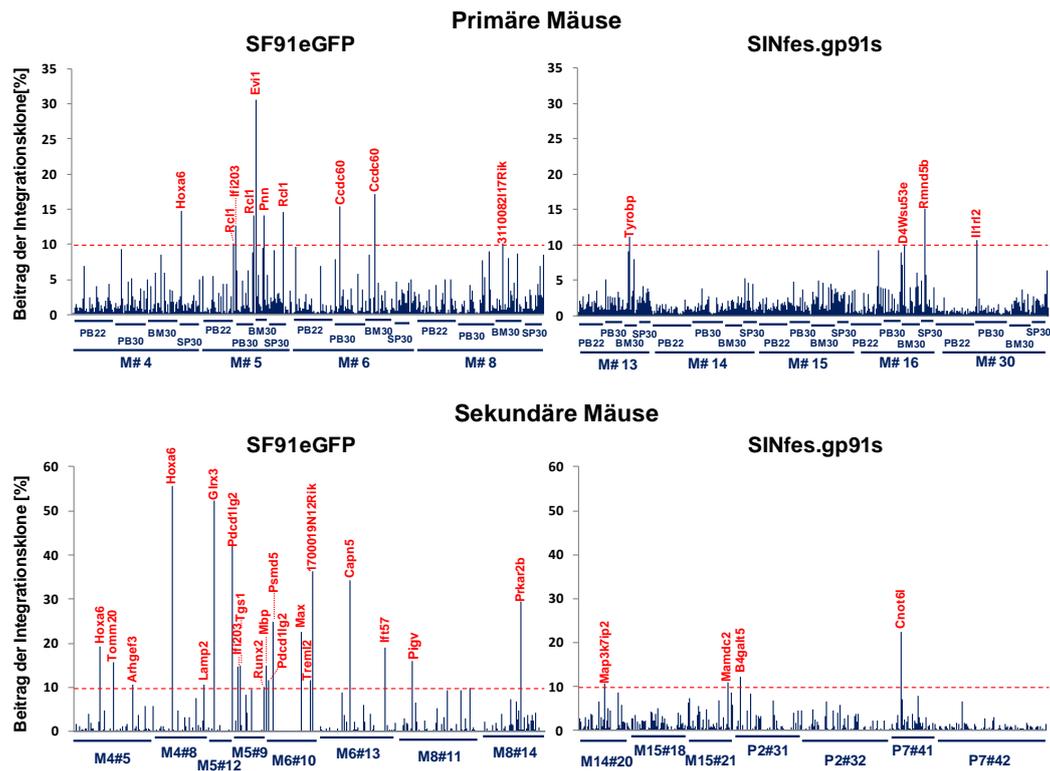
LM-/LAM-PCR in Kombination mit Hochdurchsatzsequenzierung ergab insgesamt 5968 SINfes.gp91s bzw. 2755 SF91eGFP Integrationsstellen. In der primären Kohorte wurden durchschnittlich 482 Integrationsstellen pro SF91eGFP Maus und 714 Integrationsstellen pro SINfes.gp91s Maus detektiert. In der sekundären Kohorte betragen diese Werte 75 (SF91eGFP) bzw. 162 (SINfes.gp91s) (**Abbildung 3.6A**). Unter Berücksichtigung der Transduktionseffizienz und Vektorkopienzahl (‚Vector Copy Number‘, VCN) konnten für die SINfes.gp91s Mäuse signifikant mehr Integrationsstellen detektiert werden ( $p = 4 \times 10^{-15}$ ;  $\chi^2$ -Test), was auf eine heterogenere Blutbildung hinweist. Um die Heterogenität der Proben genauer einschätzen zu können, wurden desweiteren zwei Diversitätsindizes, der Shannon und der Simpson Index, angewendet (Shannon et al. 1949, Simpson 1949). Die Bestimmung der beiden Indizes ergab in beiden Fällen höhere Werte für den SINfes.gp91s Vektor, womit eine homogenere Häufigkeitsverteilung der Integrate sowie eine größere Vielfalt der genkorrigierten Zellpopulation bestätigt wurden (**Abbildung 3.6B und C**).



**Abbildung 3.6: Analyse der Heterogenität der hämatopoetischen Repopulation in primären und sekundären Rezipienten genmodifizierter hämatopoetischer Stammzellen. (A)** Zahl der detektierten Integrationsstellen pro Rezipient. **(B)** Der Simpson Index indiziert eine klonale Dominanz, wobei ein niedriger Wert eine hohe klonale Dominanz bedeutet. **(C)** Die Vielfalt eines Systems, die in diesem Fall der Klonalität entspricht, wurde mithilfe des Shannon Index bestimmt. Prim, primäre Kohorte; sec, sekundäre Kohorte.

Um insertionsmedierte dominante Klone zu detektieren, wurden die Beiträge der einzelnen Integrationsstellen untersucht. Zur Identifikation dieser Klone wurde die Sequenzierhäufigkeit einzelner Insertionsstellen verwendet. Der Grenzwert wurde auf 10% Integrationsfrequenz festgelegt. Bei den SF91eGFP transplantierten Kontrolltieren wurden ab 22 Wochen nach Transplantation vermehrt dominante Klone detektiert. Besonders auffällig war ein *Evi1* Klon in der primären Maus #5, der einen relativen Beitrag von über 30% leistete. In den sekundären Rezipienten wurden mehrere dominante Klone beobachtet, die zum Teil über 50% der genmarkierten Hämatopoese bildeten (*Hoxa6* und *Glx3*). *Hoxa6* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Genexpression, Morphogenese und Differenzierung reguliert. *Glx3* gehört zur Familie der Glutaredoxin Oxidoreduktasen und spielt eine Rolle bei der Apoptose und dem Zellwachstum.

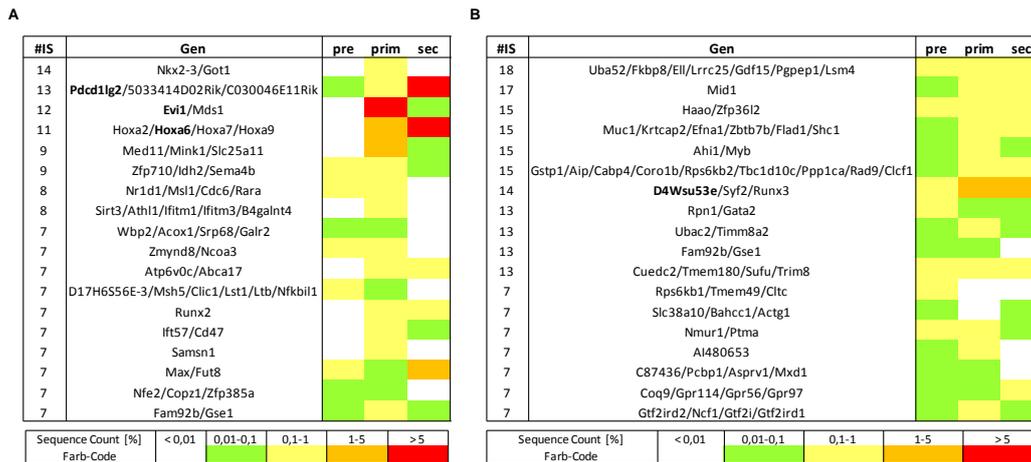
Bei SINfes.gp91s-transplantierten Tieren wurde sowohl in primären als auch in sekundären Rezipienten eine polyklonale hämatopoetische Repopulation festgestellt, in der nur wenige Klone einen stärkeren Beitrag leisteten. In den primären SINfes.gp91s Mäusen wurden 4 dominante Klone mit Integrationsstellen in oder in der Nähe von *Il1rl2* (10,1%), *D4Wsu53e* (10,7%), *Tyrobp* (11%) oder *Rmnd5b* (15%) detektiert. Die betroffenen Gene sind an der Immunantwort (*Il1rl2* und *Tyrobp*) oder der Zellteilung (*Rmnd5b*) beteiligt. Zur Funktion des von *D4Wsu53e* kodierten Proteins ist bislang noch nichts bekannt. Drei dieser Klone (*Tyrobp*, *Rmnd5b* und *D4Wsu53e*) wurden auch in den entsprechenden sekundären Mäusen detektiert, jedoch mit sinkenden Beiträgen. Auch in den sekundären SINfes.gp91s Mäusen wurden 4 dominante Klone detektiert: *Map3k7ip2* (10,7%), *Mamdc2* (10,9%), *B4galt5* (12,2%) und *Cnot6I* (22,3%). Diese Klone wurden entweder gar nicht oder mit geringem Beitrag in weiteren sekundären Mäusen detektiert, die Zellen von der jeweils gleichen primären Maus erhielten. Die Funktionen der Gene spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion (*Map3k7ip2*), Peptid-Vernetzung (*Mamdc2*), metabolischen Prozessen (*B4galt5*) und der Transkription (*Cnot6I*). Die Ergebnisse weisen auf eine geringe Selektion durch den SINfes.gp91s Vektor hin (**Abbildung 3.7**).



**Abbildung 3.7: Relativer Beitrag einzelner Integrationsstellen in der genkorrigierten Hämatopoese von X-CGD Mäusen.** Die Beiträge der Integrationsstellen wurden mit Hilfe des von der Sequenzierung erhaltenen relativen ‚Sequence Counts‘ abgeschätzt. Die gestrichelte rote Linie markiert den willkürlich gewählten Grenzwert von 10% zur Detektion prädominanter Integrate. Die Namen der Gene von prädominanten Integrationsstellen sind angegeben. PB, ‚Peripheral Blood‘; BM, ‚Bone Marrow‘, SP, ‚Spleen‘; M, primäre Maus; P, Pool aus dem Knochenmark primärer Mäuse; X-CGD, ‚X-linked Chronic Granulomatous Disease‘.

### 3.2.1.2 Charakterisierung bevorzugter Integrationsorte

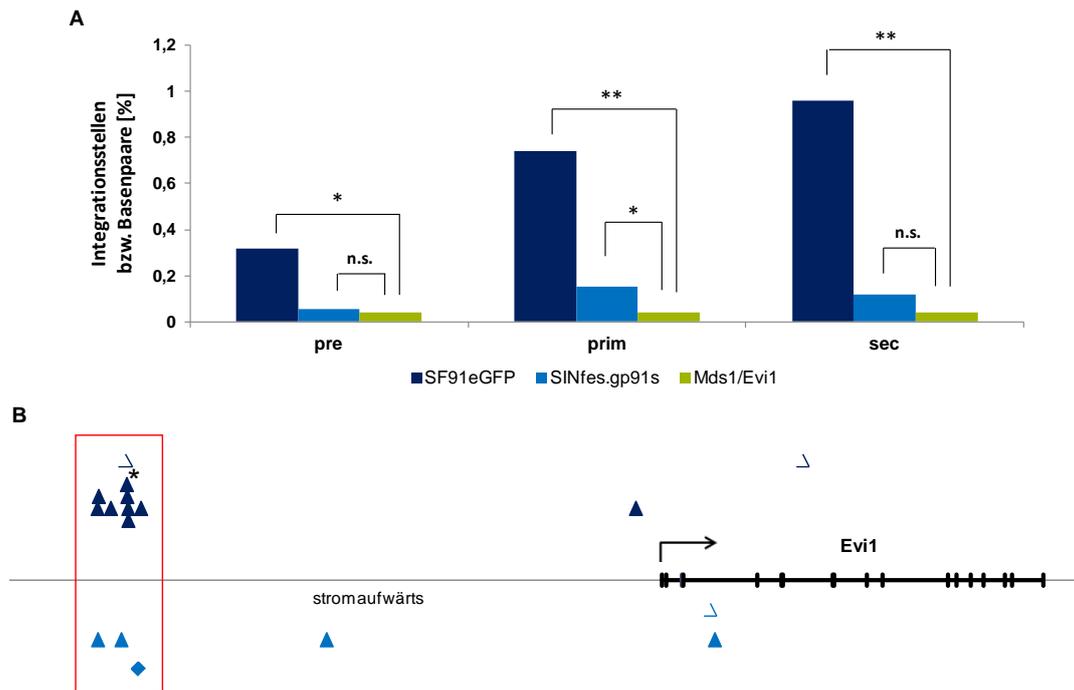
Um festzustellen, ob bestimmte Genloki wie z.B. Protoonkogene bei der Integration favorisiert bzw. *in vivo* selektioniert werden, wurden bevorzugte Integrationsorte (‚Common Integration Sites‘, CIS) durch folgende Definition ermittelt: 2 Integrationsstellen lokalisiert innerhalb eines 30 kb-Fensters im Wirtsgenom bilden eine CIS 2. Ordnung, 3 Integrate innerhalb von 50 kb eine CIS 3. Ordnung, 4 Integrate innerhalb von 100 kb eine CIS 4. Ordnung und 5 oder mehr Integrationsstellen innerhalb von 200 kb eine CIS 5. oder höherer Ordnung. Die Zahl der Integrationsstellen, die sich in CIS befand, zeigte unter Berücksichtigung der Gesamtzahl der detektierten Integrationsstellen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem SF91eGFP und SINfes.gp91s Vektor. Unter den CIS des SF91eGFP Vektors wurden viele der dominanten Integrate gefunden, was auf eine mögliche klonale Selektion hindeutet. Die am häufigsten detektierten SF91eGFP Klone mit Integrationen in *Pcd1lg2*, *Evi1* und *Hoxa6* waren alle Teil bevorzugter Integrationsloki. Unter den CIS des SINfes.gp91s Vektors wurde dagegen nur der dominante Klon mit einer Integration in *D4Wsu53* gefunden (**Abbildung 3.8**).



**Abbildung 3.8: Darstellung der bevorzugten Integrationsorte und deren Beitrag zur Hämatopoese für (A) SF91eGFP- und (B) SINfes.gp91s-transplantierte Mäuse.** Für SF91eGFP konnten insgesamt 12 Integrationsstellen in den Genloki *MDS1* und *EVI1* detektiert werden. Weitere bevorzugte Genloki, die zu hohen klonalen Beiträgen führten, waren *Pdcd1lg2/5033414D02Rik/C030046E11Rik* mit 13 Integrationsstellen und das *Hoxa* Cluster mit 11 Integrationsstellen. Der einzige bevorzugte Integrationslokus des SINfes.gp91s Vektors, der einem dominanten Klon zugeordnet werden konnte, war *D4Wsu53e/Syf2/Runx3* mit insgesamt 14 Integrationsstellen. Gene, die prädominante Integrationsstellen enthalten, sind fett markiert. #IS: Anzahl der Integrationsstellen; pre: Prätransplantprobe; prim: primäre Rezipienten; sec: sekundäre Rezipienten.

Die detaillierte Analyse der *Mds1/Evi1* Integrate zeigte, dass mit dem SINfes.gp91s Vektor sowohl in den Prätransplantproben als auch in den beiden Mauskohorten signifikant weniger Integrate als mit dem SF91eGFP Vektor gefunden wurden ( $p < 0,5$ ;  $\chi^2$ -Test). Der Vergleich des Anteils der *Mds1/Evi1*-Integrate mit der Größe des Lokus und der daraus zu erwartenden Wahrscheinlichkeit einer Integration in diesem Bereich zeigte, dass mit dem SINfes.gp91s Vektor nur in den primären Mäusen signifikant mehr *Mds1/Evi1* Integrate detektiert wurden ( $p = 0,011$ ,  $\chi^2$ -Test). Mit dem SF91eGFP Vektor wurden bereits in der Prätransplantprobe signifikant mehr *Mds1/Evi1* Integrate detektiert ( $p = 0,034$ ), deren Anteil in der primären und sekundären Mauskohorte weiter anstieg ( $p < 0,0000000001$ ).

Um herauszufinden, ob der Unterschied in der Frequenz der detektierten *Mds1/Evi1*-Integrate auf eine niedrigere Integrationspräferenz des SINfes.gp91s Vektors in diesem Genlokus oder auf eine potentiell geringere Vektor-vermittelte Selektion zurückzuführen ist, wurde die genaue Lage der *Evi1* Integrate bestimmt, die die Mehrheit der Integrationen im *Mds1/Evi1*-Lokus darstellten. Über 80% der SF91eGFP Integrate lagen etwa 90 kb stromaufwärts von *Evi1* in einem 7 kb großen Bereich. Obwohl insgesamt deutlich weniger SINfes.gp91s Integrate im *Evi1* Lokus detektiert wurden, zeigte sich auch hier ein ähnliches Muster mit geringfügigen Abweichungen (**Abbildung 3.9**). Jedes der SINfes.gp91s Integrate wurde nur in vereinzelt Proben und mit Beiträgen unter 0,3% detektiert. Ein SINfes.gp91s Integrat in diesem Bereich wurde bereits in der Prätransplantprobe detektiert, während alle *Evi1* Integrate des SF91eGFP Vektors erst nach der Transplantation detektierbar waren.



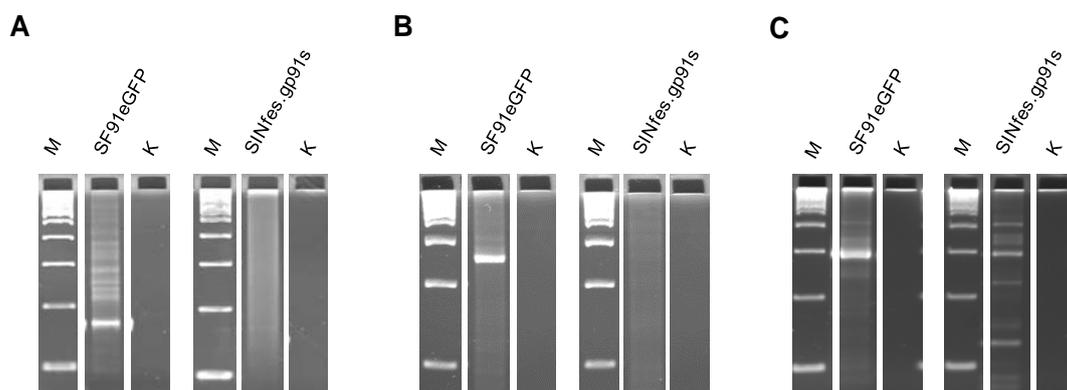
**Abbildung 3.9: Integrationsstellen in oder in der Nähe des *Mds1/Evi1* Lokus. (A)** Anteil der Integrate im *Mds1/Evi1* Lokus im Vergleich zur Größe des Lokus. Mit SF91eGFP wurden sowohl in der Prätransplantprobe als auch in den beiden Mauskohorten mit steigenden Anteilen signifikant mehr *Mds1/Evi1* Integrate detektiert, während mit dem SINfes.gp91s Vektor nur in den primären Mäusen eine signifikante Überrepräsentation ( $p=0,011$ ) festgestellt wurde. Die Sterne markieren signifikante ( $<0,5$ ) durch  $\chi^2$ -Test bestimmte p-Werte. n.s., nicht signifikant. **(B)** Lokalisation der *Evi1* Integrate. Mit beiden Vektoren konnte eine Ansammlung der Integrationsstellen vorwiegend 90 kb stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle detektiert werden (roter Kasten). In der Prätransplantprobe des SF91eGFP Vektors wurde kein Integrat im *Evi1* Lokus detektiert. ‚Hellblau‘, SINfes.gp91s; ‚dunkelblau‘, SF91eGFP; ‚Raute‘, Prätransplant; ausgefüllte Dreiecke, primäre Mäuse; nicht ausgefüllte Dreiecke, sekundäre Mäuse; der Stern markiert die dominante *Evi1*-Integration in SF91eGFP Mäusen; X-CGD, ‚X-linked Chronic Granulomatous Disease‘; kb, Kilobasenpaare.

### 3.2.1.3 Transformationspotential

Um das genotoxische Potential der Vektoren zu bestimmen, wurde die vektorvermittelte funktionelle Transformation einer IL-3-abhängigen Zelllinie genutzt: die Frequenz IL-3 unabhängiger Kolonien repräsentiert das Transformationspotential eines Vektors (Li et al. 2009). Stein et al. zeigten, dass die Expression des *GP91PHOX* Transgens vermutlich nicht zum genotoxischen Potential des Vektors beiträgt, so dass für das folgende Experiment ein Vektor mit *eGFP* als Transgen (SINfes.eGFP) verwendet wurde. Als Kontrolle wurde der gleiche Vektor wie zuvor benutzt (SF91eGFP), dessen Transduktionseffizienz in den durchgeführten Experimenten jedoch verhältnismäßig niedrig war ( $<11\%$ ). In keinem Experiment wurden IL-3-unabhängige Klone beobachtet, weder mit SINfes.eGFP noch mit SF91eGFP. Da sich das Transformationspotential der beiden Vektoren unter diesen Bedingungen unter der Detektionsgrenze dieses Assays befand, wurde der Grenzwert des jeweils möglichen Transformationspotentials auf Basis der GFP-positiven Zellen und der VCN bestimmt:  $<3,2 \times 10^{-6}$  für SINfes.eGFP und  $<93,4 \times 10^{-6}$  für SF91eGFP.

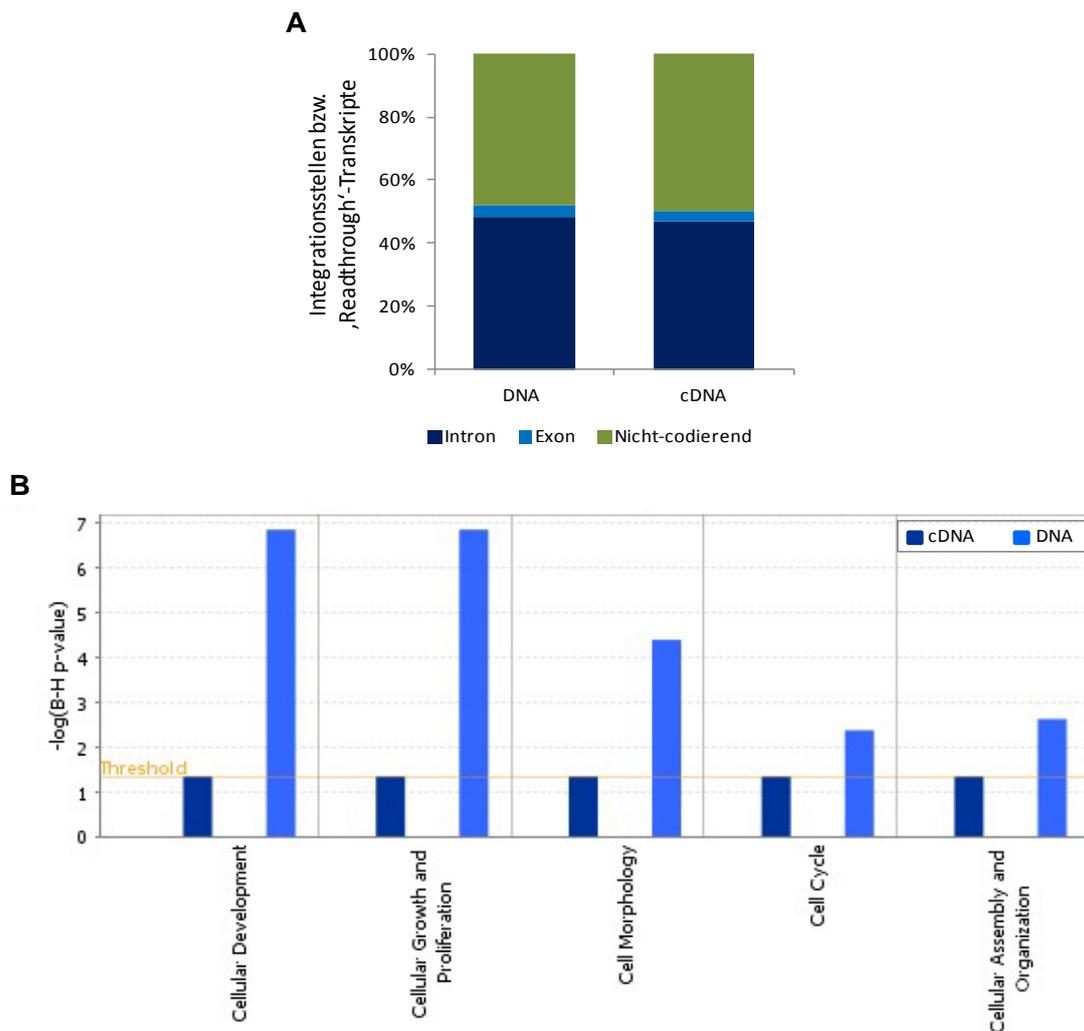
### 3.2.1.4 Inzidenz chimärer Transkripte

Um herauszufinden, welche Auswirkungen der sicherheitsoptimierte SIN-gammaretrovirale X-CGD Vektor SINfes.gp91s auf die zelluläre Genexpression von X-CGD Zellen hat, wurden hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (*lin*<sup>-</sup>) aus dem Knochenmark von X-CGD Mäusen mit dem Vektor SINfes.gp91s sowie dem Vergleichsvektor SF91eGFP transduziert. Der Anteil Vektor-positiver Zellen wurde 6 Tage nach Transduktion durch FACS bestimmt und betrug 48% bei SINfes.gp91s-transduzierten Zellen und 52% bei SF91eGFP-transduzierten Zellen. 14 Tage nach Transduktion wurde DNA und RNA aus den Zellen isoliert und durch LAM-PCR mit DNA bzw. cDNA als Ausgangsmaterial auf Integrationsstellen und aberrante, viral-zelluläre Transkripte untersucht. Das Bandenmuster der LAM-PCR Amplikons zeigte bei beiden transduzierten Zellpools eine polyklonale Situation, wobei die Analyse der SF91eGFP-transduzierten Zellen auf eine geringere Heterogenität hindeutete (**Abbildung 3.10A**). Durch Hochdurchsatz-Sequenzierung der LAM-PCR Produkte konnten 117 SF91eGFP- und 312 SINfes.gp91s-Integrationsstellen identifiziert werden. Die Analyse der chimären Transkripte zeigte, dass sowohl mit SF91eGFP als auch mit SINfes.gp91s häufig ‚Readthrough‘-Transkription stattfand (**Abbildung 3.10B**). Es konnten 74 SF91eGFP und 23 SINfes.gp91s viral-zelluläre ‚Readthrough‘-Transkripte identifiziert werden. Trotz der höheren Anzahl an detektierbaren Integraten konnten somit signifikant weniger chimäre ‚Readthrough‘-Transkripte mit dem SIN-gammaretroviralen Vektor SINfes.gp91s als mit dem Voll-LTR Vektor SF91eGFP nachgewiesen werden ( $p = 6,9 \times 10^{-35}$ , bestimmt durch  $\chi^2$ -Test). Chimäre Fusionstranskripte wurden mit beiden gammaretroviralen Vektoren nur wenige detektiert (6 mit SF91eGFP und 2 mit SINfes.gp91s) (**Abbildung 3.10C**).



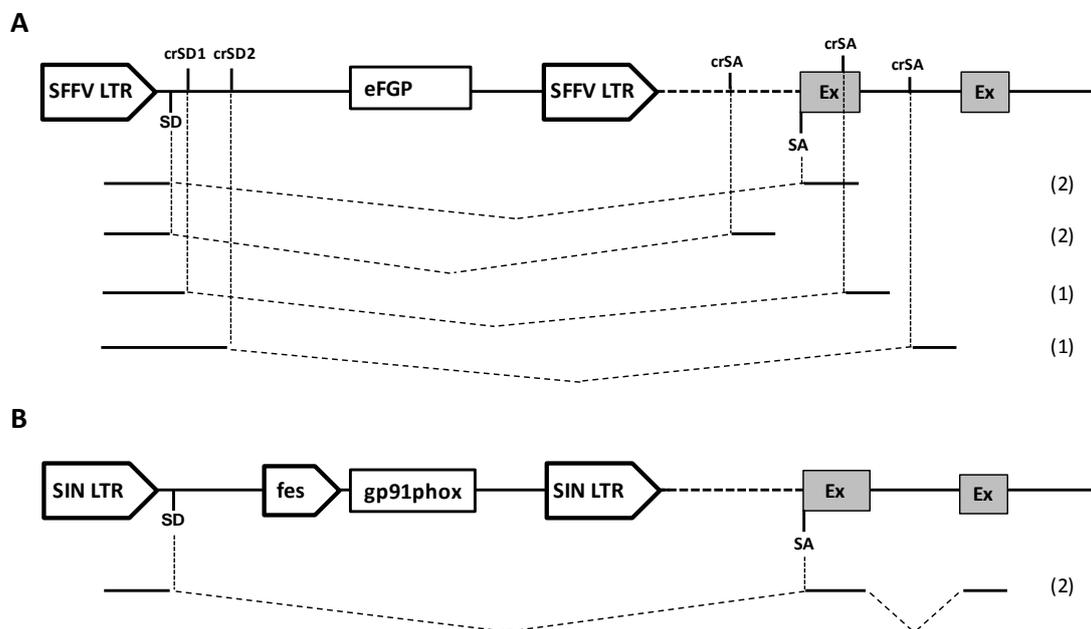
**Abbildung 3.10: Analyse der Integrationsstellen und chimären Transkripte in SF91eGFP bzw. SINfes.gp91s-transduzierten *lin*<sup>-</sup> X-CGD Zellen 14 Tage nach Transduktion. (A) Integromanalyse durch LAM-PCR.** 200 ng DNA wurden durch LAM-PCR mit den Restriktionsenzymen Tsp509I und MseI (SF91eGFP) bzw. durch 3'LAM-PCR mit den Enzymen NlaIII und HaeIII (SINfes.gp91s) analysiert. Gezeigt sind repräsentative Spreadex-Gelanalysen. **(B)+(C) Analyse von chimären (B) ‚Readthrough‘- und (C) Fusionstranskripten.** 150 ng cDNA wurden durch LAM-PCR (MseI) untersucht. Zahlreiche ‚Readthrough‘-Transkripte resultierten in nur wenigen viral-zellulären Spleißprodukten. X-CGD: ‚X-linked Chronic Granulomatose Disease‘, *lin*<sup>-</sup>, ‚Lineage‘-negativ; LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR.

Die Inzidenz gammaretroviraler ‚Readthrough‘-Transkription in genkodierenden und nicht-kodierenden Regionen war korrelierte mit der Integratanzahl (**Abbildung 3.11A**). Die Analyse der funktionellen Genklassen der von ‚Readthrough‘-Transkription betroffenen Gene zeigte eine Anreicherung in den Kategorien ‚Cellular Development‘, ‚Cellular Growth and Proliferation‘, ‚Cell Morphology‘, ‚Cell Cycle‘ und ‚Cellular Assembly and Organization‘. Die gleichen funktionellen Genklassen waren auch bei der Analyse der gammaretroviralen Integrationsstellen überrepräsentiert (**Abbildung 3.11B**).



**Abbildung 3.11: ‚Readthrough‘-Transkription gammaretroviraler Vektoren. (A)** Vergleich der Verteilung gammaretroviraler (SINfes.gp91s und SF91eGFP) Integrationsstellen und ‚Readthrough‘-Transkripte in genkodierenden und nicht-kodierenden Bereichen. **(B)** Überrepräsentierte funktionelle Genklassen der von ‚Readthrough‘-Transkription betroffenen Gene. Mit Hilfe der ‚Ingenuity Pathways Analysis‘ Software (IPA) wurde die Funktion der von ‚Readthrough‘-Transkription betroffenen Gene untersucht und die überrepräsentierten Genklassen mit den von der Integration betroffenen Genklassen verglichen. Gezeigt sind die überrepräsentierten Genklassen der ‚Readthrough‘-Transkription nach Bonferroni-Holmes (B-H) Korrektur der Fisher’s Exact Test  $p$ -Werte. Als Grenzwert für eine statistische Signifikanz (*Threshold*) wurde B-H  $p < 0,05$  festgesetzt (gelbe Linie).

Die Sequenzanalyse der Fusionstranskripte ergab, dass im SF91eGFP Vektor drei verschiedene Spleißdonorstellen verwendet wurden: neben dem bekannten viralen Spleißdonor (4 Transkripte) wurden zwei weitere kryptische Spleißdonoren 20 bp und 67 bp stromabwärts des kanonischen Spleißdonors benutzt (jeweils 1 Transkript). Ferner wurden im Wirtsgenom zwei bekannte Exonspleißakzeptoren der Gene *4931406C07Rik* und *Clgn* verwendet, sowie vier kryptische Spleißakzeptoren in Exons (*Rn45s*), Introns (*Kansl1*) und nicht-kodierenden Regionen (**Abbildung 3.12**). Die zellulären kryptischen Spleißakzeptoren in genkodierenden Regionen wurden in Zellen gefunden, in denen das Provirus in entgegengesetzter Orientierung zum zellulären Gen vorlag. Die Funktionen der Gene umfassten Prozesse in der Zelldifferenzierung (*Clgn*), Translation (*Rn45s*) und Chromatinmodifikation (*Kansl1*). Die SINfes.gp91s Fusionstranskripte gingen beide vom viralen Spleißdonor zu bekannten Spleißakzeptoren betroffener Gene (*Vma5a* und *Copb1*), die bei der Tumorsuppression (*Vma5a*) und Virus-Wirt-Interaktion (*Copb1*) eine Rolle spielen. Die Integrationsklone, die zu viral-zellulären Fusionstranskripten führten, wurden auf DNA-Ebene nicht detektiert, was darauf hinweist, dass die aberranten Transkripte den Zellen keinen Wachstumsvorteil verliehen. Die Ergebnisse deuten zudem auf eine Verminderung chimärer Transkripte mit dem SINfes.gp91s Vektor gegenüber dem SF91eGFP Vektor hin.



**Abbildung 3.12: Vektor-induzierte viral-zelluläre Fusionstranskription mit (A) SF91eGFP und (B) SINfes.gp91s.** In SF91eGFP-transduzierten Zellen wurden sechs chimäre Fusionstranskripte unter Verwendung verschiedener kanonischer und kryptischer Spleißstellen gefunden. In SINfes.gp91s-transduzierten Zellen wurden zwei chimäre Fusionstranskripte detektiert, die beide unter Verwendung kanonischer Spleißstellen gebildet wurden. In Klammern ist die Anzahl unterschiedlicher Transkripte angegeben, die vom jeweiligen Typ detektiert wurden. SD, Spleißdonor; SA, Spleißakzeptor; crSD/crSA, kryptischer Spleißdonor/-akzeptor; Ex, Exon.

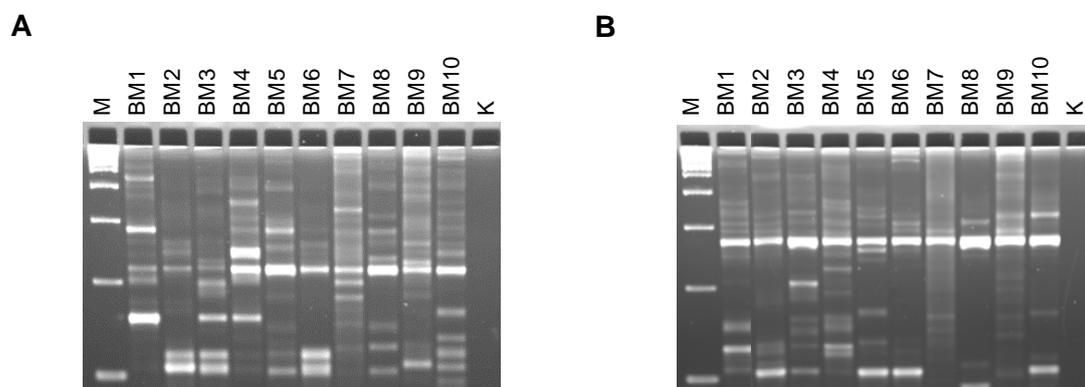
### 3.2.2 Untersuchung SIN-lentiviraler X-CGD Gentherapievektoren

Um die biologische Sicherheit SIN-lentiviraler X-CGD Vektoren beurteilen zu können, wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Adrian Thrasher und Prof. Dr. Bobby Gaspar (UCL, London, UK) zwei ähnliche SIN-lentivirale Vektoren unter präklinischen und klinischen Bedingungen analysiert. Die Expression des Kodon-optimierten Transgens wird in diesen Vektoren von einem chimären *c-fes/Cathepsin G* Promotor reguliert, der die effektive Expression des therapeutischen Gens in myeloiden Zellen vermittelt (Santilli et al. 2011).

#### 3.2.2.1 Charakterisierung eines SIN-lentiviralen Integrationsstellenprofils *in vivo*

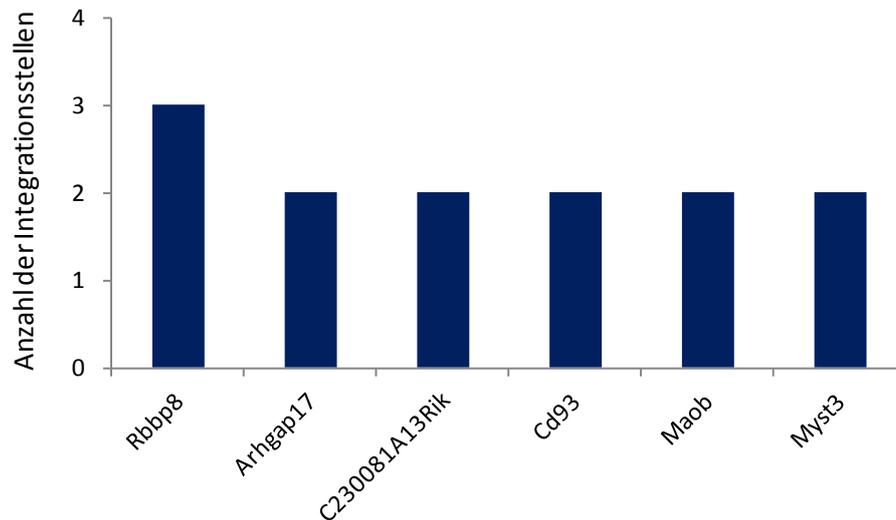
Um das Integrationsprofil des SIN-lentiviralen Vektors pCCL.CHIM.gp91phox.WPRE zu bestimmen, wurde das klonale Inventar der genkorrigierten Hämatopoese in einem X-CGD Mausmodels *in vivo* untersucht. Primäre *lin*- X-CGD Zellen wurden transduziert und in sublethal bestrahlte Mäuse transplantiert (BM 5 - 10). Die Vektorkopienzahl („Vector Copy Number“, VCN) lag zwischen 0,1 und 1 und der Anteil gp91phox-positiver Zellen zwischen 4% und 30%. Sekundäre Rezipienten erhielten Knochenmarkzellen von primär transplantierten Tieren (BM 1 - 4; VCN = 0,12 - 0,44; gp91phox-positiv: 4 - 56%).

Zur Charakterisierung des Integrationsstellenprofils wurde das Knochenmark von 6 primären und 4 sekundären Rezipienten vier Monate nach Transplantation durch LAM-PCR und nachfolgende Pyrosequenzierung untersucht. Die LAM-PCR Analyse erbrachte für die meisten Mäuse aufgrund der geringen Genmarkierung nur wenige Integrate – mit Ausnahme von Maus 7, bei der ein polyklonales Muster beobachtet wurde (**Abbildung 3.13A und B**). Die Sequenzierung der LAM-PCR Produkte ergab zwischen 9 und 96 eindeutig identifizierbare Integrationen pro Maus. Insgesamt wurden 195 eindeutige Integrationsstellen identifiziert.



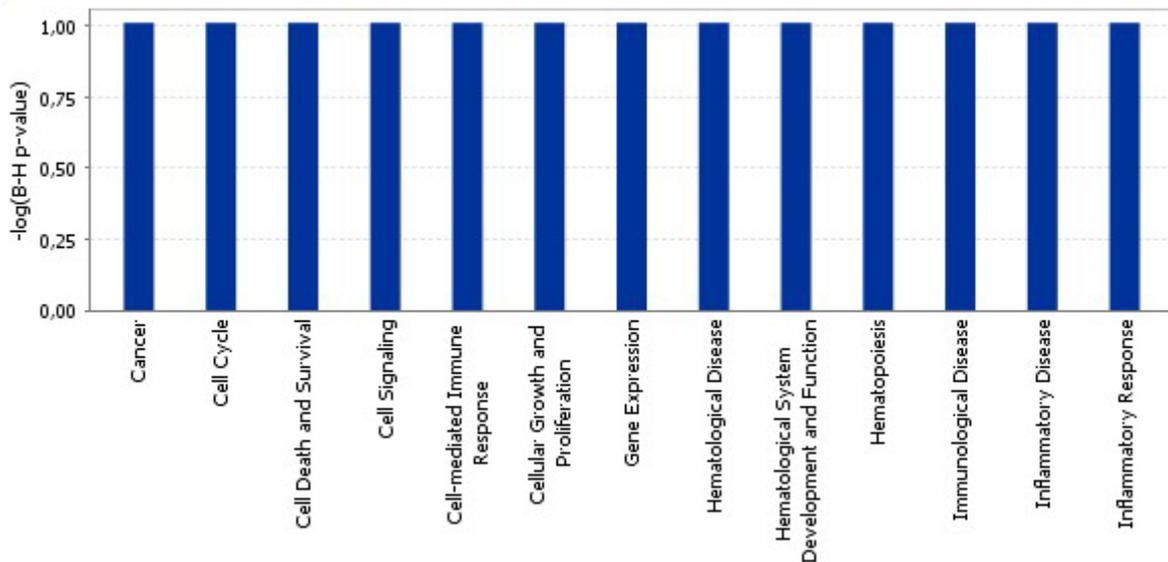
**Abbildung 3.13: LAM-PCR Analyse lentiviral transduzierter X-CGD Zellen *in vivo*.** 250 ng DNA aus dem Knochenmark primär (BM 5 - 10) und sekundär (BM 1 - 4) transplantiertter Mäuse dienten als Ausgangsmaterial für die LAM-PCR Analyse mit den Restriktionsenzymen **(A)** *MseI* und **(B)** *Tsp509I*. M, 100 bp Marker; K, untransduzierte Kontroll-DNA; BM, Knochenmark; LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; X-CGD, ‚X-linked Chronic Granulomatose Disease‘.

Um potentiell genotoxische Eigenschaften des Vektors zu identifizieren, wurden die detektierten Integrationsloki auf die Anwesenheit von Protoonkogenen und bevorzugte Integrationsorte untersucht. Die Analyse ergab keine Integrate im *Mds1/Evi1* Locus. Auch in anderen bekannten Protoonkogenen wie *Prdm16*, *Camta1*, *Stat3* oder *Lmo2*, die in klinischen gammaretroviralen X-CGD Studien bevorzugte Integrationsorte darstellten und durch Insertionsmutagenese an klonaler Selektion und Tumorbildung beteiligt waren, konnten keine Integrate detektiert werden. Insgesamt wurden 6 Genloki gefunden, die Ziel bevorzugter Integration waren (**Abbildung 3.14**), wobei keines der betroffenen Gene als Protoonkogen bekannt ist. Die höchste CIS beinhaltete 3 Integrationsstellen und erstreckte sich von Intron 3 bis Intron 6 des Gens *Rbbp8* (*Retinoblastoma binding protein 8*), dessen Produkt möglicherweise als Tumorsuppressor fungiert. Auffallend war zudem das Auftreten von 2 Integrationen im Gen *Cd93*, welches ein myeloid-spezifischer Zellmarker ist.



**Abbildung 3.14: Bevorzugte Integrationsorte eines SIN-lentiviralen X-CGD Vektors.** Insgesamt wurden 13 Integrationsstellen in bevorzugten Integrationsorten detektiert. Die höchste CIS mit 3 Integrationsstellen ist in *Rbbp8* lokalisiert, dessen Genprodukt eventuell ein Tumorsuppressor ist. Der *CD93* Genlocus, in dem zwei Integrationsstellen detektiert wurden, ist ein spezifischer Zellmarker für myeloide Zellen. : 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. SIN, ‚Self-Inactivating‘; X-CGD, ‚X-linked Chronic Granulomatous Disease‘. CIS, ‚Common Integration Site‘; kb, Kilobasenpaare.

Um herauszufinden, ob eine bevorzugte Integration in bestimmten Genklassen stattgefunden hatte, wurde mit Hilfe der ‚Ingenuity Pathways Analysis‘ (IPA) Software die Funktion der zur Integrationsstelle nächstgelegenen Gene ermittelt. In keiner der untersuchten Kategorien konnte nach Bonferroni-Holmes Korrektur der Fisher’s Exact *p*-Werte eine Anreicherung festgestellt werden (**Abbildung 3.15**).



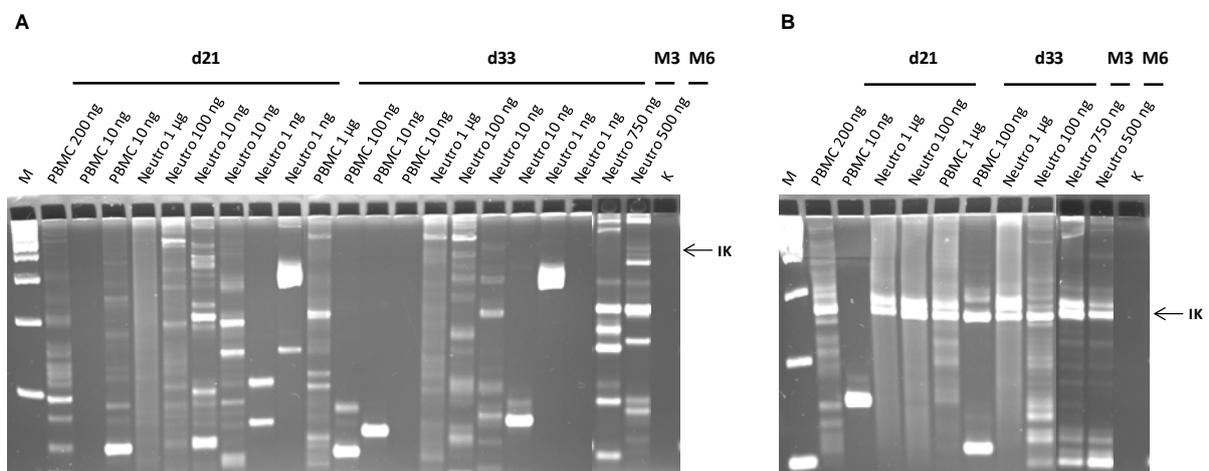
**Abbildung 3.15:** ‚Ingenuity Pathways Analysis‘ (IPA) der von der Integration betroffenen Genklassen. Die x-Achse gibt die Genklassen an, die untersucht wurden. Der Signifikanzwert der untersuchten Genklassen ist auf der y-Achse angegeben. Keine der Genklassen zeigte eine signifikante Überrepräsentation. Als Grenzwert für eine statistische Signifikanz wurde  $p < 0,05$  nach einer Bonferroni-Holmes (B-H) Korrektur der Fisher’s Exact Test  $p$ -Werte festgesetzt.

### 3.2.2.2 Untersuchung der genkorrigierten Hämatopoese nach klinischer Gentherapie

Um die Sicherheit und Effizienz des lentiviralen Gentransfers einzuschätzen, wurde das klonale Inventar nach SIN-lentiviraler X-CGD Gentherapie im humanen System untersucht. Neben der detaillierten Analyse des klonalen Repertoires und der Charakterisierung des Integrationsstellenprofils im humanen hämatopoetischen System sollten neue Erkenntnisse über den Einfluss genetischer Faktoren auf die Integration erworben werden. Die genterapeutische Behandlung eines X-CGD Patienten im ‚Great Ormond Street Hospital for Children‘ (**Abschnitt 1.5.4**) erfolgte mit dem Vektor pCCL.CHIM.gp91s – dem präklinischen SIN-lentiviralen Vektor sehr ähnlich (**Abschnitt 3.1.1**). Das klonale Inventar der genkorrigierten Hämatopoese dieses Patienten wurde im Rahmen dieser Arbeit sukzessive analysiert.

Die Transduktionseffizienz der transplantierten Zellen betrug 23%. Der Zeitraum der Analyse erstreckte sich von Tag 21 bis 6 Monate nach Transplantation. Nach diesem Zeitpunkt war keine Genmarkierung mehr detektierbar. Der Anteil an CD34+ Stamm- und Vorläuferzellen war bei der Transduktion sehr gering, so dass ein effizientes ‚Homing‘ Langzeit-aktiver Zellen in dem Patienten nicht gegeben war (persönliche Kommunikation mit Prof. A. Thrasher und Prof. B. Gaspar). An den frühen Zeitpunkten nach Transplantation, Tag 21 und Tag 33 (d21 und d33), wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (‚Peripheral Blood Mononuclear Cells‘, PBMC) sowie neutrophile Granulozyten analysiert. 3 und 6 Monate nach Gentherapie (M3 und

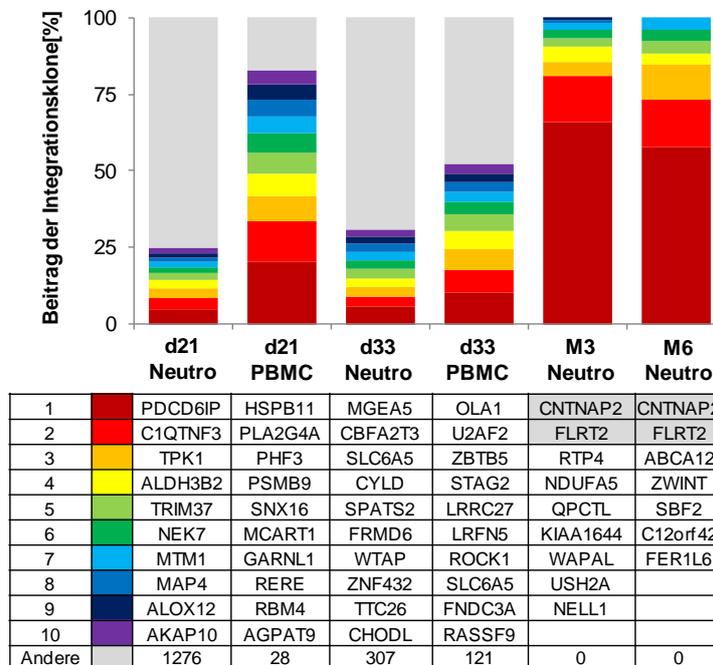
M6) wurde die neutrophile Zellfraktion untersucht. Zur Durchführung einer differenzierten Integrationsstellenanalyse wurden 1 ng – 1 µg DNA der Proben bidirektional (in 5'- und 3'-Richtung, 2D) durch LAM-PCR unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme (*MseI*, *TspI*, *FatI* und *HaeIII*) sowie mit 2DnrLAM-PCR untersucht. Die Analyse der LAM-PCR Amplikons mit Hilfe hochauflösender Gelelektrophorese zeigte an den frühen Zeitpunkten ein polyklonales Muster, während an den späteren Zeitpunkten nur noch vereinzelte Banden zu sehen waren. Verdünnungen der Proben zur frühzeitigen Detektion prädominanter Klone zeigten keine durchgehenden Banden (**Abbildung 3.16**). (nr)LAM-PCR Produkte aus den Analysen von 100 ng - 1 µg wurden zur Identifikation der Integrationsstellen Hochdurchsatzsequenziert.



**Abbildung 3.16: Klonalitätsanalyse durch LAM-PCR.** LAM-PCRs wurden mit den Enzymen *MseI*, *Tsp509I*, *FatI* und *HaeIII* auf 1 ng - 1 µg DNA durchgeführt. Gezeigt sind beispielhaft die repräsentativen Analysen (**A**) einer 5'-LAM-PCR mit *FatI* und (**B**) einer 3'-LAM-PCR mit *MseI*. Die Verdünnungsstufen sollten helfen dominante Klone frühzeitig sichtbar zu machen. Die Analyse zeigte zu Beginn eine polyklonale Repopulation des hämatopoetischen Systems, während nach 3 - 6 Monaten nur noch wenige Integrationsstellen detektierbar waren. Prädominante Klone wurden an keinem Zeitpunkt beobachtet. LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; M, 100 bp Marker; K, nicht-transduzierte Kontroll-DNA; d, Tage nach Transplantation; M, Monate nach Transplantation; IK, internes Vektorkontrollfragment.

Die Analyse der Integrationsstellen durch (2Dnr)LAM-PCR gefolgt von der Pyrosequenzierung erbrachte 1869 eindeutig zuordenbare Integrationsstellen. Die meisten Integrationsstellen wurden an den ersten beiden Zeitpunkten in der Fraktion der neutrophilen Granulozyten detektiert. Bereits nach 33 Tagen nahm die Zahl der detektierbaren Integrationsstellen deutlich ab (**Abbildung 3.17**). Die klonalen Beiträge einzelner Integrationsstellen wurden mit Hilfe des relativen ‚Sequence Counts‘ abgeschätzt. **Abbildung 3.17** zeigt die zehn am häufigsten detektierten Integrationsstellen in den verschiedenen Fraktionen und an den jeweiligen Zeitpunkten. Eine Manifestation einzelner Integrationsklone über die Zeit wurde nicht beobachtet. Die zwei an den letzten beiden Zeitpunkten detektierten Klone mit dem höchsten

Beitrag (*CNTNAP2* (*contactin associated protein-like 2*) und *FLRT2* (*fibronectin leucine rich transmembrane protein 2*)) waren zuvor nicht detektierbar. Insgesamt konnten an diesen Zeitpunkten nur 9 (M3) bzw. 7 (M6) Integrationsstellen detektiert werden.



**Abbildung 3.17: Analyse des Beitrags der einzelnen Integrationsklone über die Zeit.** 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. ‚Grau‘ markierte Gennamen weisen daraufhin, dass die Integrationsstelle an mehreren Zeitpunkten zu den 10 stärksten Integrationsstellen zählte. d: Tage nach Genthherapie; M: Monate nach Genthherapie; Neutro, Neutrophile Granulozyten; PBMC, ‚Peripheral Blood Mononuclear Cells‘.

Die Untersuchung der Integrate hinsichtlich des *MDS1/EVI1* Locus zeigte, dass kein detektierbarer Klon mit einer Integrationsstelle in *EVI1* vorhanden war. In *MDS1* wurde eine Integrationsstelle in Intron 2 gefunden. Diese leistete an Tag 33 einen relativen Beitrag von 0,19% und konnte an keinem anderen Zeitpunkt detektiert werden. Die weitere Analyse der Integrationen in Protoonkogenen ergab vier Integrationsstellen in *STAT3* und drei weitere in *STAT5B*, zwei Vertretern des JAK-STAT Signalweges, der zur Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Homöostase beiträgt. Diese Integrationsstellen bildeten zusammen mit zwei weiteren Integrationsstellen im Gen *ATP6V0A1* (*ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit a1*) einen bevorzugten Integrationsort (9 Integrationsstellen innerhalb von ~255 kb). Jede der an dieser CIS beteiligten Integrationsstellen wurde jeweils nur an einem Zeitpunkt in einer Fraktion mit klonalen Beiträgen zwischen 0,006 und 2,3% detektiert (**Abbildung 3.18**).

Gen	Integrationsstelle			PBMC		Neutrophils			
	Chrom	Sense	Loc	d21	d33	d21	d33	M3	M6
MDS1	3	+	169058556						
STAT5B	17	+	40389136						
STAT5B	17	-	40403552						
STAT5B	17	-	40409902						
STAT3	17	+	40503739						
STAT3	17	-	40505946						
STAT3	17	+	40507678		1,599				
STAT3	17	+	40534059						
ATP6V0A1	17	+	40625539						
ATP6V0A1	17	+	40643535				2,261		

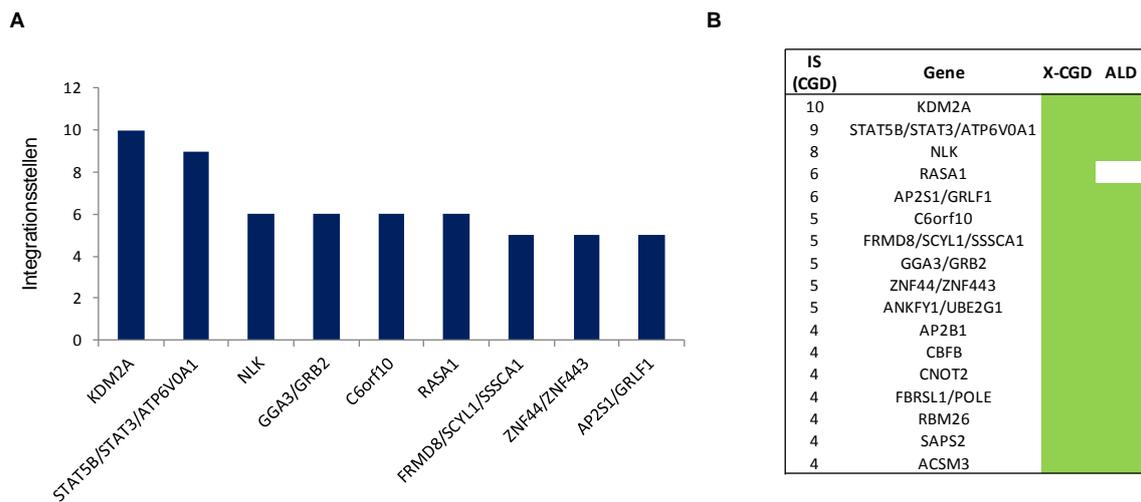
  

Sequence Count[%]	<0,01	0,01-0,1	0,1-1	1-5	>5
Farb-Code				2	

**Abbildung 3.18: Integrationen in Protoonkogenen und deren Beitrag zur hämatopoetischen Repopulation.** Es wurde eine Integration in Intron 2 von *MDS1* detektiert. Insgesamt 7 Integrationsstellen wurden in den Protoonkogenen *STAT5B* und *STAT3* detektiert, die zusammen mit 2 weiteren Integrationsstellen in *ATP6V0A1* einen bevorzugten Integrationsort markieren. Der Beitrag dieser Integrationsstellen ist gezeigt. PBMC, ‚Peripheral Blood Mononuclear Cells‘; Chrom, Chromosom; Sense, Orientierung des integrierten Vektors; Loc, Integrationslokus; d, Tag; M, Monat; CIS, ‚Common Integration Site‘.

Die weitere Analyse der bevorzugten Integrationsorte ergab 351 Integrationsstellen (21%), die sich in CIS bis 10. Ordnung befanden (**Abbildung 3.19A**). Die Analyse der Funktion der Gene zeigte, dass die Gene der höchsten CIS (>5. Ordnung) hauptsächlich in transkriptionellen Prozessen involviert sind. Darüber hinaus besitzen diese Gene eine hohe Aktivität in BM CD34+ Zellen. Die Beobachtung dieser CIS könnte somit das Resultat der Integrationspräferenz lentiviraler Vektoren in aktiv transkribierten Genen darstellen.

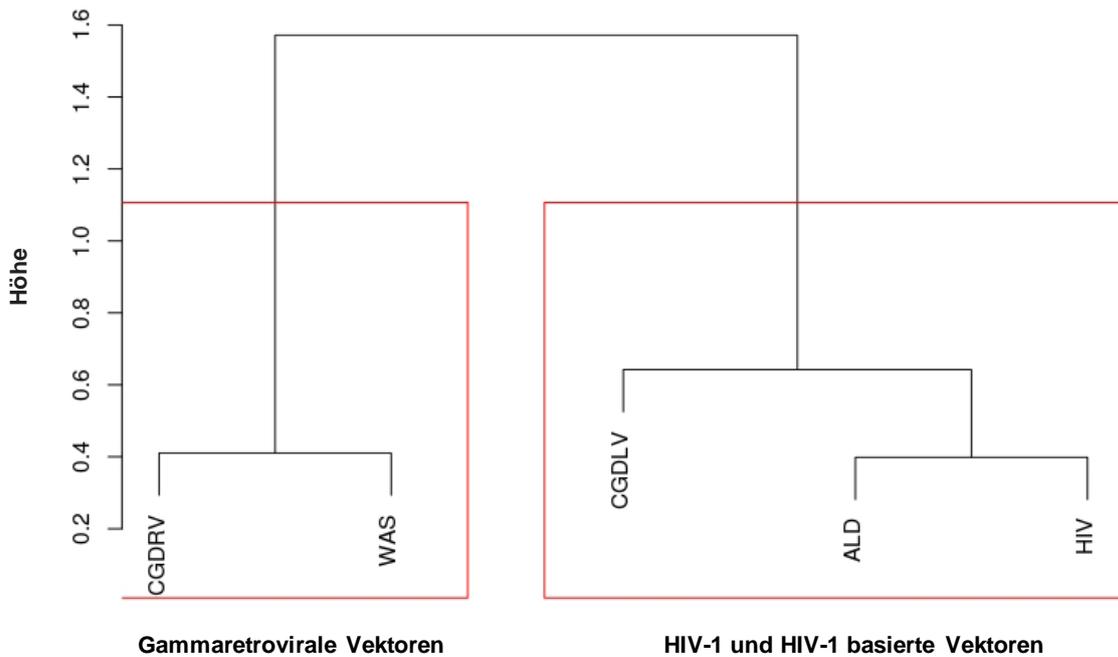
Um zu überprüfen, ob alle beobachteten CIS auf die allgemeine Integrationspräferenz lentiviraler Vektoren zurückzuführen sind, wurden die CIS Gene mit den bevorzugten Integrationsloki verglichen, die in einer SIN-lentiviralen ALD Studie detektiert wurden (Cartier et al. 2009). CIS 2. und 3. Ordnung wurden aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit einer zufälligen CIS Bildung niedriger Ordnung bei dieser Zahl an Integrationsstellen nicht beachtet. 94% der Gene stellten in beiden Studien bevorzugte Integrationsorte dar (**Abbildung 3.19B**). *RASA1* repräsentierte den einzigen bevorzugten Integrationsort, der ausschließlich in dem X-CGD Patienten vorkam. In diesem Locus wurden 6 Integrationen detektiert, die sich in einem Bereich von 182 kb befanden. Die Integrate waren sowohl stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle als auch in Intronsequenzen (Intron 4, 5 und 7) lokalisiert. Das Genprodukt ist ein GTPase Aktivator und führt zur Inaktivierung des Protoonkogens *RAS p21*. Es ist an der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung beteiligt.



**Abbildung 3.19: Bevorzugte Integrationsorte des SIN-lentiviralen X-CGD Vektors. (A)** Bevorzugte Integrationsorte, in denen 5 und mehr Integrationsstellen innerhalb von 200 kb gefunden wurden, sind gezeigt. **(B)** Vergleich lentiviraler CIS in Gentherapiestudien zu X-CGD und ALD. 84% der Gene waren in beiden Studien bevorzugtes Ziel der Integration. Ein CIS 2. Ordnung beschreibt die Lokalisation von zwei Integrationsstellen innerhalb einer Distanz von maximal 30 kb, ein CIS der 3. Ordnung drei Integrationsstellen innerhalb 50 kb und ein CIS 4. Ordnung vier Integrationsstellen innerhalb 100 kb. CIS der Ordnung 5 und höher setzen sich aus 5 bzw. der entsprechenden Anzahl an Integrationsstellen in einem genomischen Bereich von 200 kb zusammen. SIN, ‘Self inactivating’; CIS: ‘Common Integration Site’; X-CGD: ‘X-linked Chronic Granulomatous Disease’; ALD: Adrenoleukodystrophie; kb, Kilobasenpaare.

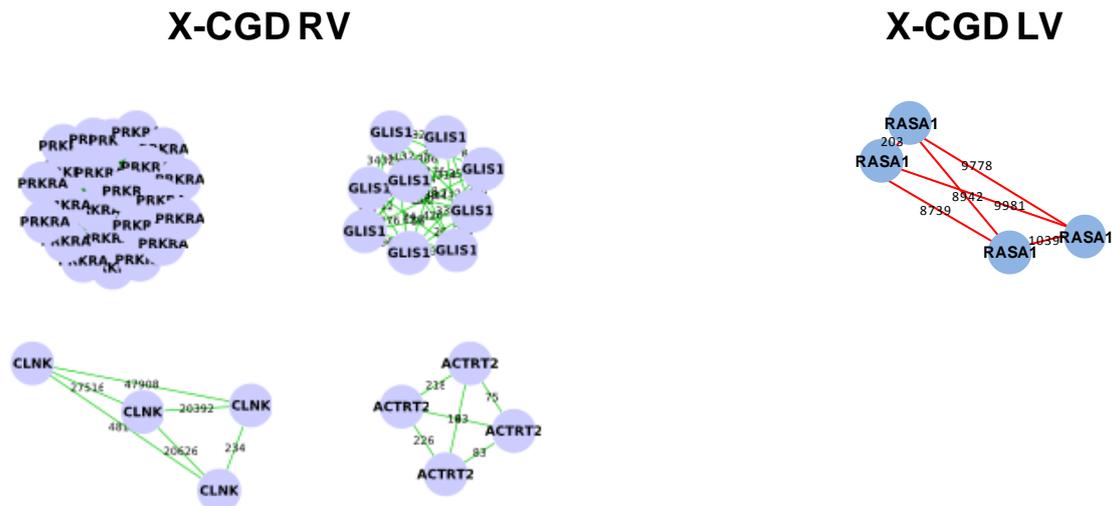
### 3.2.2.3 Einfluss genetischer Faktoren auf die Integration

Um zu überprüfen, ob der Integrationsort vom genomischen Profil der X-CGD mitbestimmt wird, wurde das Integrationsstellenprofil des lentiviral therapierten X-CGD Patienten (X-CGD LV) mit dem der Patienten der Frankfurter gammaretroviralen X-CGD Studie (X-CGD RV) (Ott et al. 2006, Stein et al. 2010) verglichen. Um allgemeine und virusspezifische Charakteristika ausschließen zu können, wurden Daten von HIV Patienten (Wang et al. 2007), der lentiviralen ALD Studie (Cartier et al. 2009) und einer gammaretroviralen WAS Studie (Boztug et al. 2010) für den Vergleich hinzugezogen. Zunächst wurde eine vergleichende CIS Analyse durchgeführt, um die Verwandtschaft der Integrationsstellenprofile zu bestimmen. Für diese Analyse wurden jeweils zwei Vektoren miteinander verglichen, wobei nur CIS berücksichtigt wurden, in denen der Abstand zwischen zwei Integrationsstellen (des gleichen Vektors oder von verschiedenen Vektoren) weniger als 30 kb betrug. Die Gesamtgröße der CIS war hierbei nicht limitiert. Um vergleichbare Datensätze zu erhalten, wurden aus jedem Datensatz 1800 Integrationsstellen extrahiert, die der vergleichenden CIS Analyse unterzogen wurden. Auf Basis des prozentualen CIS-Anteils, der sich aus Integrationsstellen beider Vektoren zusammensetzte, wurden die Verwandtschaftsgrade der Vektoren zueinander bestimmt und ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. **Abbildung 3.20** zeigt, dass sich die Integrationsstellenprofile der Studien entsprechend des Virustyps in ein gammaretrovirales und ein lentivirales Cluster aufteilen.



**Abbildung 3.20: Phylogenetischer Stammbaum gammaretro- und lentiviraler Gentransfervektoren.** Die Integrationsprofile der lentiviralen X-CGD Studie und einer gammaretroviralen X-CGD Studie wurden mit einer gammaretroviralen WAS Studie, einer lentiviralen ALD Studie und dem Integrationsstellenprofil von HIV mit Hilfe einer vergleichenden CIS-Analyse analysiert. Die Höhe gibt basierend auf dem Anteil gemeinsamer CIS die Differenz zwischen den Vektoren an. CIS, ‚Common Integration Site‘; CGDRV, gammaretrovirale X-CGD Studie; CGDLV, lentivirale X-CGD Studie; X-CGD, ‚X-linked Chronic Granulomatous Disease‘; WAS, Wiskott-Aldrich-Syndrom; ALD, Adrenoleukosystrophie; HIV, Humanes Immundefizienzvirus.

Im Folgenden wurden mit diesen Datensätzen die allgemeinen und virusspezifischen CIS bestimmt und die zugehörigen Integrationsstellen in den Profilen der X-CGD Patienten maskiert. Ein Vergleich der daraus resultierenden minimalen Integrationsstellenprofile der X-CGD Patienten ergab keine allgemein X-CGD spezifischen CIS (**Abbildung 3.21**). Insgesamt ergaben sich 5 CGD RV- und 1 CGD LV-spezifischer Integrationsort. Das einzige X-CGD LV-spezifische Cluster befand sich in dem schon zuvor beobachteten Genlokus *RASA1*. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es keine allgemeinen X-CGD-spezifischen Integrationsorte gibt, in denen unabhängig vom verwendeten Vektor bevorzugte Integration stattfindet.



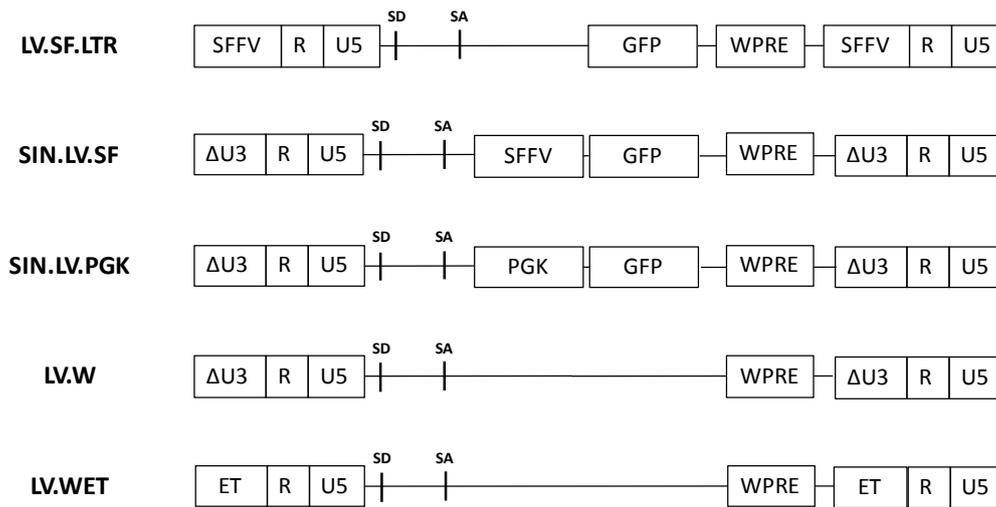
**Abbildung 3.21: Vergleich X-CGD spezifischer bevorzugter Integrationsorte.** Nach Abzug der bevorzugten Integrationsorte, die allen retroviralen Vektoren gemein sind (gammaretro- und lentiviral), wurden die verbleibenden bevorzugten Integrationsorte der lentiviralen und einer gammaretroviralen X-CGD Studie verglichen. Es wurden keine bevorzugten Integrationsorte gefunden, die exklusiv in den beiden X-CGD Studien vorkamen. Jeder Kreis steht für eine Integrationsstelle in bzw. in der Nähe des angegebenen Gens. Integrationsstellen, die weniger als 30 kb voneinander entfernt liegen, sind mit einer Linie verbunden. Die Distanz zwischen 2 Integraten ist angegeben. X-CGD, ‚X-linked Chronic Granulomatous Disease‘; RV, Gammaretroviral; LV Lentiviral; kb, Kilobasenpaare.

### 3.3 Funktionelle Integromanalyse lentiviraler Vektoren

Um die Vektorbiologie lentiviraler Vektoren besser zu verstehen und den Einfluss diverser Vektor- und Sicherheitselemente auf die Integration und Transkription zu definieren, wurden die Integrationsprofile verschiedener lentiviraler Vektorsysteme analysiert und deren Transkriptom auf viral-zelluläre Transkripte und vektorvermittelte Deregelung der zellulären Genexpression untersucht.

#### 3.3.1 Molekulare Auswirkungen einzelner Vektorelemente

Zur Untersuchung des Einflusses einzelner lentiviraler Vektorelemente auf das Integrationsstellenprofil und die Bildung viral-zellulärer Fusionstranskripte wurde uns im Rahmen einer Kooperation mit dem ‚San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy‘, Mailand, Italien freundlicherweise eine Reihe lentiviral transduzierter muriner Stamm- und Progenitorzellen (*lin*<sup>-</sup>) zur Verfügung gestellt (**Abbildung 3.22**). Die Zellen wurden bis zu 60 Tage in Kultur gehalten und an verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion durch funktionelle Integrationsstellenanalyse untersucht.



**Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der untersuchten Vektoren (provirale Form).** SFFV, Verstärker/Promotor des ‚Spleen Focus Forming Virus‘, SD, Spleißdonor, SA, Spleißakzeptor, GFP, ‚Green Fluorescent Protein‘, WPRE, ‚Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element‘, ΔU3, Deletion der U3; PGK, Promotor der Phosphoglyceratkinase, ET, leberspezifischer muriner Transthyretin Promotor; U3 und U5, einzigartige (unique) Region des 3‘-bzw. 5‘-LTR; R, wiederholte (redundante) Region.

### 3.3.1.1 Heterogenität transduzierter Zellpopulationen

Für eine longitudinale Integrationsstellenanalyse wurde 14, 30, 45 und 60 Tage nach Transduktion DNA aus diesen Zellen isoliert und die exakt gleiche Menge durch 2DnrLAM-PCR analysiert. Insgesamt konnten 5159 (LV.SF.LTR), 9414 (SIN.LV.SF), 8461 (SIN.LV.PGK), 5033 (LV.W) und 6719 (LV.WET) eindeutig zuordenbare Integrationsstellen detektiert werden. Eine Übersicht der Anzahl der Integrationsstellen an den verschiedenen Zeitpunkten, den Eckdaten der Sequenzierung und den VCNs ist **Tabelle 3.1** zu entnehmen. Die Analyse der von der Sequenzierung erhaltenen Integrationsstellen zeigte am frühesten Zeitpunkt unter Berücksichtigung der VCNs in allen Proben eine hohe Diversität. Über die Zeit wurde eine Reduktion der Anzahl individueller Integrationsstellen bei LV.SF.LTR transduzierten Zellen beobachtet (**Tabelle 3.1 A und B**).

**Tabelle 3.1: Integrationsstellenanalyse lentiviral transduzierter ‚Lineage‘-negativer Mauszellen durch nrLAM-PCR. (A) Übersicht der detektierten Integrationsstellen. (B) Vergleich der Diversität der Proben 14 Tage nach Transduktion unter Berücksichtigung der VCN. Die Bestimmung der VCN erfolgte an diesem Zeitpunkt über qPCR. d, Tag; VCN, ‚Vector Copy Number‘; nrLAM-PCR, nicht-restriktive lineare amplifikationsmedierte PCR, qPCR, quantitative PCR.**

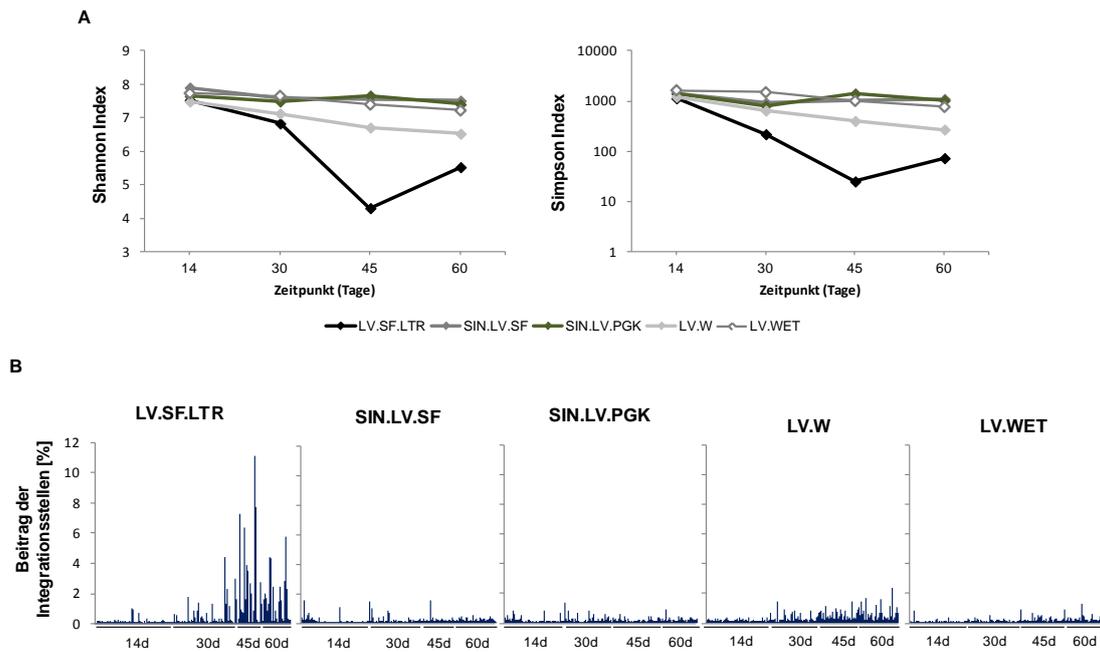
**A**

Probe	14d		30d		45d		60d		Total
Vektor	Sequenzen	IS	Sequenzen	IS	Sequenzen	IS	Sequenzen	IS	IS
LV.SF.LTR	4554	2463	4802	1957	5203	772	4574	1040	5159
SIN.LV.SF	5570	3454	5531	2848	5619	2754	8474	2938	9414
SIN.LV.PGK	3721	2531	5304	2727	5581	2857	5532	2400	8461
LV.W	8293	2597	5938	2025	7407	1706	8466	1655	5033
LV.WET	4466	2764	4884	2690	4318	2232	5257	2114	6719

**B**

Vektor	Rohsequenzen	Sequenzen	IS	VCN	Klone	Seqs/IS
LV.SF.LTR	15744	4554	2463	4,6	535	1,8
SIN.LV.SF	16878	5570	3454	4,6	751	1,6
SIN.LV.PGK	11651	3721	2531	10,4	243	1,5
LV.W	26604	8293	2597	2	1299	3,2
LV.WET	13427	4466	2764	6,2	446	1,6

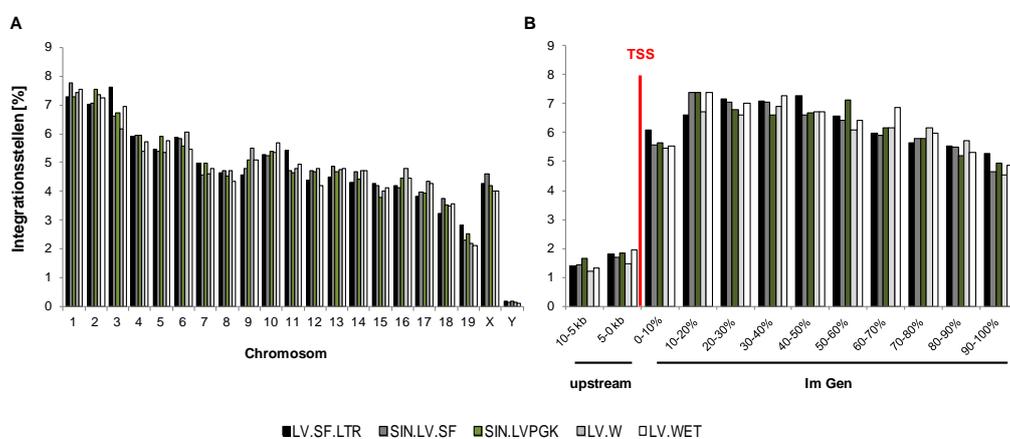
Zur genaueren Einschätzung der Heterogenität der Proben wurden desweiteren die beiden Diversitätsindizes von Shannon und Simpson angewendet. Diese Analysen bestätigten, dass durch den LV.SF.LTR Vektor ein deutlicher Abfall der Klonalität (Shannon Index) sowie der Homogenität (Simpson Index) nach 30 - 45 Tagen verursacht wurde (**Abbildung 3.23A**). Die quantitative Bestimmung des Beitrags einzelner Integrationsstellen offenbarte an diesen Zeitpunkten mehrere starke Integrationsstellen bei LV.SF.LTR transduzierten Zellen. Hingegen wurden sowohl mit den SIN-Vektoren als auch mit dem Vektor mit leberspezifischem Promotor im vollständigen LTR keine Integrate mit erhöhten Beiträgen beobachtet (**Abbildung 3.23B**). Diese Ergebnisse deuten auf eine *in vitro* Selektion durch den LV.SF.LTR Vektor hin.



**Abbildung 3.23: Klonalität lentiviral transduzierter muriner Zellen über die Zeit. (A)** Einschätzung der Diversität mit Hilfe des Shannon und des Simpson Index. **(B)** Der Beitrag einzelner Integrationsklone wurde mit Hilfe des relativen ‚Sequence Count‘ berechnet. d: Tage nach Transduktion.

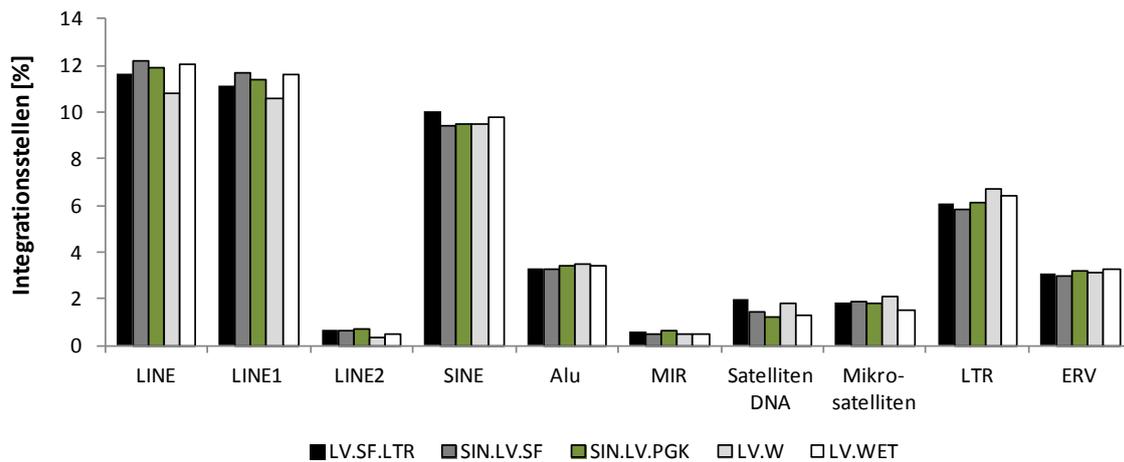
### 3.3.1.2 Genomweite Integrationsstellenverteilung der lentiviralen Vektoren

Um zu verstehen, ob die Vektorstruktur einen Einfluss auf das Integrationsprofil ausübt, wurde die Verteilung der Integrationsstellen auf den Chromosomen und in Bezug auf andere strukturelle und regulatorische DNA Regionen untersucht. In allen Fällen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vektoren festgestellt werden, die ein ähnliches, charakteristisch lentivirales Muster mit bevorzugter Integration in genkodierenden Bereichen ( $62,4 \pm 0,7\%$ ) (Abbildung 3.24A und B) vorwiesen.



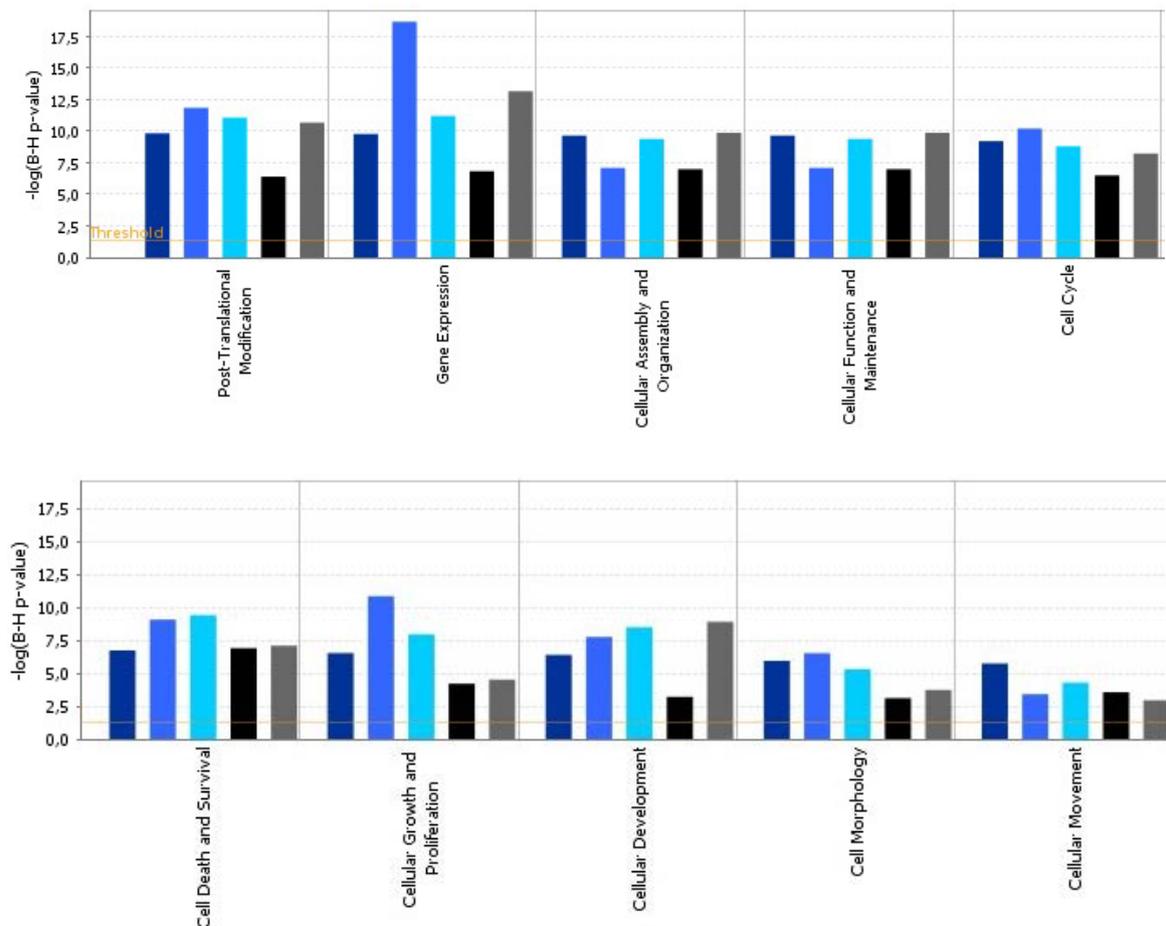
**Abbildung 3.24: Globale Verteilung der Integrationsstellen. (A)** Chromosomale Verteilung. **(B)** Verteilung im Gen und stromaufwärts. Um die Verteilung der Integration innerhalb der genkodierenden Bereiche von RefSeq Genen zu bestimmen, wurden die betroffenen Gene in zehn gleiche Abschnitte unterteilt und ermittelt, in welchem dieser Abschnitte die Integration stattfand. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist in Abbildung 3.13 gezeigt.

Die Analyse der Integrationsstellenverteilung in repetitiven Elementen wie Retrotransposons und sogenannten ‚Tandem Repeats‘ (kurze, wiederholt hintereinander auftretende Sequenzen) zeigte ebenso bei allen untersuchten Vektoren ein ähnliches Muster. Die meisten Integrate waren in ‚Long Interspersed Nuclear Elements‘ (LINE;  $11,7 \pm 0,4\%$ ) und ‚Short Interspersed Nuclear Elements‘ (SINE;  $9,7 \pm 0,2\%$ ) lokalisiert. In LTR Sequenzen wurden  $6,2 \pm 0,3\%$  detektiert, wobei  $3,1 \pm 0,1\%$  zu Endogenen Retroviren (ERV) gehörten (**Abbildung 3.25**).



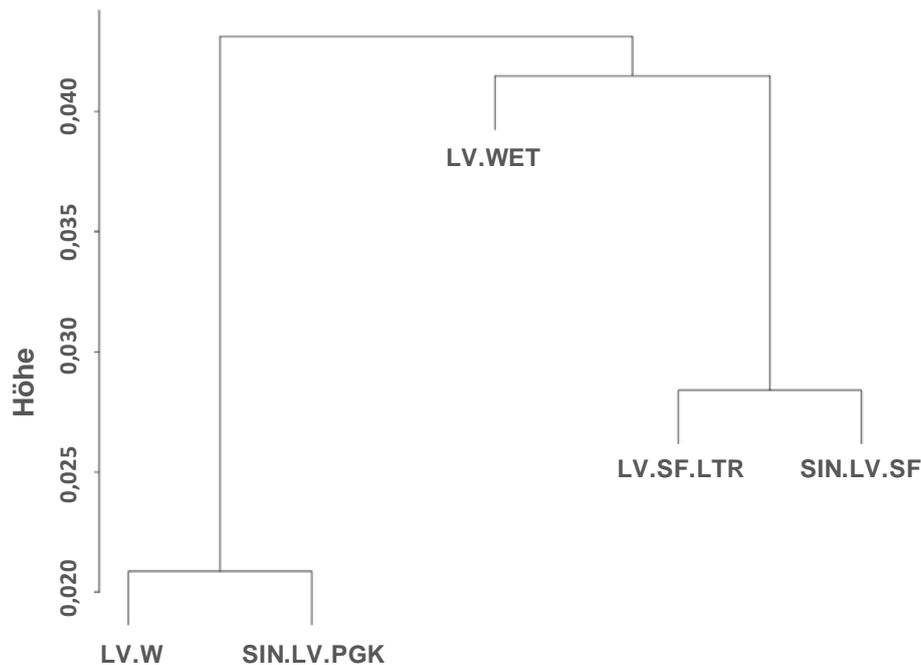
**Abbildung 3.25: Integrationsstellenverteilung in repetitiven Elementen.** LINE, ‚Long Interspersed Nuclear Elements‘, SINE, ‚Short Interspersed Nuclear Elements‘, MIR, ‚Mammalian Wide Interspersed Repeat‘, LTR, ‚Long Terminal Repeat‘, ERV, ‚Endogene Retroviren‘. Die schematische Darstellung der Vektoren ist in **Abbildung 3.13** gezeigt.

Die Funktion der zu den Integrationsstellen nächstgelegenen Gene wurde durch IPA analysiert und die funktionellen Genklassen miteinander verglichen. Für alle Vektoren waren ähnliche funktionelle Genklassen überrepräsentiert. Die am häufigsten betroffenen Genklassen waren ‚Post-Translational Modification‘, ‚Gene Expression‘, ‚Cellular Assembly and Organization‘, ‚Cellular Function and Maintenance‘, ‚Cell Cycle‘, ‚Cell Death and Survival‘, ‚Cellular Growth and Proliferation‘, ‚Cellular Development‘, ‚Cell Morphology‘ und ‚Cellular Movement‘ (B-H p-Wert mit allen Vektoren  $< 1 \times 10^{-5}$ , **Abbildung 3.26**). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Integration in bestimmten funktionellen Genklassen weitgehend unabhängig vom Vektordesign ist.



**Abbildung 3.26: ‚Ingenuity Pathways Analysis‘ der von der Integration betroffenen Gene.** Gezeigt sind die 10 am häufigsten betroffenen funktionellen Genklassen. Die x-Achse gibt die funktionellen Genklassen an, welchen die Gene zugeordnet werden konnten. Der Signifikanzwert mit welcher die überrepräsentiert vorliegenden Gene in die Analyse eingingen ist auf der y-Achse angegeben. Als Grenzwert für eine statistische Signifikanz (*Threshold*) wurde  $p < 0,05$  festgesetzt (gelbe Linie). Fisher’s Exact Test  $p$ -Werte wurden einer Bonferroni-Holmes (B-H) Korrektur unterzogen. ‚Dunkelblau‘, LV.SF.LTR; ‚Hellblau‘, SIN.LV.SF; ‚Türkis‘, SIN.LV-PGK; ‚Schwarz‘, LV.W; ‚Grau‘, LV.WET. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist in Abbildung 3.13 gezeigt.

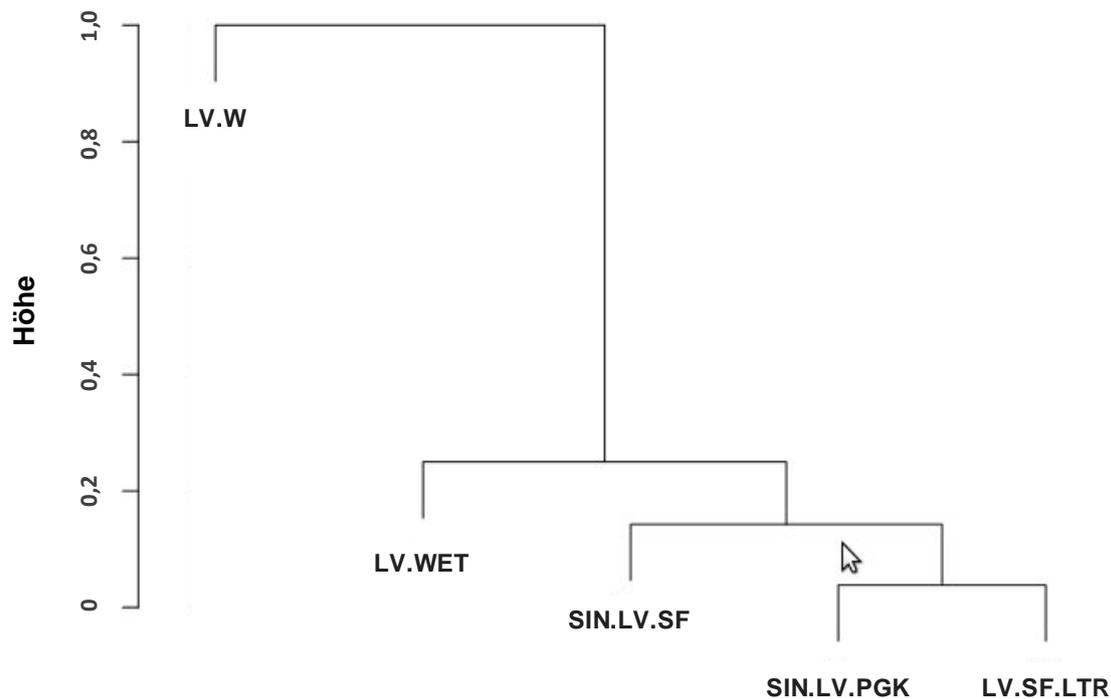
Eine vergleichende Analyse bevorzugter Integrationsorte (**siehe Abschnitt 3.1.2.3**) sollte Aufschluss darüber geben, ob das Vektordesign die Integration in bestimmte genomische Bereiche beeinflusst. Die Analyse wurde mit jeweils 5000 Integrationsstellen aus jedem Datensatz durchgeführt. **Abbildung 3.27** zeigt, dass die Promotorelemente in den Vektoren Einfluss auf das Integrationsstellenprofil nehmen. Sowohl die beiden Vektoren mit SFFV Promotor fielen in ein Integrationsprofil-Cluster, als auch die beiden Vektoren mit schwachem bzw. ohne Promotor (LV.W und SIN.LV.PGK). Der Vektor mit gewebespezifischem Promotor (LV.WET) zeigte die geringste Ähnlichkeit im Integrationsprofil mit den restlichen Vektoren.



**Abbildung 3.27: Phylogenetischer Stammbaum lentiviraler Vektoren in Abhängigkeit vom Integrationsstellenprofil mit unterschiedlichen Vektorelementen 14 – 60 Tage nach Transduktion.** Zur Bestimmung der Verwandtschaftsgrade der verschiedenen Vektoren wurde eine vergleichende CIS-Analyse jeweils zweier Vektoren durchgeführt und der prozentuale Anteil gemeinsamer CIS als Grundlage zur Erstellung des Stammbaums benutzt. Die Höhe gibt basierend auf dem Anteil gemeinsamer CIS die Differenz zwischen den Vektoren an. CIS: ‚Common Integration Site‘. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist in Abbildung 3.13 gezeigt.

Die Beobachtung einer Vektorstruktur-assoziierten Clusterbildung warf die Frage auf, ob diese Charakteristika den Einfluss des Vektordesigns auf Vorgänge widerspiegeln, die bereits während der Integration vonstattengehen, oder auf eine mögliche *in vitro* Selektion zurückzuführen sind. Um dies herauszufinden, untersuchten wir Proben an einem frühen Zeitpunkt nach Transduktion (48 h), an dem noch keine nennenswerte Selektion stattgefunden haben konnte. Um eine Amplifikation episomaler Vektorformen, die an diesem Zeitpunkt noch vermehrt vorliegen, zu vermeiden, wurde die Integrationsstellenanalyse mit Hilfe der LAM-PCR und einem Mix von Enzymen durchgeführt, die nicht innerhalb des Vektors bzw. in großem Abstand zu den LTRs schneiden. Es konnten 847 - 1226 Integrationsstellen pro Probe identifiziert werden. Die vergleichende CIS-Analyse zeigte, dass die Integrationsstellenprofile zu diesem Zeitpunkt eine deutlich andere Verwandtschaft aufwiesen. Die ursprünglichen Profile der Vektoren mit Promotor unterschieden sich kaum, so dass sie alle zusammen ein einzelnes großes Cluster bildeten, während der einzige Vektor ohne Promotor nicht in dieses Cluster eingeordnet wurde (**Abbildung 3.28**). Die Distanz des Clusters zu dem Leervektor war im Vergleich zu der Distanz der Vektoren mit Promotor untereinander verhältnismäßig hoch (Höhe 1,0 vs. 0,03 - 0,2). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anwesenheit eines Promotors für die initiale Selektion des Integrationsortes entscheidend ist, während die Art des Promotors und die Anwesenheit eines

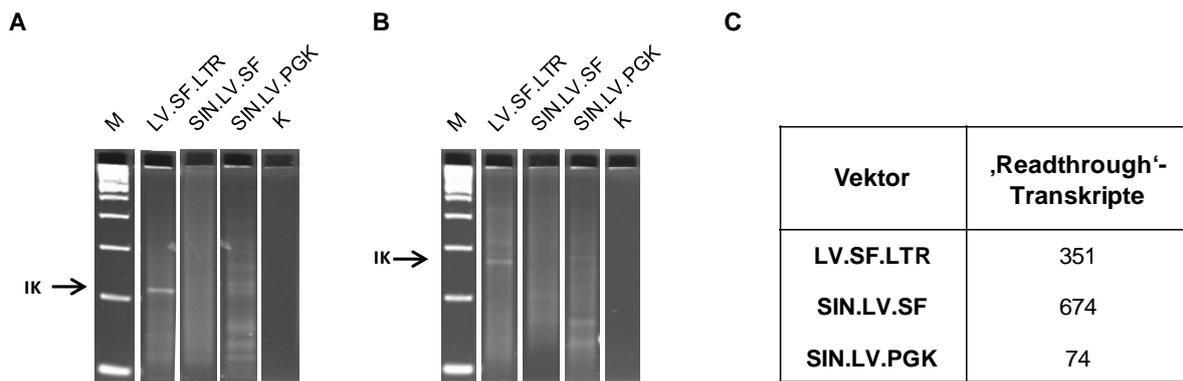
Transgens nur wenig oder keinen Einfluss zu haben scheint. Zudem bestätigte sich hier, dass die verwendeten lentiviralen Vektoren zu einer *in vitro* Selektion transduzierter Klone führen können.



**Abbildung 3.28: Phylogenetischer Stammbaum in Abhängigkeit vom Integrationsstellenprofil lentiviraler Vektoren mit unterschiedlichen Vektorelementen 48 Stunden nach Transduktion.** Zur Bestimmung der Verwandtschaftsgrade der verschiedenen Vektoren wurde eine vergleichende CIS-Analyse jeweils zweier Vektoren durchgeführt und der prozentuale Anteil gemeinsamer CIS als Grundlage zur Erstellung des Stammbaums benutzt. CIS: ‚Common Integration Site‘. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist in Abbildung 3.13 gezeigt.

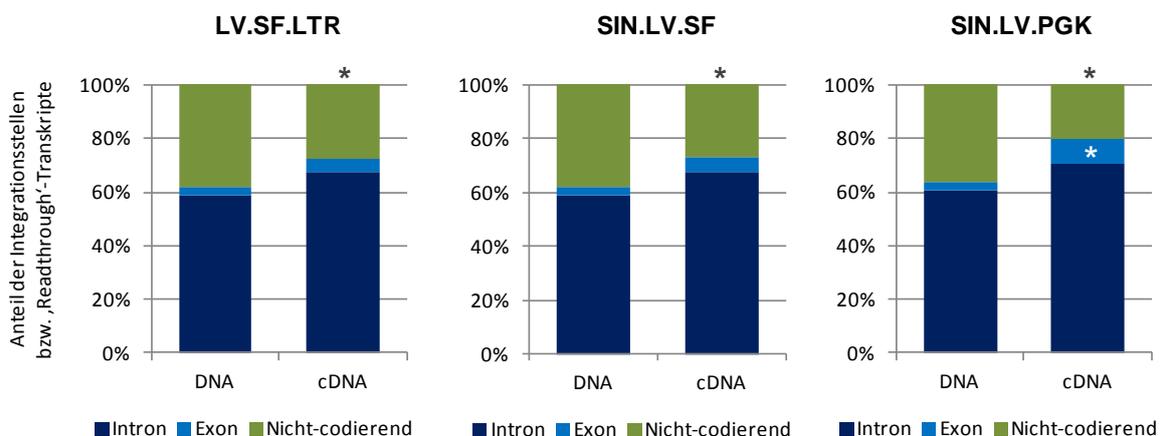
### 3.3.1.3 Aberrante Genexpression

Um zu verstehen, in wie weit sich Vektorstrukturen und -elemente auf die Häufigkeit viralzellulärer ‚Readthrough‘-Transkription, abnormes Spleißen und die Charakteristika chimärer Transkripte auswirken, wurden transkriptomweit aberrante Transkripte untersucht. Die folgenden funktionellen Analysen wurden mit den Vektoren LV.SF.LTR, SIN.LV.SF und SIN.LV.PGK durchgeführt. Zunächst wurde die Häufigkeit der ‚Readthrough‘-Transkription durch LAM-PCR auf cDNA (**Abschnitt 3.1.2**) ermittelt. Hochauflösende Gelelektrophorese der LAM-PCR Produkte zeigte, dass bei allen drei Vektoren ‚Readthrough‘-Transkription erfolgte. Das Bandenmuster der LAM-PCR Amplikons deutete auf eine geringere Häufigkeit viralzellulärer ‚Readthrough‘-Transkripte mit dem SIN.LV.PGK Vektor hin (**Abbildung 3.29A**). Hochdurchsatzsequenzierung der LAM-PCR Produkte erbrachte 351 (LV.SF.LTR), 674 (SIN.LV.SF) und 74 (SIN.LV.PGK) eindeutig zuordenbare chimäre ‚Readthrough‘-Transkripte (**Abbildung 3.12B**) und bestätigte somit die gelelektrophoretische Analyse.



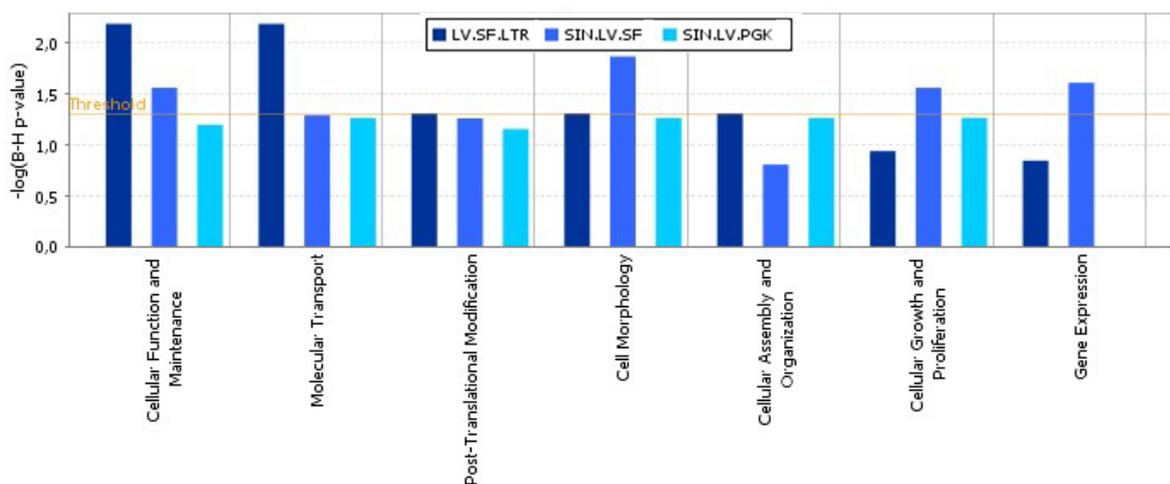
**Abbildung 3.29: „Readthrough“-Transkription lentiviraler Vektoren.** (A)+(B) 3'LAM-PCR Analyse mit den Restriktionsenzymen (A) Tsp509I und (B) MseI von 150 ng cDNA lentiviral transduzierter „Lineage“-negativer Zellen. (C) Zahl der von der Hochdurchsatzsequenzierung erhaltenen viral-zellulären „Readthrough“-Transkripte. IK: Interne Kontrolle; K, RNA-Kontrolle (cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase); LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; cDNA, „complementary DNA“.

Um zu beantworten, ob die genomische Umgebung der Integrationsloki einen Einfluss auf die Bildung von „Readthrough“-Transkripten hat und welche Rolle das Vektordesign dabei spielt, wurde die Verteilung der Transkripte in genkodierenden und nichtkodierenden Regionen vergleichend analysiert. Mit allen Vektoren konnten signifikant mehr „Readthrough“-Transkripte in genkodierenden Regionen detektiert werden als aufgrund der Integrationsstellenverteilung zu erwarten wäre ( $75,1 \pm 3,1\%$  vs.  $62,6 \pm 0,9\%$ ;  $p = 2,9 \times 10^{-13}$ , bestimmt durch  $\chi^2$ -Test)(Abbildung 3.30). Bei mehr als 80% dieser Transkripte war der nächstgelegene zelluläre Spleißdonor weniger als 30 kb entfernt. Ein Vergleich der Vektoren untereinander zeigte deutlich mehr „Readthrough“-Transkription in Exon-Sequenzen mit SIN.LV.PGK als mit LV.SF.LTR und SIN.LV.SF ( $9,5\%$  vs.  $5,1 \pm 0,1\%$ ;  $p = 9,9 \times 10^{-2} - 1,5 \times 10^{-3}$ , bestimmt durch  $\chi^2$ -Test) (Abbildung 30).



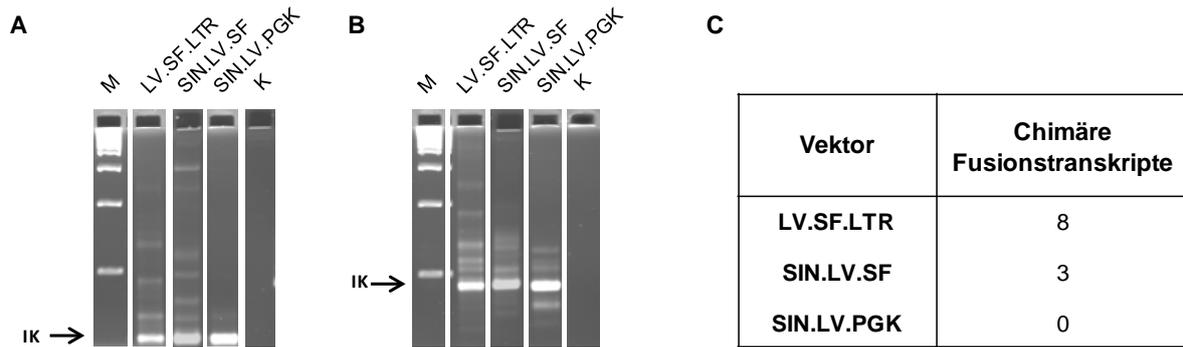
**Abbildung 3.30: Vergleich der Verteilung von Integrationsstellen und „Readthrough“-Transkripten von lentiviralen Vektoren mit unterschiedlichem Vektordesign.** Die schwarzen Sterne markieren signifikant mehr „Readthrough“-Transkripte in genkodierenden Regionen im Vergleich zur Integrationsstellenverteilung ( $p = 2,9 \times 10^{-13}$ ). Der weiße Stern markiert deutlich bzw. signifikant mehr „Readthrough“-Transkripte in Exon-Sequenzen mit SIN.LV.PGK im Vergleich zu LV.SF.LTR und SIN.LV.SF ( $p = 9,9 \times 10^{-2} - 1,5 \times 10^{-3}$ ). Zur Berechnung der p-Werte wurde der  $\chi^2$ -Test angewandt.

Die IPA der funktionellen Genklassen der mit viral-zellulärer ‚Readthrough‘-Transkription assoziierten Gene zeigte nach Bonferroni-Holmes Korrektur der Fisher’s Exact  $p$ -Werte für beide SFFV-Vektoren eine Überrepräsentation ähnlicher Kategorien, die auch bei der Analyse der Integrationsstellen gefunden wurden (**Abschnitt 3.3.1.2**): ‚Cellular Function and Maintenance‘ und ‚Molecular Transport‘ bei LV.SF.LTR sowie ‚Cell Morphology‘, ‚Gene Expression‘, ‚Cellular Function and Maintenance‘ und ‚Cellular Growth and Proliferation‘ bei SIN.LV.SF. Die durch SIN.LV.PGK induzierten Transkripte dagegen zeigten nach Bonferroni-Holmes Korrektur der Fisher’s Exact  $p$ -Werte keine signifikante Anhäufung in einer bestimmten funktionellen Gruppe (**Abbildung 3.31**). Die häufigsten funktionellen Genklassen SIN.LV.PGK induzierter ‚Readthrough‘-Transkripte betrafen Prozesse, die zum Erhalt und Wachstum der Zelle notwendig sind (z.B. ‚Energy Production‘, ‚Nucleic Acid Metabolism‘, ‚Small Molecule Biochemistry‘).



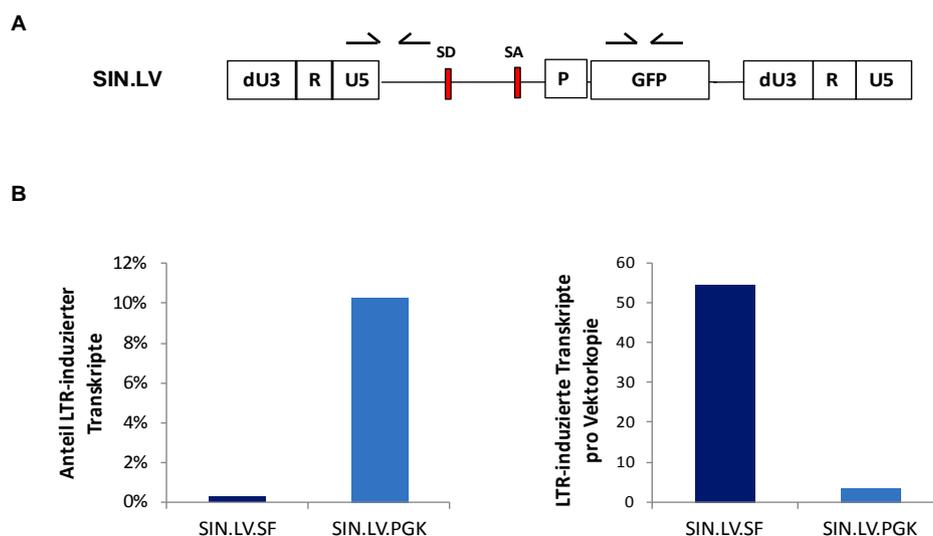
**Abbildung 3.31: Überrepräsentierte funktionelle Genklassen von der ‚Readthrough‘-Transkription betroffener Gene.** Mit Hilfe der ‚Ingenuity Pathway Analysis‘ Software (IPA) wurde die Funktion der von ‚Readthrough‘-Transkription betroffenen Gene untersucht und miteinander verglichen. Die Abbildung zeigt die überrepräsentierten Genklassen nach Bonferroni-Holmes (B-H) Korrektur der Fisher’s Exact Test  $p$ -Werte für LV.SF.LTR und SIN.LV.SF. Mit dem SIN.LV.PGK Vektor waren keine der funktionellen Genklassen überrepräsentiert. Als Grenzwert für eine statistische Signifikanz (*Threshold*) wurde B-H  $p < 0,05$  festgesetzt (gelbe Linie). ‚Dunkelblau‘, LV.SF.LTR; ‚Mittelblau‘, SIN.LV.SF; ‚Hellblau‘, SIN.LV.PGK. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist in Abbildung 3.13 gezeigt.

Um zu klären, ob mit erhöhter Frequenz der ‚Readthrough‘-Transkription auch das Risiko zur Bildung viral-zellulärer Spleißprodukte ausgehend vom kanonischen Spleißdonor oder nahegelegener kryptischer Spleißdonoren steigt, wurden die viral-zellulären Fusionstranskripte durch LAM-PCR auf cDNA in Kombination mit Pyrosequenzierung (**Abschnitt 3.1.2**) untersucht. Es konnten 8 Fusionstranskripte mit dem LV.SF.LTR Vektor und 3 Fusionstranskripte mit dem SIN.LV.SF Vektor detektiert werden (**Abbildung 3.32**), die alle vom kanonischen Spleißdonor ausgingen. Die Analyse des SIN.LV.PGK Vektor zeigte dagegen ausschließlich vektorinterne Spleißprodukte.



**Abbildung 3.32: Häufigkeit von viral-zellulären Fusionstranskripten lentiviraler Vektoren.** (A)+(B) 3'LAM-PCR Analyse mit den Restriktionsenzymen (A) Tsp509I und (B) MseI von 150 ng cDNA lentiviral transduzierter ‚Lineage‘-negativer Zellen. (C) Zahl der erhaltenen chimären Fusionstranskripte nach Hochdurchsatzsequenzierung. M, 100 bp Marker; RT, Reverse Transkriptase; IK, internes Kontrollfragment; LAM-PCR, lineare amplifikationsmedierte PCR; Tsp509I und MseI, bei der LAM-PCR verwendete Restriktionsenzyme.

Unter der Hypothese, dass auch in der SIN-LTR Vektorkonfiguration starke interne SFFV Verstärker-/Promotorelemente zu einer erhöhten Expression des Transgens führen und auch eine erhöhte Frequenz der in den SIN-LTRs initiierten Transkripte bewirken, wurde der Anteil der im 5'-SIN-LTR-initiierten Transkripte durch quantitative Reverse Transkriptase (qRT)-PCR für beide Vektoren bestimmt (Abbildung 3.33A). Es zeigte sich, dass mit dem SIN.LV.PGK über 10% der Transkripte aus dem 5'-SIN-LTR hervorgingen. Obwohl der Anteil dieser Transkripte mit dem SIN.LV.SF Vektor nur 0,26% ausmachte, war deren absolute Anzahl pro Vektorkopie etwa 16-mal höher als mit dem SIN.LV.PGK Vektor.



**Abbildung 3.33: Einfluss des internen Promotors in SIN-Vektoren auf die LTR-induzierte Transkription.** (A) Schematische Darstellung der SIN-Vektoren mit der Lage der Primer zur Quantifizierung verschiedener Transkripte. (B) Anteil der vom 5'-LTR eingeleiteten Transkripte. (C) Absolute Zahl der vom 5'-LTR induzierten Transkripte pro Vektorkopie. dU3, deletierte U3 Region; R, redundante Region; U5, unique 5'-Region; SD, Spleißdonor; SA, Spleißakzeptor; P, interner Promotor; GFP, ‚Green Fluorescent Protein‘.

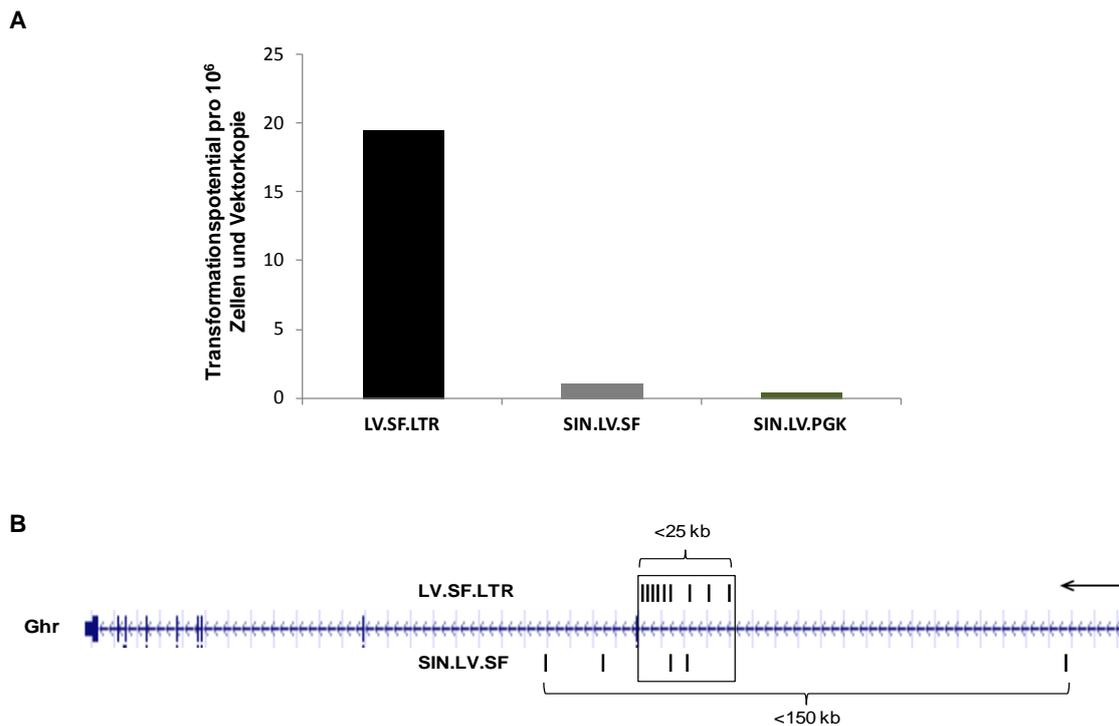
Zur Abschätzung des möglichen Einflusses von Fusionstranskripten auf die biologische Sicherheit eines Vektors wurde bei dem LV.SF.LTR Vektor untersucht, ob ein Zusammenhang mit dem Auftreten potentiell prädominanter Klone besteht. Zwei der acht Integrationsklone (Exoc6b und Kdm6b), die zu Fusionstranskripten führten, konnten aber nur mit einem niedrigen relativen Beitrag detektiert werden (unter 0,1%; **Tabelle 3.2**).

**Tabelle 3.2:** Übersicht der mit LV.SF.LTR detektierten chimären Fusionstranskripte und der relativen Beiträge der zugehörigen Integrationsklone. n.d.: nicht detektiert

RefSeq Gen	Spleißakzeptor	Funktion	Relativer Beitrag des zugehörigen Klons
8430410K20Rik	Ex1	-	n.d.
Galnt1	Ex2	Posttranslationale Proteinmodifikation	n.d.
Mpp6	Ex3	Funktion in der Tumorsuppression	n.d.
Gls	Ex7	Energiegeneration für Metabolismus, Neurotransmittersynthese	n.d.
<b>Exoc6b</b>	Ex8	Involviert in der Exocytose	0,07%
<b>Kdm6a</b>	Ex29	Histon H3-K4 Methylierung	0,02-0,07%
Rgs18	Ex2	Regulator der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion	n.d.
Tnpo3	In22	Nuklearer Importrezeptor, involviert in HIV Infektion	n.d.

### 3.3.1.4 Transformationspotential in Abhängigkeit des Vektordesigns

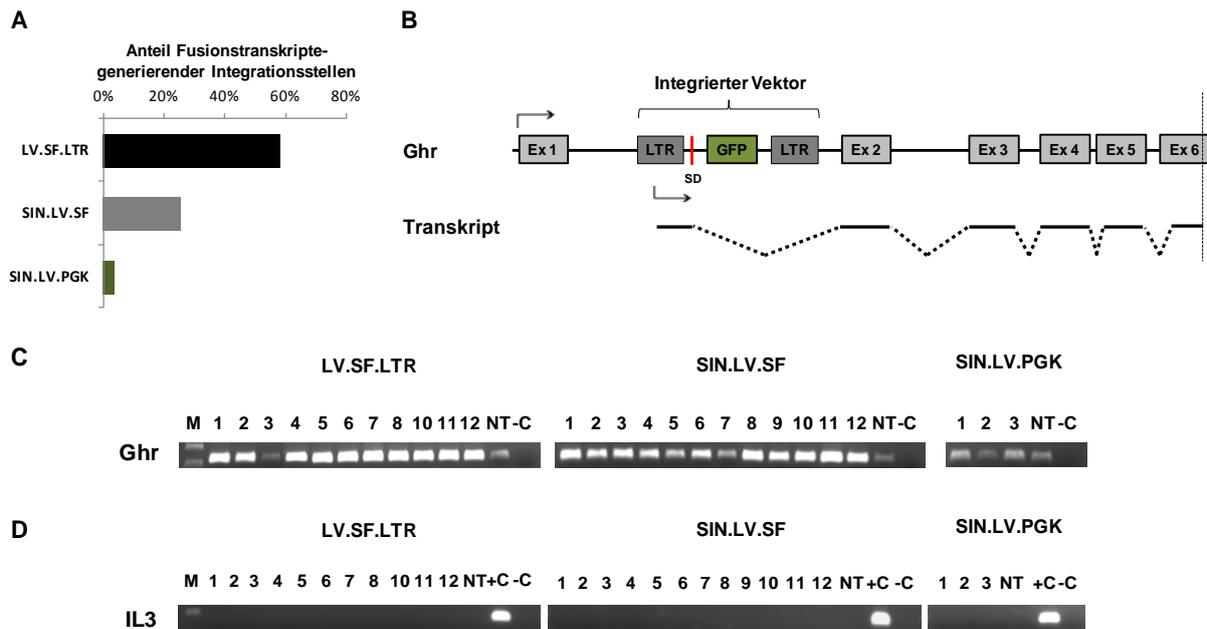
Mit Hilfe der IL-3-abhängigen Zelllinie 32D (**Abschnitt 2.2.8**) wurde das Transformationspotential des LV.SF.LTR Vektors mit  $19,5 \pm 3,8 \times 10^{-6}$  pro Vektorkopie bestimmt, wohingegen das der beiden SIN-Vektoren etwa 20 - 50fach niedriger war ( $1,0 \pm 0,5 \times 10^{-6}$  für SIN.LV.SF und  $0,4 \pm 0,4 \times 10^{-6}$  für SIN.LV.PGK) (**Abbildung 3.34A**). Während mit SIN.LV.PGK keine der angewachsenen Kolonien (0/3) ohne IL-3 expandiert werden konnten, konnten 12 der insgesamt 15 angewachsenen SIN.LV.SF Kolonien ohne IL-3 expandiert werden. Analog dazu wurden 12 der über 137 angewachsenen LV.SF.LTR Kolonien zufällig für die weiteren Analysen ausgewählt. Die 3 SIN.LV.PGK Kolonien wurden *mit* IL-3 expandiert, um mögliche Ursachen für das anfängliche Anwachsen dieser Zellen ohne IL-3 untersuchen zu können. Die Analyse der Integrationsstellen erfolgte durch 2DnrLAM-PCR und ergab insgesamt 55 LV.SF.LTR-, 71 SIN.LV.SF- und 30 SIN.LV.PGK-Integrate. Alle LV.SF.LTR Kolonien enthielten mindestens eine Integrationsstelle im ‚Growth Hormone Receptor‘ (*Ghr*), ebenso 83% der SIN.LV.SF Kolonien, jedoch keine der SIN.LV.PGK Kolonien. Während sich alle LV.SF.LTR Integrate in *Ghr* in einem etwa 25 kb großen Fenster stromaufwärts von Exon 2 und in gleicher Orientierung zum *Ghr* Transkript befanden, verstreuten sich die SIN.LV.SF Integrate über einen deutlich größeren Bereich (150 kb), der sich bis in Intron 2 erstreckte (**Abbildung 34**). Ein SIN.LV.SF Integrat lag in dem *Ghr* Transkript entgegengesetzter Richtung vor.



**Abbildung 3.34: Genotoxizitätsassay mit IL-3 abhängiger Zelllinie. (A)** Frequenz mit der 32D Zellen transduziert mit den verschiedenen Vektoren in der Abwesenheit von exogenem IL-3 Kolonien formten. **(B)** Integrationsstellen im *Ghr* Lokus von LV.SF.LTR und SIN.LV.SF. Schwarze Striche überhalb des Gens markieren LV.SF.LTR Integrate, unterhalb des Gens SIN.LV.SF Integrate. Der Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung von *Ghr* an. Der eingerahmte Bereich markiert die Integrationsstellen, die zu chimären Fusionstranskripten führten. IS, Integrationsstellen; kb, Kilobasenpaare.

Anschließend wurde die revers transkribierte mRNA angewachsener Kolonien durch nrLAM-PCR auf die Anwesenheit von Fusionstranskripten überprüft. Insgesamt führten über 60% der LV.SF.LTR-Integrate zu Fusionstranskripten, wohingegen mit SIN.LV.SF eine Reduktion auf 25% und mit SIN.LV.PGK auf nur 3% festgestellt wurde (**Abbildung 3.35A**). Die involvierten Gene spielen unter anderem eine Rolle in der Proteinsynthese, der Zellproliferation und der Signaltransduktion. In allen LV.SF.LTR Kolonien wurde mindestens ein Fusionstranskript mit *Ghr* beobachtet (**Abbildung 3.35B**), dagegen resultierten die SIN.LV.SF Integrate im *Ghr* Lokus nur in 4 von 12 Kolonien in Fusionstranskripten. Diese Transkripte entstammten ausschließlich aus Integraten, die wie die LV.SF.LTR Integrate in dem 25 kb Fenster direkt stromaufwärts von Exon 2 lagen. Die Integrate stromabwärts von Exon 2 sowie mehr als 100 kb stromaufwärts von Exon 2 resultierten nicht in Fusionstranskripten. Die Analyse der SIN.LV.PGK Kolonien ergab nur ein einziges Fusionstranskript. Dieses Transkript entstand durch Fusion des viralen Spleißdonors mit Exon 2 von *Pla2g12a*. Das von *Pla2g12a* kodierte Protein besitzt eine Phospholipase-Aktivität und ist im Stoffwechsel von Lipiden involviert. Eine Beziehung zum *Ghr* oder IL-3 Signalweg ist nicht bekannt.

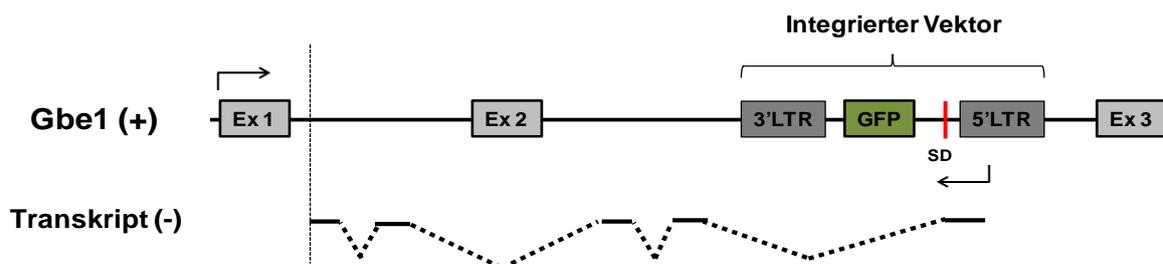
Genexpressionsanalysen durch RT-PCR zeigten bis auf eine Ausnahme (Kolonie 3) eine starke Überexpression von *Ghr* in allen LV.SF.LTR Kolonien (**Abbildung 3.35C**). In SIN.LV.SF Kolonien fiel die Hochregulation unterschiedlich aus, war aber in allen Kolonien zu beobachten. Im Gegensatz dazu wurde in keiner der SIN.LV.PGK Kolonien eine Hochregulation von *Ghr* beobachtet. Eine Expression von *IL-3* wurde bei keinem der analysierten *IL-3*-unabhängigen Klone detektiert (**Abbildung 3.35D**).



**Abbildung 3.35: Analyse viral-zellulärer Fusionstranskripte in ohne *IL3* angewachsenen 32D-Zell-Kolonien.** (A) Anteil der Integrationsstellen, die zu Fusionstranskripten führten. (B) Schematische Abbildung viral-zellulärer *Ghr*-Fusionstranskripte. Integrate direkt stromaufwärts von Exon 2 (<25 kb) im Gen *Ghr* führten zu aberrantem Spleißen des viralen Spleißdonors mit dem zellulären Spleißakzeptor von Exon 2 in *Ghr*. Durchgezogenen Linien repräsentieren die transkribierte DNA, gestrichelte Linien deuten die Spleißprozesse an. Die senkrechte gestrichelte Linie markiert die maximale Länge der sequenzierten Fusionstranskripte. Pfeile deuten die Transkriptionsrichtung an. SD: Spleißdonor; Ex, Exon; LTR, ‚Long Terminal Repeat‘; GFP, ‚Green Fluorescent Protein‘; kb, Kilobasenpaare. (C) Expressionsanalysen von *Ghr* in transformierten Kolonien. Die Genexpression von *Ghr* erfolgte durch qPCR mit Primern, die in Exon 2 und Exon 4 hybridisieren. (D) Expressionsanalysen von *IL-3* in transformierten Kolonien. 1, 2, 3... Koloniennummer.

83% aller chimären Transkripte wurden durch Fusion des viralen SD mit Spleißakzeptoren (SA) bekannter Exons von zellulären Genen erzeugt. 7,7% der Transkripte gingen von kryptischen Spleißdonoren 66 bp (SIN.LV.SF) bzw. 26 bp und 38 bp (LV.SF.LTR) stromaufwärts des kanonischen Spleißdonors aus. 9,2% der aberrant gespleißten Transkripte waren Fusionen mit kryptischen zellulären Spleißakzeptoren in Intronsequenzen.

Insbesondere sind zwei Fusionstranskripte zu erwähnen, bei denen die Vektoren in entgegengesetzter Richtung der Gene lagen. Ein negativ orientiertes SIN.LV.SF Integrat im Intron 1 des positiv orientierten Gens *Ncoa7*, welches an der Regulation der Transkription beteiligt ist, führte zu einem Fusionstranskript mit einer ca. 3 kb stromabwärts der Integrationsstelle gelegenen Sequenz. Weitere Spleißprozesse konnten in diesem Fall nicht beobachtet werden. Ein LV.SF.LTR Integrat in Intron 2 von *Gbe1* führte zu einem mehrfach gespleißten Transkript, das sich bis in Intron 1 von *Gbe1* erstreckte (**Abbildung 3.36**). Insgesamt konnten nach der Vektorsequenz vier zelluläre Blocks identifiziert werden, die allesamt in den Intronsequenzen von *Gbe1* lokalisiert waren. Dieses Transkript wurde in allen transformierten Kolonien detektiert, die diesen Klon mit Integration in *Gbe1* enthielten. Dies deutet auf eine transformationsfördernde Funktion dieses aberranten Transkripts hin. Das natürliche Produkt von *Gbe1* ist ein Glucan-verzweigendes Enzym, das Poly-Glucose-Ketten an langkettige Polysaccharide hinzufügt.



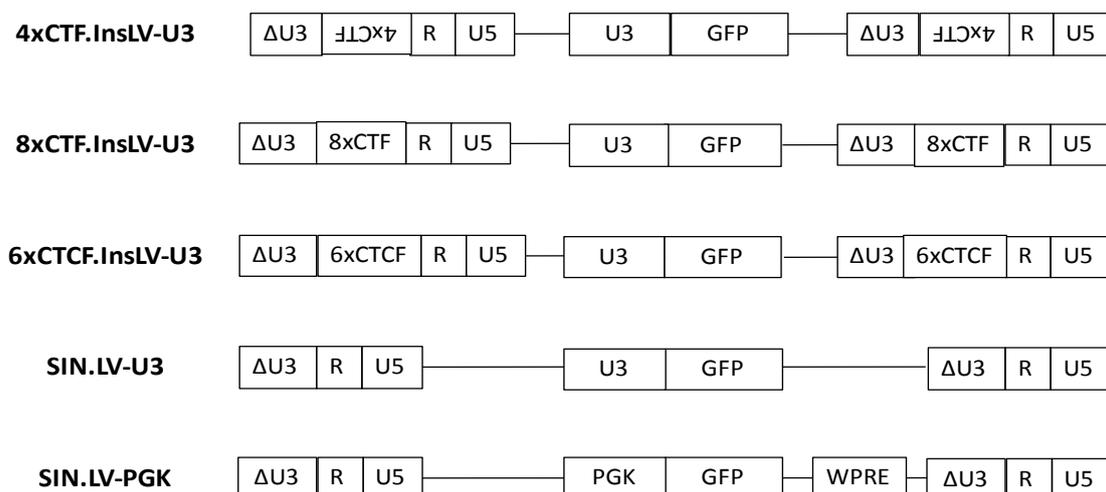
**Abbildung 3.36: Schematische Abbildung eines viral-zellulären Fusionstranskripts mit dem Vektor LV.SF.LTR.** Das Provirus befand sich innerhalb (in Intron 2) aber in entgegengesetzter Richtung des Gens *Gbe1*. Ausgehend vom viralen Spleißdonor wurde ein Fusionstranskript mit insgesamt 4 weiteren Blöcken zellulärer Sequenzen detektiert. Pfeile deuten an, in welcher Richtung die Transkription stattfindet. Ex, Exon; 3'LTR, ‚Long Terminal Repeat‘ am 3'Ende des Vektors; 5'LTR, ‚Long Terminal Repeat‘ am 5'Ende des Vektors; GFP, ‚Green Fluorescent Protein‘; SD: Spleißdonor.

### 3.3.2 Detailanalyse neuer Sicherheitselemente

Mit dem Einbau zusätzlicher Vektorelemente in therapeutische Vektoren soll eine Erhöhung der Sicherheit und/oder Effizienz des retroviralen Gentransfers erreicht werden. Die Auswirkungen solcher Elemente auf die Integration bzw. Genexpression umliegender Gene wurden in dieser Arbeit in verschiedenen Kooperationsprojekten adressiert.

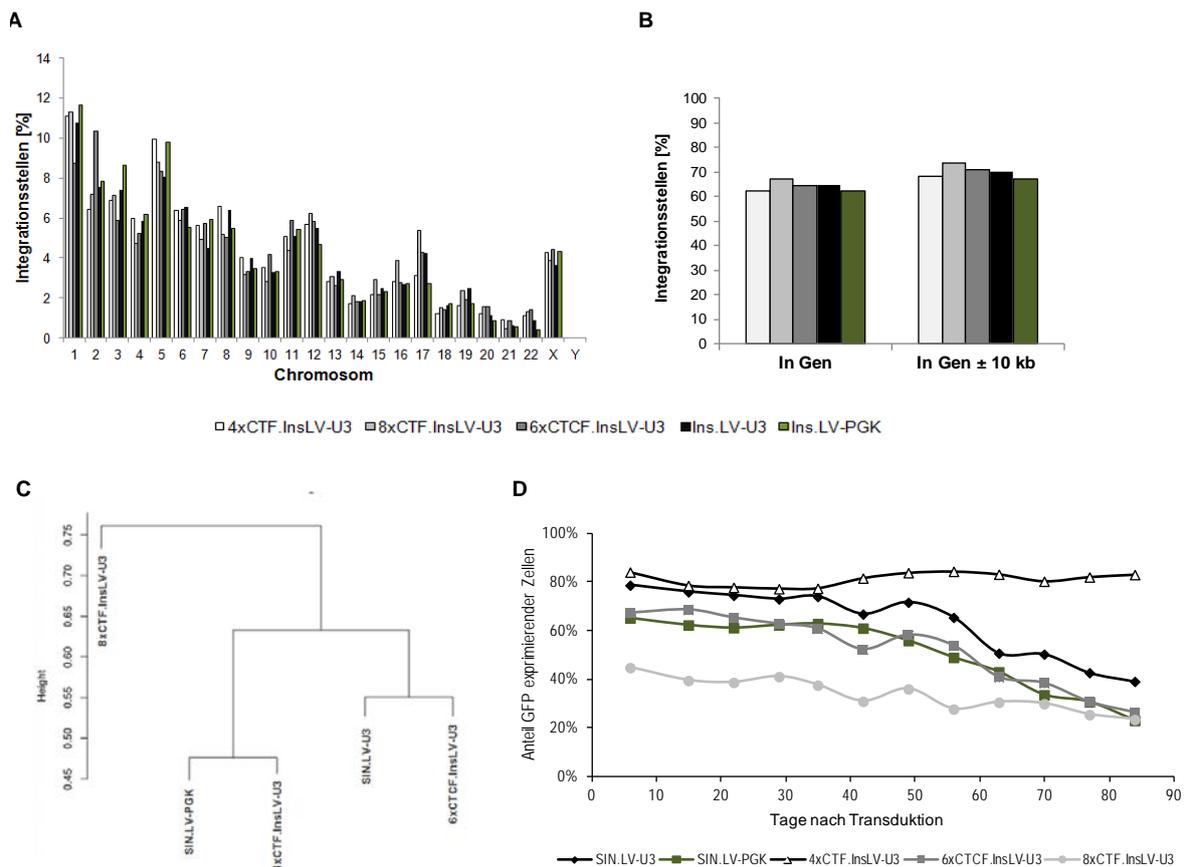
#### 3.3.2.1 Auswirkungen von Insulatoren auf Integration und Selektion

Um den Einfluss von Insulatoren auf die Integration und deren Effektivität zu bestimmen, wurden in Kooperation mit Dr. Odile Cohen-Haguener (ENSC, Cachan, Frankreich) zwei verschiedene Insulatorelemente analysiert. Die CTF- (Esnault et al. 2009) bzw. CTCF-Insulatorbausteine (Gaussin et al. 2012) wurden in unterschiedlichen Wiederholungen in die SIN-LTRs lentiviraler Vektoren mit starken internen Promotoren eingefügt. Zum Vergleich wurden zwei analoge, nicht-insulierte Vektoren mit starkem bzw. schwachem internem Promotor analysiert (**Abbildung 3.37**). Hela-Zellen wurden mit den verschiedenen Vektoren transduziert und bis zu 12 Wochen in Kultur gehalten. DNA wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion isoliert und zur Erstellung eines Integrationsstellenprofils durch LAM-/nrLAM-PCR in Kombination mit Pyrosequenzierung analysiert. Insgesamt konnten 2542 (4xCTF.InsLV-U3), 1308 (8xCTF.InsLV-U3), 2875 (6xCTCF.InsLV-U3), 2598 (SIN.LV-U3) und 3133 (SIN.LV-PGK) eindeutig zuordenbare Integrationsstellen detektiert werden.



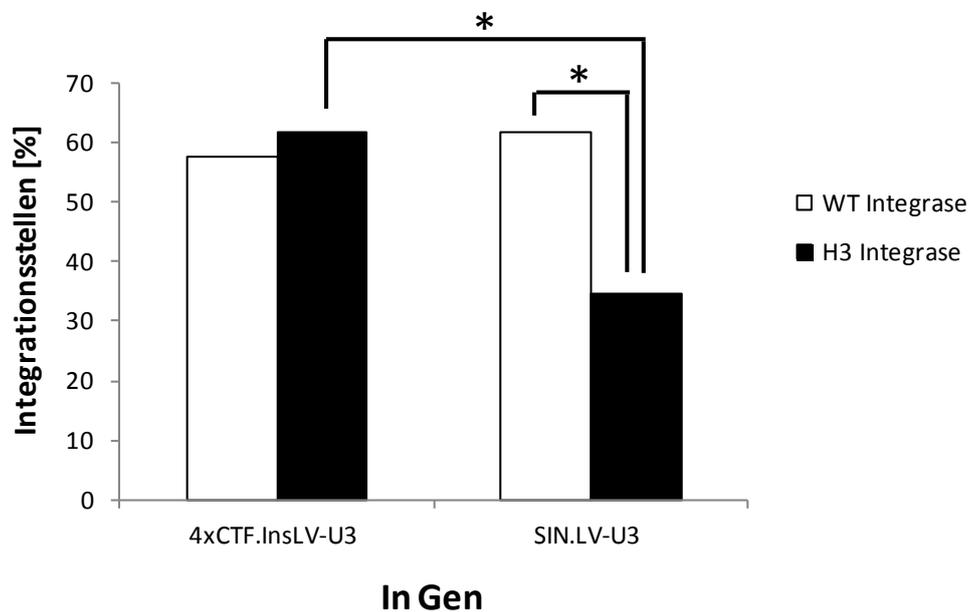
**Abbildung 3.37: Schema insulierter und nicht-insulierter lentiviraler Vektoren (provirale Form).** U3: Verstärker/Promotor des ‚Friend Murine Leukemia Virus‘, GFP: ‚Green Fluorescent Protein‘, ΔU3: Deletion der lentiviralen U3; 4xCTF: Insulator bestehend aus 4 Wiederholungen von CTF Bindungsstellen (invertiert); 8xCTF: Insulator bestehend aus 8 Wiederholungen von CTF Bindungsstellen; 6xCTCF: Insulator bestehend aus 6 Wiederholungen von CTCF Bindungsstellen; PGK: Promotor der Phosphoglyceratkinase, WPRE: ‚Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element‘.

Um Unterschiede im erzielten Integrationsprofil festzustellen zu können, wurde zunächst die chromosomale Verteilung der Integrationsstellen sowie die Verteilung im Hinblick auf genkodierende Regionen analysiert. Mit allen Vektoren wurden ähnliche Muster ohne signifikante Unterschiede beobachtet (**Abbildung 3.38A und B**). Vergleichende CIS-Analysen mit 1300 extrahierten Integraten pro Vektor (siehe **Abschnitt 3.2.2.2**) zeigten dagegen eine Clusterbildung von SIN.LV-PGK und 4xCTF.InsLV-U3 als auch von SIN.LV-U3 und 6xCTCF.InsLV-U3, welche wiederum zusammen ein großes Cluster bildeten (**Abbildung 3.38C**). 8xCTF.InsLV-U3 konnte keinem dieser Cluster zugeordnet werden. Expressionsanalysen an verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion zeigten eine konstante GFP Expression in 4xCTF.InsLV-U3-transduzierten Zellen, während mit den anderen insulierten Vektoren wie auch mit den nicht-insulierten Vektoren eine Reduktion der GFP-exprimierenden Zellen festgestellt wurde (**Abbildung 3.38D**, Artus et al. Manuskript eingereicht). Die Ergebnisse deuten auf eine effektive Abschirmung durch den 4xCTF.InsLV-U3 Vektor hin.



**Abbildung 3.38: Integrationsprofil insulierter und nicht-insulierter Vektoren. (A) Chromosomale Integrationsstellenverteilung. (B) Verteilung der Integrationsstellen im Gen und im Gen ± 10 kb. (C) Kladogramm der Verwandtschaftsverhältnisse. Die jeweilige Distanz zwischen den Vektoren wurde durch den prozentualen Anteil gemeinsamer CIS bestimmt. (D) Anteil GFP-exprimierender Zellen über die Zeit.** Modifiziert aus Artus et al., Manuskript eingereicht bei *EMBO Molecular Medicine*. Kb: Kilobasenpaare; CIS: ‚Common Integration Sites‘.

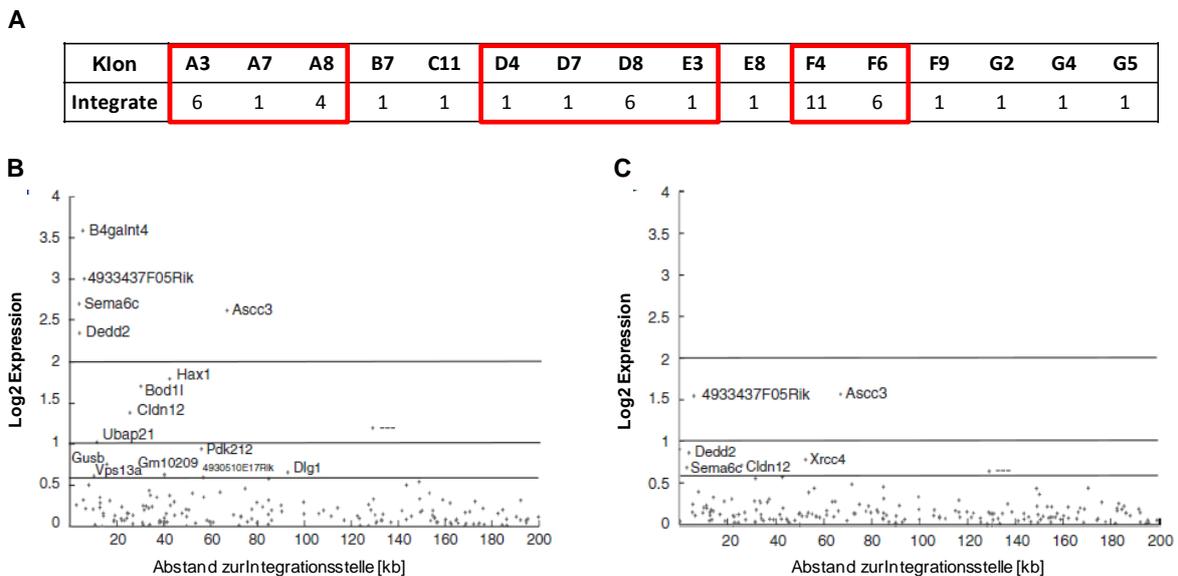
Der insulierte 4xCTF.InsLV-U3 Vektor und der nicht-insulierte SIN.LV-U3 wurden zudem mit einer modifizierten Integrase kombiniert, die über Bindungsstellen für das Histon H3 eine bevorzugte Integration in Heterochromatin vermitteln soll (H3 Integrase). Dadurch soll die Integration außerhalb von genkodierenden Regionen gelenkt werden. Die Analyse der Integrationsstellenverteilungen innerhalb von RefSeq Genen zeigte, dass mit dem insulierten Vektor kein signifikanter Unterschied mit der H3 Integrase gegenüber der Wildtyp (WT) Integrase bestand. Im Gegensatz dazu wurden mit dem nicht-insulierten Vektor in Kombination mit der zielgerichteten Integrase signifikant weniger Integrationsstellen innerhalb von genkodierenden Regionen detektiert ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0,0005$ ; **Abbildung 3.39**).



**Abbildung 3.39: Integrationsstellenverteilung insulierter und nicht-insulierter Vektoren mit WT oder H3 Integrase in RefSeq Genen.** Vergleich der Integrationsstellenverteilung eines insulierten und eines nicht-insulierten Vektors jeweils in Kombination mit einer Wildtyp (WT) oder einer zielgerichteten (H3) Integrase, die die Integration bevorzugt in heterochromatische Bereiche lenken soll. Mit dem insulierten Vektor wurde mit beiden Integrasen eine ähnliche Verteilung der Integrationsstellen in RefSeq Genen beobachtet. Währenddessen fand mit dem nicht-insulierten Vektor SIN.LV-U3 in Kombination mit der H3 Integrase signifikant weniger Integration innerhalb von RefSeq Genen statt als mit der WT Integrase bzw. als mit dem insulierten Vektor. \*,  $p < 0,0005$  ( $\chi^2$ -Test).

### 3.3.2.2 Einfluss der $\beta$ -Globin Lokuskontrollregion ( $\beta$ -LCR) auf die Genexpression

Um den Einfluss eines  $\beta$ -LCR Elements in einem lentiviralen Vektor auf die Genexpression umliegender Gene zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Bobby Gaspar und Prof. Adrian Thrasher (UCL, London, UK) differenzierte und undifferenzierte murine Erythroleukämie Zellen (MEL) mit dem Vektor LV.LCR.EFS.GFP transduziert und daraus Einzelzellklone generiert. Das  $\beta$ -LCR Element liegt in diesem SIN-lentiviralen Vektor vor einem gewebespezifischen EFS Promotor, der die Expression des GFP Transgens reguliert. 16 Klone wurden durch nrLAM-PCR und anschließende Pyrophosphatsequenzierung analysiert, wobei insgesamt 44 Integrationsstellen identifiziert werden konnten. Neun dieser Klone wurden für die nachfolgenden Untersuchungen der Genexpression ausgewählt: fünf Klone mit mehreren Integraten (4, 6 oder 11) und vier Klone mit einer einzelnen Integration (**Abbildung 3.40A**). Es wurden 166 Gene innerhalb eines  $\pm 100$  kb Radius um das Provirus identifiziert, deren Expression in differenzierten und undifferenzierten Zellklonen durch Microarray untersucht wurde. Die Analyse zeigte, dass 98/166 Genen hochreguliert waren, wobei nur bei 9% der Gene eine Hochregulation um mehr als 50% beobachtet wurde (**Abbildung 3.40B**) (Montiel-Equihua et al. 2012).



**Abbildung 3.40: Hochregulation nahe der Integrationsstelle gelegener Gene durch  $\beta$ -LCR/EFS. (A)** 16 MEL Einzelzellklone wurden auf Integrationsstellen untersucht, wovon fünf Klone mit mehreren Integraten und vier Klone mit einzelnen Integraten für nachfolgende Expressionsanalysen ausgewählt wurden (rot umrandet). **(B)+(C)** Gezeigt sind die  $\log_2$  Expressionsverhältnisse von Genen, die innerhalb eines 200 kb Radius um eine Integrat liegen **(B)** in differenzierten und **(C)** in undifferenzierten MEL Klonen. Innerhalb eines Radius von 100 kb waren 9% der Gene um mehr als 50% hochreguliert, bei einer Distanz >100 kb wurde nur ein Gen mit erhöhter Expression beobachtet. Die X-Achse zeigt den Abstand des analysierten Gens zur nächstgelegenen Integrationsstelle. Die horizontalen Linien markieren eine Hochregulation um 50, 100 und 300%. MEL, „murine Erythroleukämie Zellen;  $\beta$ -LCR, Lokuskontrollregion des  $\beta$ -Globingens; EFS, „elongation factor 1  $\alpha$  short form“ Promotor; kb, Kilobasenpaare. Modifiziert aus Montiel-Equihua et al. 2012.

## 4 DISKUSSION

Integrierende retrovirale Vektoren werden seit mehr als zwei Jahrzehnten zur Behandlung monogenetischer Erbkrankheiten verwendet. Immundefizienzen, insbesondere X-CGD, X-SCID, ADA-SCID und WAS konnten durch den Einsatz gammaretroviraler Vektoren dauerhaft geheilt werden. Das Auftreten vektorassoziiertes maligner Erkrankungen in einzelnen Patienten der durchgeführten X-SCID, X-CGD und WAS Studien stellte einen schweren Rückschlag für diese neue Therapieform dar. Beim erstmaligen Auftreten von Leukämien in einer X-SCID Studie (Hôpital Necker, Paris) wurde zunächst vermutet, dass die Kombination des konstitutiv exprimierten Transgens (*IL2RG* dient als Rezeptor für die Interleukine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21) mit einer möglichen genetischen Prädisposition der Patienten (familiärer Hintergrund, X-SCID Hintergrund) Auslöser für die unerwünschten Nebenwirkungen sein könnten (Hacein-Bey-Abina et al. 2003, Hacein-Bey-Abina et al. 2008). Das Auftreten von Nebenwirkungen in weiteren Gentherapiestudien (X-SCID, WAS) und eindeutigem Wachstums- und Proliferationsvorteil der genkorrigierten Zellen verdeutlichte, dass die integrierenden retroviralen Gentransfervehikel selbst ein erhöhtes Risiko zur Tumorgenese darstellen. Starke virale Promotor-/Verstärkerelemente gepaart mit einer bevorzugt auftretenden Integration in oder in der Nähe von Protoonkogenen (Deichmann et al. 2011) tragen einen bedeutenden Teil zur Genotoxizität der verwendeten gammaretroviralen Vektoren bei. Die Entwicklung von Vektoren, in denen die viralen Promotor- und Verstärkerregionen in der U3 Region der LTRs deletiert sind (SIN-Vektoren), stellte eine wichtige Sicherheitsoptimierung des retroviralen Gentransfers dar. Lentivirale SIN-Vektoren sind der derzeitige Standard in der klinischen Anwendung. Die Ergebnisse der ersten SIN-lentiviralen Gentherapiestudie zur Behandlung der X-ALD sind sehr vielversprechend: bis 6 Jahre nach Gentherapie wurden in allen 4 Patienten keine unerwünschten Ereignisse beobachtet. Lentivirale Vektoren integrieren zwar nicht wie gammaretrovirale Vektoren bevorzugt nahe der TSS, aber die präferentielle Integration innerhalb von Genen birgt das Risiko einer posttranskriptionellen Deregulation der zellulären Genexpression (Montini et al. 2009, Almarza et al. 2011, Cesana et al. 2012, Moiani et al. 2012). Infolge aberranten Spleißens entwickelte sich in einem SIN-lentiviral behandelten  $\beta$ -Thalassämie-Patienten eine klonale Dominanz, eine maligne Transformation fand hingegen nicht statt (Cavazzana-Calvo et al. 2010).

Das Verständnis der Vektorbiologie und der viral-zellulären Wechselwirkungen ist essentiell, um die Genotoxizität gentherapeutischer Vektoren zur Behandlung von Erbkrankheiten, Infektionskrankheiten und Krebserkrankungen weiter zu senken. Die Entwicklung neuer Testverfahren und Methoden soll helfen, das genotoxische Potential der viralen Genfähnen besser einschätzen und präzise voraussagen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine

genomweite funktionelle Integromanalyse etabliert, um mögliche Einflüsse des Vektordesigns auf Integrations- und Transkriptionscharakteristika und mögliche Nebenwirkungen untersuchen zu können.

Die Gefahr der posttranskriptionellen Deregulation der Genexpression durch das Provirus (Montini et al. 2009, Cavazzana-Calvo et al. 2010, Almarza et al. 2011) machte es notwendig, die Analysen zur Charakterisierung gentherapeutischer Vektoren zu erweitern. Zur effizienten Bestimmung der posttranskriptionellen Vektorgenotoxizität wurde die (nr)LAM-PCR in Kombination mit 454 Pyrosequenzierung mit cDNA als Ausgangsmaterial angewendet, um viralzelluläre Transkripte in einem Hochdurchsatzverfahren zu untersuchen (**Abbildung 3.3**). Das in dieser Arbeit etablierte Verfahren ermöglicht erfolgreich die transkriptomweite quantitative Detektion chimärer Transkripte, die unter Benutzung von kanonischen und kryptischen Spleißstellen gebildet werden. Die Identifikation kryptischer Spleißdonor- und akzeptorstellen ist durch die vermehrte Verwendung lentiviraler Vektoren Gegenstand intensiver Forschung und wurde kürzlich in weiteren Studien adressiert (Cesana et al. 2012, Moiani et al. 2012).

Die Kombination der in der vorliegenden Arbeit etablierten Methoden zur Integrom- und Transkriptomanalyse erlaubt es, die molekularen Auswirkungen des retroviralen Vektordesigns auf die Vektorbiologie zu erforschen. Einzelne Vektorelemente mit entscheidendem Einfluss auf die Integration und potentiell genotoxische Mechanismen, insbesondere vektorinduziertes aberrantes Spleißen können identifiziert und diese Ereignisse semiquantitativ bestimmt werden. Die funktionelle Integromanalyse, die Genom- und Transkriptomuntersuchungen mit Fokus auf vektorinduzierte Ereignisse vereint, ist essentiell, um eine umfassende und differenzierte Einschätzung der biologischen Sicherheit und Wirksamkeit gentherapeutischer Vektoren erstellen zu können.

Sicherheitsoptimierte gammaretro- und lentivirale SIN-Vektoren für die X-CGD Gentherapie wurden auf ihr Integrationsverhalten untersucht und ihre Sicherheit evaluiert (Kooperation mit M. Grez, Frankfurt, Deutschland; A. Thrasher und B. Gaspar, London, UK). Weiterhin wurden differenzierte Analysen lentiviral transduzierter Zellen zur Bestimmung der Einflüsse einzelner Vektorelemente auf die lentivirale Integration und Transkription durchgeführt (Kooperationen mit E. Montini/L. Naldini, Mailand, Italien; O. Cohen-Haguener, Paris, Frankreich; A. Thrasher, London, UK).

## 4.1 Genotoxizität und Wirksamkeit SIN-retroviraler X-CGD Vektoren

Die somatische Gentherapie mit retroviralen Vektoren hat sich als effektive Therapieform für die Korrektur der X-CGD erwiesen. In einer Reihe von Phase I/II Studien mit verschiedenen gammaretroviralen Vektoren konnten manifestierte, schwere Infektionen durch die Reinfusion *ex vivo* genkorrigierter autologer Zellen geklärt werden (Grez et al. 2011). Eine dauerhafte Korrektur der Krankheit wurde bislang jedoch nur in Zusammenhang mit einer klonalen Dominanz genkorrigierter Zellen und nachfolgender Ausbildung eines Myelodysplastischen Syndroms beobachtet. Die klonale Expansion dieser Zellen wurde durch die insertionelle Aktivierung des zellulärer Protoonkogens *EVI1* verursacht (Schwäble et al. 2011). Die Expression des therapeutischen Gens erfolgte in diesen Studien durch den konstitutiv exprimierenden viralen SFFV Promotor. Aufgrund der Methylierung des viralen SFFV Promotors *in vivo* kam es jedoch im Verlauf der Studie zur epigenetische Abschaltung („Silencing“) der Promotoraktivität und zum Verlust der Expression des therapeutischen Transgens (Stein et al. 2010).

Diese Beobachtungen zeigten, dass aufgrund der Erkennung viraler Sequenzen im humanen System und der Möglichkeit der Neutralisation durch wirtseigene Abwehrmechanismen – wie die epigenetische Stilllegung durch Methylierung – eine zukünftige Verwendung eukaryotischer und gewebespezifischer Promotoren dem Einsatz viraler Promotoren in der Gentherapie vorzuziehen ist. Die physiologische Regulation des *GP91PHOX* Transgens würde die erforderliche Expression in den hämatopoetischen Zellen nach myeloider Differenzierung erlauben. Um eine wirksame Abtötung mikrobieller Pathogene zu gewährleisten, ist jedoch eine entsprechend hohe Expression von *GP91PHOX* in den phagozytierenden Zellen notwendig (Bu-Ghanim et al. 1995, Defendi et al. 2009). Der minimale Promotor des endogenen GP91PHOX Proteins zeigt hingegen nur eine geringe Funktionalität (Skalnik et al. 1991). Daher werden in die neuen SIN-gammaretro- und lentiviralen Vektoren myeloid-spezifische interne Promotoren eingefügt. Analysen zur Wirksamkeit dieser Vektoren *in vitro* und *in vivo* zeigten, dass eine therapeutisch relevante Funktion der NADPH Oxidase auch bei geringen Vektordosen wiederhergestellt werden konnte (Santilli et al. 2011) und Stein, Scholz et al., *eingereicht bei HGT Clinical Trials*). Das Risiko einer Insertionsmutagenese kann somit bei einer entsprechend niedrigen Vektor-Dosierung minimiert werden.

### 4.1.1 Geringes genotoxisches Potential des SIN-gammaretroviralen X-CGD Vektors

Die Untersuchung der murinen hämatopoetischen Repopulation SINfes.gp91s-korrigierter X-CGD Zellen *in vivo* zeigte eine polyklonale Rekonstitution, welche über den gesamten analysierten Zeitraum von insgesamt 11 Monaten erhalten blieb. Die polyklonale Repopulation bei den Kontrolltieren (SF91eGPF mit vollständigen LTRs) entwickelte sich über die Zeit hin zu einer

oligoklonalen Situation (**Abbildung 3.5**). Ein Vergleich der Klonalität und Diversität der Zellpopulationen zeigte, dass SINfes.gp91s-korrigierte Zellen eine höhere Heterogenität aufwiesen (**Abbildung 3.6**) und obwohl einzelne Integrate in primären und sekundären SINfes.gp91s Mäusen auf dominante Klone hindeuteten, gab es keine Anzeichen für eine *in vivo* Selektion. Keiner der Integrationsklone leistete einen kontinuierlich ansteigenden Beitrag zur Hämatopoese und die Integrate wurden nur in vereinzelt Zellfraktionen bzw. Mäusen detektiert (**Abbildung 3.7**). Prädominante Klone aus primären SINfes.gp91s Mäusen waren in sekundären Mäusen nicht nachweisbar oder zeigten sehr geringe Beiträge. Dies deutet auf das Fehlen von zur Repopulation befähigenden Eigenschaften dieser Klone hin.

Bei einer vergleichenden Analyse des genotoxischen Kontrollvektors SF91eGFP zählten hingegen Integrate u.a. in *Evi1*, *Hoxa6* und *Glx3* zu den am häufigsten detektierten, die auch wiederholt in verschiedenen Mäusen, unterschiedlichen Fraktionen und an unterschiedlichen Zeitpunkten identifiziert werden konnten (**Abbildung 3.7**). 1,5fach erhöhte Transkriptionsraten der Gene *Evi1*, *Hoxa6* und *Glx3* in SF91eGFP-transduzierten Klonen deuten auf eine mögliche klonale Expansion dieser Klone durch insertionelle Aktivierung hin (Stein, Scholz et al., eingereicht bei HGT Clinical Trials). Die Überexpression von *Evi1* induziert in Mäusen ein MDS, welches unter anderem durch eine Hyperproliferation von Knochenmarkzellen ausgelöst wird (Buonamici et al. 2004). Die Aktivierung von *EVI1* wurde auch in den klinischen X-CGD Gentherapiestudien als Auslöser für die klonale Expansion genkorrigierter Zellen, genomische Instabilität und die Entstehung eines Myelodysplastischen Syndroms mit Monosomie 7 identifiziert (Ott et al. 2006, Stein et al. 2010). In ähnlicher Weise konnte den Genen *Hoxa6* und *Glx3* eine Rolle bei der malignen Transformation und Tumorentstehung nachgewiesen werden (Dickson et al. 2009, Bach et al. 2010, Qu et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnte bei den prädominanten SINfes.gp91s Integraten keine erhöhte Expression der entsprechenden Gene festgestellt werden. Klone mit vorübergehend stärkeren Beiträgen wurden auch in einer lentiviralen klinischen X-ALD Gentherapiestudien beobachtet, in der es bislang keine Anzeichen für das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen gibt (Cartier et al. 2009). Es ist davon auszugehen, dass transiente dominante Klone auf die natürliche Dynamik der Hämatopoese zurückzuführen sind.

Das Integrationsprofil zeigte bei beiden Vektoren eine charakteristische, gammaretrovirale Integrationsstellenverteilung mit einer Präferenz für die Transkriptionsstartstelle von genkodierenden Regionen. Das Auffinden bevorzugter Integrationsorte deutet auf eine, wenn überhaupt, nur geringe klonale Selektion durch den SINfes.gp91s-Vektor hin (**Abbildung 3.8**). Die Anhäufung von Integraten im *Mds1/Evi1*-Lokus war bei dem SINfes.gp91s-Vektor im Vergleich zum SF91eGFP-Vektor signifikant geringer ( $p \leq 0,026$ ,  $\chi^2$ -Test). In Bezug auf die Größe des *Mds1/Evi1* Lokus im murinen Genom war der Anteil der SINfes.gp91s-Integrate in

Prätransplantproben und sekundären Mäusen nicht signifikant höher als der Erwartungswert (0,04%, **Abbildung 3.9A**). Die detaillierte Analyse der *Mds1/Evi1*-Integrate zeigte eine analoge Lokalisation der SF91eGFP und SINfes.gp91s Integrate mit einer Anhäufung 90 kb stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle von *Evi1* ohne ersichtliche Selektion der SINfes.gp91s Integrate (**Abbildung 3.9B**). Die Deletion der U3 und die Einfügung des *c-fes* Promotors scheinen somit keinen signifikanten Einfluss auf die Integrationspräferenz von gammaretroviralen Vektoren auszuüben. Die beobachteten Unterschiede in den Integrationsprofilen werden vielmehr durch über die Zeit stattfindende klonale Selektion verursacht. Die Abschätzung des genotoxischen Potentials mithilfe der funktionellen Transformation einer IL-3-abhängigen Zelllinie untermauert das potentiell sichere Profil des SINfes-Vektors. Das Transformationspotential war dem SIN-lentiviraler Vektoren mit starkem internen Promotor vergleichbar ( $<3,2 \times 10^{-6}$  (**Abschnitt 3.2.1.3**) vs.  $1,0 \pm 0,5 \times 10^{-6}$  (**Abschnitt 3.3.1.4**)) und deutlich verringert gegenüber LTR-getriebenen gammaretroviralen Vektoren (SF91eGFP:  $<93,4 \times 10^{-6}$ ).

Die Untersuchung chimärer Fusionstranskripte fand bei gammaretroviralen Vektoren bislang keine große Beachtung, da die Protoonkogen-Aktivierung bei den bisher verwendeten Vektoren eine deutliche größere Gefahr darstellte. Dennoch befinden sich etwa 40 - 50% der Integrate innerhalb genkodierender Regionen (Wu et al. 2003, Mitchell et al. 2004). Infolge des gammaretroviralen Mechanismus zur unterschiedlichen Regulation der identischen 5'- und 3'-LTRs findet zudem mit relativ hoher Frequenz ein Überlesen der Polyadenylierungssignale im 3'-LTR statt (Furger et al. 2001, Zaiss et al. 2002). Mit der Entwicklung der SIN-LTRs wurde das Risiko der Protoonkogen-Aktivierung deutlich herabgesetzt, so dass die posttranskriptionellen Mechanismen der Genderegulation auch in gammaretroviralen Vektoren an Bedeutung gewinnen. Mithilfe der funktionellen Integromanalyse konnte demonstriert werden, dass trotz vermeintlich hoher ‚Readthrough‘-Transkriptionsrate des SINfes.gp91s Vektors in X-CGD Stamm- und Vorläuferzellen nur ein Bruchteil davon zu detektierbaren viral-zellulären Fusionstranskripten prozessiert wird (**Abbildung 3.10**).

Obwohl der SINfes.gp91s Vektor ein charakteristisches gammaretrovirales Integrationsmuster mit zum Teil gehäufte Integration in bzw. in der Nähe von Protoonkogenen aufweist, konnte im Rahmen dieser präklinischen Studie gezeigt werden, dass keine offensichtliche klonale Selektion durch diesen Vektor verursacht wird. Darüber hinaus geht von dem SINfes.gp91s Vektor nur ein sehr geringes Risiko der posttranskriptionellen Genderegulation durch chimäre Fusionstranskripte aus, die trotz hoher ‚Readthrough‘-Transkription nur äußerst selten entstehen. Das potentielle Transformationspotential von SINfes.gp91s ist mit dem eines SIN-lentiviralen Vektors vergleichbar, so dass diesem SIN-gammaretroviralen Vektor insgesamt eine geringe Genotoxizität beigemessen werden kann.

#### 4.1.2 Sicheres präklinisches Integrationsprofil eines SIN-lentiviralen X-CGD Vektors

Die Untersuchung der murinen hämatopoetischen Repopulation SIN-lentiviral transduzierter X-CGD Zellen zeigte in den meisten Rezipienten eine geringe Genmarkierung (**Abbildung 3.13**). Aufgrund der geringen Transduktionseffizienz wurden in dieser Studie keine weiteren Klonalitätsanalysen durchgeführt. Die Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die Charakterisierung des Integrationsprofils. Bei allen bisherigen klinischen Gentherapiestudien war eine Überexpression von *EVI1*, *EVI1/MDS1* oder *LMO2* ursächlich für die Entwicklung der Leukämien bzw. der MDS (Hacein-Bey-Abina et al. 2008, Stein et al. 2010). In den Frankfurter und Züricher X-CGD-Studien wurden in dominanten Klonen darüber hinaus Integrate in den Protoonkogenen *PRDM16*, *CAMTA1* und *STAT3* identifiziert (Ott et al. 2006 und A. Paruzynski, persönliche Kommunikation). Die Charakterisierung des lentiviralen Integrationsprofils ergab keine Integrationsstellen in den bekannten Protoonkogenen *Mds1/Evi1*, *Prdm16*, *Camta1*, *Stat3* oder *Lmo2*. Die Untersuchung bevorzugter Integrationsorte erbrachte sechs Genloki, in denen sich 13 der 196 (6,6%) Integrate befanden (**Abbildung 3.14**). Außer dem Tumorsuppressorgen *Rbbp8* Gene wurde bislang keines der betroffenen Gene mit der Entstehung von Krebs in Zusammenhang gebracht. Die Deregulation oder Inaktivierung eines Tumorsuppressors könnte jedoch zur Transformation einer Zelle beitragen. Die Herunterregulation der Genexpression einzelner zellulärer Gene durch lentivirale Vektoren wurde in Einzelzellklonen bereits demonstriert (Maruggi et al. 2009). In einem Mausmodell führte die insertionelle Inaktivierung von *Ebf1*, einem wichtigen Regulator der B-Zell-Lymphopoese, zu einer akuten lymphatischen Leukämie der B-Zelllinie. Die lentivirale Integration erfolgte im achten Intron von *Ebf1* und hatte die Bildung verschiedener aberranter viral-zellulärer Fusionstranskripte und den Verlust des normalen Transkripts voller Länge zur Folge (Heckl et al. 2012). Die bevorzugte Integration in ein Tumorsuppressorgen stellt daher ein potentiell genotoxisches Ereignis dar.

Ein weiterer bevorzugter Integrationsort wurde ca. 60 kb stromaufwärts der TSS des *Cd93* Gens detektiert. Dieses Gen kodiert für einen myeloid-spezifischen Rezeptor, der an der Phagozytose, der Aktivierung von Makrophagen und der Beseitigung apoptotischer Zellen beteiligt ist. Dies könnte auf einen moderaten Einfluss des myeloid-spezifischen Promotors auf das Integrationsprofil hindeuten. Der chimäre Promotor, der durch Fusion der 5'-flankierenden Regionen von *c-fes* und *Cathepsin G* hergestellt wurde, enthält im *Cathepsin G* Promotor Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor C/EBP- $\alpha$ . Dieser Transkriptionsfaktor (TF) besitzt bei myeloider Differenzierung eine hohe Expression (Khanna-Gupta 2008) und könnte als sogenannter Pionierfaktor, welcher an heterochromatische Bereiche bindet, oder als Chromatin-öffnendes Element fungieren (Santilli et al. 2011). Dadurch kann eine hohe Expression des Transgens auch in neutrophilen Granulozyten erzeugt werden, die einen hohen Anteil

kondensierten Chromatins aufweisen. Für gammaretrovirale Vektoren wurde gezeigt, dass an Verstärker/Promotorsequenzen der viralen LTRs bindende TF entscheidende Faktoren bei der Wahl des Integrationsortes sind, die zu einer gehäuften Integration in zellulären Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) -reichen Regionen führt (Felice et al. 2009). Das Einfügen des *Cathepsin G* Promotors mit Bindungsstellen für den endogenen Transkriptionsfaktor C/EBP- $\alpha$  könnte in ähnlicher Weise eine Promotor-abhängige Integration des lentiviralen Vektors bewirken, die durch Bindung des myeloid-spezifischen Transkriptionsfaktors C/EBP- $\alpha$  mediiert wird.

Basierend auf der relativ geringen Anzahl der Integrationsstellen (>200) zeigten unsere Analysen ein sicheres Integrationsprofil des SIN-lentiviralen X-CGD Vektors. Um diesen Vektor auch in klinischen Studien zum Einsatz bringen zu können, war jedoch eine Optimierung des Vektordesigns zur Verbesserung der Transduktionseffizienz notwendig. Diese Bemühungen resultierten in dem pCCL.CHIM.gp91s Vektor (Santilli et al. 2011), welcher schließlich auch bei der klinischen Gentherapie eines X-CGD Patienten angewendet wurde (siehe **Abschnitt 4.1.4**).

#### 4.1.3 Der klinische Einsatz von SIN-retroviralen X-CGD Vektoren

SIN-lentivirale Vektoren sind die bevorzugten Gentransfervehikel derzeitiger Gentherapiestudien, da sie gegenüber gammaretroviralen Vektoren ein vermutlich sichereres Integrationsprofil ohne bevorzugte Integration in Protoonkogenen und genregulatorischen Bereichen aufweisen. Jedoch ist die Entwicklung HIV-1 basierter Vektoren für die klinische Anwendung immer noch mit Schwierigkeiten verbunden. Die Ausbeute infektiöser Viruspartikel ist oftmals gering und die Herstellung im klinischen Maßstab durch deren Instabilität erschwert (Carmo et al. 2006). Für gammaretrovirale Vektoren bestehen dagegen schon gut etablierte Produktions-Plattformen, die eine rasche Weiterentwicklung und vergleichsweise schnelle Anwendung dieser Vektoren ermöglichen (Maetzig et al. 2011). Durch ein sorgfältiges Vektordesign, das vor allem SIN-LTRs beinhaltet, kann die Sicherheit gammaretroviraler Vektoren deutlich erhöht werden. Ein sicherheitsoptimierter SIN-gammaretroviraler Vektor zur Behandlung der X-SCID wurde bereits für eine klinische Gentherapiestudie zugelassen, die sich derzeit im Stadium der Patientenrekrutierung befindet (Cavazzana-Calvo et al. 2012 und <http://www.clinicaltrials.gov>).

Die Evaluation neuer gentherapeutischer Vektoren für die X-CGD zeigte, dass sicherheitsoptimierte SIN-gammaretrovirale Vektoren durchaus ein mit SIN-lentiviralen Vektoren vergleichbares Sicherheitsprofil aufweisen. Mit beiden Vektortypen konnte in den präklinischen Untersuchungen eine effiziente Wiederherstellung der Funktion neutrophiler

Granulozyten ohne offensichtliche Nebenwirkungen erreicht werden. Gegenwärtig werden auch alpharetrovirale SIN-Vektoren als weitere vielversprechende Alternative für die X-CGD Gentherapie getestet. Diese Vektoren weisen ein relativ neutrales Integrationsspektrum auf (Suerth et al. 2012) und im Gegensatz zu SIN-lentiviralen Vektoren wurden bisher keine durch aberrantes Spleißen erzeugte viral-zellulären Fusionstranskripte detektiert (Kaufmann et al. 2012).

Die tatsächliche biologische Sicherheit und Wirksamkeit der genterapeutischen Vektoren kann letztendlich jedoch nur durch klinische Studien endgültig bestimmt werden. Die Zulassung neuer Arzneimittel ist ein langwieriger Prozess und erfordert eine Vielzahl pharmakodynamischer, pharmakokinetischer und toxikologischer Untersuchungen. Die in dieser Arbeit erstellten Daten zur Sicherheit des SIN<sub>fes</sub>.gp91s Vektors gingen in einen Antrag zur Durchführung einer klinischen X-CGD Gentherapiestudie ein und führten im Januar 2013 zur ersten Genehmigung einer klinischen Studie unter Verwendung eines sicherheitsoptimierten SIN-gammaretroviralen X-CGD Vektors gemäß §42 Abs. 2 des Arzneimittelgesetzes (AMG).

#### 4.1.4 Klinische SIN-lentivirale X-CGD Gentherapie

Die lentivirale Gentherapie eines 16-jährigen X-CGD Patienten mit schweren therapieresistenten Infektionen erfolgte im Juni 2011 im ‚Great Ormond Street Hospital for Children‘, London, UK. Der Junge litt an lebensbedrohlichen Pilzinfektionen in der Lunge, ein passender Spender für eine Knochenmarktransplantation konnte bis *dato* nicht gefunden werden. Aufgrund der Schwere der Infektionen zum Zeitpunkt der Gentherapie konnte nur eine milde Konditionierung mit reduzierter Intensität durchgeführt werden. Die SIN-lentivirale Gentherapie mit dem Vektor pCCL.CHIM.gp91s (Santilli et al. 2011) erwies sich als sehr wirksam und bestehende Infektionsherde und Granuloma wurden erfolgreich innerhalb der ersten 3 Monate eliminiert. Danach sank der Anteil der korrigierten Zellen von 23% auf 0,1 - 1% ab. Eine Expression des therapeutischen *GP91PHOX* Transgens konnte nach diesem Zeitpunkt nicht mehr detektiert werden. Aufgrund eines ineffizienten ‚Homings‘ der genkorrigierten Zellen konnte keine Langzeit-Korrektur des genetischen Defekts erreicht werden.

An den frühen Zeitpunkten nach Gentherapie wurde eine effektive Transduktion der myeloiden Zellfraktion mit einer polyklonalen hämatopoetischen Repopulation ohne Anzeichen einer klonalen Expansion beobachtet (**Abbildung 3.16** und **3.17**). Die am häufigsten detektierten Integrationsklone der letzten beiden Zeitpunkte zeigten Integrate innerhalb des genkodierenden Bereichs von *CNTNAP2* und stromabwärts von *FLRT2*. Beide Gene spielen eine Rolle bei der Zelladhäsion und wurden bislang nicht mit der Entwicklung von Dysplasien des Blutsystems oder Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht. Insgesamt konnten 1869 Integrationsstellen identifiziert werden, die eine charakteristische Verteilung mit bevorzugter

Integration in genkodierenden Regionen (72,1%) aufwiesen. 21% der Integrate lagen in bevorzugten Integrationsorten (**Abbildung 3.19A**). Die Betrachtung dieser Loki ergab eine Anhäufung von Integraten in den Protoonkogenen *STAT5B* und *STAT3*. Ein Integrat wurde im *MDS1/EVI1* Locus detektiert. Bei keinem dieser Integrate konnte eine *in vivo* Selektion beobachtet werden (**Abbildung 3.18**). Eine vergleichende Analyse der bevorzugten Integrationsorte mit Daten einer lentiviralen X-ALD Studie zeigte, dass diese Integrate hauptsächlich auf lentivirale Integrationspräferenzen zurückzuführen sind (**Abbildung 3.19B**). Diese Lentivirus-spezifischen Regionen sind unter anderem durch die offene Form des Chromatins im Bereich aktiv transkribierter Gene (Schroder et al. 2002), Wechselwirkungen mit dem zellulären Faktor LEDGF (Llano et al. 2004, Ciuffi et al. 2005), sowie Interaktionen mit weiteren zellulären Faktoren (Kalpana et al. 1994, Mulder et al. 2002, Violot et al. 2003) zu erklären.

Trotz des nur kurzen Untersuchungszeitraums von wenigen Monaten – es konnte bei diesem Patienten kein Langzeiterfolg erzielt werden – lassen sich wichtige Rückschlüsse und Vergleiche mit bisherigen gammaretroviralen X-CGD Studien ziehen. Die Untersuchung des klonalen Repertoires des X-CGD Patienten ermöglichte erstmals den Vergleich humaner gammaretroviraler und lentiviraler Integrationsprofile zur Untersuchung des Einflusses des genetischen Hintergrunds der X-CGD auf die Integration und die Erforschung potentieller X-CGD-spezifischer ‚Hotspots‘. Ein Großteil der Integrate wurde durch allgemeine (gammaretro- und lentiviralen) Integrationspräferenzen abgedeckt, unter die auch der *MDS1/EVI1* Locus fällt (**Abbildung 3.19B** und **3.20**). Gemeinsame, vom verwendeten Vektor unabhängige X-CGD-‚Hotspots‘ wurden nicht beobachtet (**Abbildung 3.21**). Daraus lässt sich schließen, dass die genetische Alteration der X-CGD nicht in einem krankheitsspezifischen Integrationsmuster resultiert.

Diese Untersuchungen zeigen, dass prinzipiell mit der SIN-lentiviralen Gentherapie eine effektive und sichere Behandlung der X-CGD erreicht werden kann. Der Vektor pCCL.CHIM.gp91s weist ein sicheres Integrationsprofil auf und verursachte keine klonale Selektion der genmodifizierten Zellen *in vivo*. Ein Langzeiterfolg der lentiviralen X-CGD Gentherapie konnte jedoch wie bei den frühen gammaretroviralen Gentherapiestudien nicht erzielt werden. Dies könnte auf ein mangelndes ‚Engraftment‘ der genkorrigierten Zellen zurückzuführen sein, worauf im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

#### 4.1.5 ‚Engraftment‘ genkorrigierter X-CGD Zellen

Die lentivirale Gentherapie führte anfangs zur effizienten Wiederherstellung der biochemischen Funktion genkorrigierter Phagozyten, jedoch wurde keine dauerhafte therapeutisch relevante Genmarkierung erreicht. Eine mögliche Ursache für den Verlust der Genmarkierung ist die nicht-

myeloablative Konditionierung. Im Gegensatz zum *IL2RG*-Transgen in X-SCID Studien vermittelt die Expression des *GP91PHOX* Gens den genkorrigierten Zellen keinen selektiven Wachstumsvorteil. Für genkorrigierte X-CGD Zellen müssen, wie z.B. auch bei ADA-SCID, vor der Transplantation im Knochenmark Nischen geschaffen werden, um ein erfolgreiches 'Engraftment' der Vorläuferzellen/hämatopoetischen Stammzellen zu ermöglichen. In mehreren ADA-SCID Gentherapiestudien konnte das lymphoide Zellkompartiment mithilfe einer nicht-myeloablativen Konditionierung erfolgreich rekonstituiert werden, jedoch trugen nur 0,1 - 3,5% der Granulozyten das *ADA* Gen. In einigen Fällen musste die Enzymersatztherapie mit PEG-ADA 3 - 6 Monaten nach Gentherapie wieder aufgenommen werden (Gaspar et al. 2006, Aiuti et al. 2009, Gaspar et al. 2011). Die nicht-myeloablative Konditionierung von Primaten, die autologe gammaretroviral oder lentiviral transduzierte hämatopoetische Stammzellen erhielten, führte ohne eine *in vivo* Selektion generell nur zu einer niedrigen langfristigen Genmarkierung (meist unter 1%) (Huhn et al. 1999, Rosenzweig et al. 1999, Brenner et al. 2006, Kahl et al. 2006, Kang et al. 2006). Bei der Behandlung der X-CGD fand bislang nur bei 3 von 13 Patienten, die vor der Gentherapie einer milden Chemotherapie unterzogen wurden, ein signifikantes Langzeit-'Engraftment' der genkorrigierten Zellen statt. In allen drei Fällen wurde eine durch insertionelle Aktivierung von *EV11* ausgelöste klonale Expansion beobachtet, was darauf hinweist, dass das Langzeit-Überleben der transduzierten Zellen auf dieses Ereignis zurückzuführen ist (Grez et al. 2011). Eine partielle Konditionierung scheint bei X-CGD somit nicht ausreichend zu sein.

Neutrophile Granulozyten sind mit einem Anteil von 50 - 65% die häufigsten Leukozyten. Ihre kurze Lebensdauer von nur 2 - 3 Tagen und der hohe Bedarf dieser Zellen erfordern, dass eine große Zahl hämatopoetischer Stammzellen und myeloider Vorläuferzellen korrigiert wird, die zur Produktion der Phagozyten zur Verfügung stehen. Zurzeit werden diverse Untersuchungen an X-CGD Zellen durchgeführt, um eventuelle zellspezifische Merkmale ausfindig zu machen, die ein effektives 'Engraftment' verhindern könnten (S. Stein, persönliche Kommunikation). So könnte z.B. die inflammatorische Umgebung einen negativen Effekt auf das 'Engraftment' der X-CGD Zellen haben. Ein weiterer potentieller Faktor für das schlechte 'Engraftment' der genkorrigierten Zellen könnte das 'Priming' der HSC mit Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor hin zur myeloiden Zelllinie sein (Aiuti et al. 2012). Die Identifikation entscheidender molekularer Faktoren sind von großer Bedeutung für die Planung zukünftiger klinischer Studien. Eine Möglichkeit das 'Engraftment' genmodifizierter Zellen zu erhöhen, ist die Verwendung eines *in vivo* selektierbaren Markers wie die mutierte Form der Methylguanin-Methyltransferase (MGMT<sup>P140K</sup>). Durch Administration des Wildtyp MGMT-Inhibitors O6-Benzylguanin in Kombination mit N,N'-Bis(2-chlorethyl)-N-nitrosoharnstoff konnte in nicht-humanen Primatenmodellen ein stabiles 'Engraftment' genkorrigierter Zellen in allen Zelllinien, auch der myeloiden, erreicht werden (Beard et al. 2010). Für kommende Gentherapiestudien wird – soweit möglich – eine intensivere Konditionierung in Erwägung gezogen. Dies wurde z.B. auch für die

lentivirale Gentherapie der X-ALD angewandt, bei der mit einer myeloablativen Konditionierung eine langfristige Genmarkierung mit ca. 10% genkorrigierten Zellen aller hämatopoetischen Zelllinien bis zu 6 Jahre nach Gentherapie erreicht wurde (Cartier et al. 2009 und C. Bartholomä, persönliche Kommunikation). Derzeit läuft eine genehmigte multizentrische klinische Phase I/II Studie zur gentherapeutischen Behandlung der X-CGD mit voriger myeloablativer Konditionierung. In 4 Kliniken in Frankfurt, Paris, Zürich und London werden jeweils 5 Patienten mit dem SIN-lentiviralen Vektor pCCL.CHIM.gp91s (**Abschnitt 4.1.4**) behandelt (<http://clinicaltrials.gov/> und M. Grez, persönliche Kommunikation).

## **4.2 Einfluss des lentiviralen Vektordesigns auf Integration und Transkription**

Die Integration des Vektors in das Wirtsgenom ist der Schlüsselfaktor für den Erfolg der retroviralen Gentherapie. Sie ist jedoch auch die mögliche Ursache für die Entwicklung unerwünschter Nebenwirkungen durch Insertionsmutagenese. Die unvollständige Kenntnis der genauen Funktionen und Wechselwirkungen viraler und zellulärer Elemente bei der Integration und Transkription stellt ein großes Hindernis bei der Entwicklung sicherer und effizienter gentherapeutischer Vektoren dar. Für die Beurteilung potentiell genotoxischer Eigenschaften verschiedener Vektorsysteme und -elemente ist ein besseres Verständnis der Mechanismen und Interaktionen des Vektors mit dem Wirtsgenom, der bei der Auswahl des Integrationsortes bestimmenden viralen und zellulären Faktoren und des Einflusses funktioneller Vektorelemente, wie z.B. Verstärker/Promotor, Spleiß- und Polyadenylierungssignale, auf die Integration und Genexpression entscheidend. Die Untersuchung einer Reihe von diversen lentiviralen Vektoren durch funktionelle Integromanalyse diente dazu, den Einfluss verschiedener Vektorstruktur- und Sicherheitselemente, insbesondere SIN-Konfiguration, Promotoren und Insulatoren, auf deren Integrationspräferenz und die Transkription zellulärer Gene zu bestimmen.

### **4.2.1 Promotoren beeinflussen das initiale Integrationsstellenprofil**

Bei herkömmlichen Integrationsstellenanalysen werden die Integrationsprofile der Vektoren nach einem relativ langen Zeitraum nach Transduktion analysiert. Dieses kann sich aufgrund der über die Zeit möglichen Selektion aber von dem Integrationsmuster, welches direkt nach der Integration vorliegt, unterscheiden. Um die anfängliche initiale Integrationspräferenz unterschiedlicher lentiviraler Vektoren feststellen zu können, wurden in dieser Arbeit die Integrationsprofile zusätzlich an einem sehr frühen Zeitpunkt nach Transduktion untersucht. Der Lebenszyklus von HIV-1, definiert als die Zeit von der Ausknospung reifer Viruspartikel bis zur

Bildung neuer infektiöser Virionen, dauert mindestens 1,2 Tage, wobei etwa 0,9 Tage auf die intrazelluläre Phase entfallen (Perelson et al. 1996). Die Teilungsrate muriner ‚Lineage‘-negativer Zellen liegt *in vitro* zwischen 1x in 24 h und 1 x in 50 h. Aufgrund dessen wurde für die Analyse des ursprünglichen Integrationsprofils der 48 h-Zeitpunkt nach Transduktion ausgewählt, an dem noch keine merkliche klonale Selektion stattgefunden hat.

Zur Untersuchung des Einflusses des lentiviralen Vektordesigns auf die Integration wurden die Integrationsprofile von lentiviralen Vektoren, die sich in der LTR-Konfiguration, den Promotoren und der Anwesenheit eines Transgens unterschieden, in frühen murinen *lin*-Vorläuferzellen *in vitro* analysiert. Hochauflösende vergleichende Integrationsstellenanalysen zeigten kurz nach der Transduktion (48 h) unabhängig von der LTR-Konfiguration und Anwesenheit des Transgens nur geringfügige Unterschiede zwischen den Integrationsprofilen der Vektoren, die einen Promotor enthielten, wobei die Art und Aktivität des verwendeten Promotors kaum eine Rolle spielte (**Abbildung 3.28**). Dagegen wies das Integrationsprofil des Leervektors, der weder Promotor/Verstärker noch Transgen enthält, deutliche Unterschiede zu den restlichen Vektoren auf. Die präferentielle Integration MLV-abgeleiteter Vektoren in genregulatorischen Regionen wird durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren im Präintegrationskomplex und an zelluläre TFBS in Kooperation mit der viralen Integrase verursacht. Lentivirale Vektoren zeigen keine derartige Präferenz, TFBS Motive sind im Bereich von lentiviralen Integraten eher unterrepräsentiert. Der Austausch der HIV-1 U3 durch die U3 von MLV hob diese negative Tendenz auf (Felice et al. 2009). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Integration lentiviraler Vektoren bei Einfügen eines exogenen Promotors durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden kann. Wie in **Abschnitt 4.1.2** beschrieben kann dies sogar zu einem Promotor- bzw. zelltypspezifischen Integrationsprofil beitragen.

#### 4.2.2 Die Aktivität des Promotors bestimmt das selektionierte Integrationsstellenprofil

Nach 14 - 60 Tagen *in vitro* Kultur der transduzierten Zellen wurde basierend auf der Analyse der Beiträge einzelner Integrationsklone nur mit dem LV.SF.LTR-Vektor eine sichtbare klonale Selektion festgestellt (**Abbildung 3.23**). Zudem wurde eine generelle Verschiebung der Integrationsprofile beobachtet, die entsprechend des Promotortyps erfolgte (**Abbildung 3.27**). Der Leervektor LV.W ohne Promotor und der von dem schwachen PGK Promotor getriebene SIN-Vektor SIN.LV.PGK behielten ein sehr ähnliches Integrationsmuster. Auch der SFFV-LTR getriebene Vektor LV.SF.LTR und dessen SIN-Analogon SIN.LV.SF zeigten weiterhin ein vergleichbares Integrationsprofil. Der Vektor LV.WET mit leberspezifischem Promotor und ohne Transgen zeigte auf dieser Ebene der Analyse ein sich gänzlich von den anderen Vektoren unterscheidendes Integrationsprofil. Die klonale Selektion und Verschiebung des

Integrationsmusters durch LV.SF.LTR konnte bei transduzierten *Cdkn2a*<sup>-/-</sup>-Zellen *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden (Montini et al. 2009), jedoch nicht für die SIN-lentivirale Vektoren SIN.LV.SF (Montini et al. 2009) und SIN.LV.PGK (Montini et al. 2006). Die inhärente Neigung der *Cdkn2a*<sup>-/-</sup>-Zellen zur Tumorentstehung könnte die Detektion von seltenen oder sich zu einem späten Zeitpunkt entwickelnder Tumoren verhindern, so dass eine schwach ausgeprägte klonale Selektion in diesem *in vivo* Mausmodell nicht erfasst werden kann. Auch die Dauer der *in vitro* Kultur (14 Tage) könnte in diesem Fall nicht ausreichend gewesen sein, um messbare Verschiebungen des Integrationsprofils observieren zu können. In der vorliegenden Arbeit konnte durch vergleichende Untersuchungen hochaufgelöster Integrationsprofile erstmals nachgewiesen werden, dass mit einem internen SFFV Promotor in einem SIN-Vektor eine Selektion vonstattengeht, ähnlich wie in Verbindung mit einem vollständig LTR-getriebenen SFFV-Vektor – wenn auch in geringerem Maße. Der SIN-Vektor mit PGK Promotor zeigte dagegen keine Anzeichen einer klonalen Selektion.

Zur Einschätzung der Genotoxizität retroviraler Vektoren existiert inzwischen eine Vielzahl verschiedener *in vitro* und *in vivo* Modelle. Während *in vivo* Modelle wie das *Cdkn2a*<sup>-/-</sup> oder krankheitsspezifische Modelle die komplexen Zusammenhänge der Krankheitsentstehung besser widerspiegeln (Wu et al. 2011), sind *in vitro* Modelle schneller und kosteneffizienter durchführbar. Die funktionelle Transformation der IL-3-abhängigen Zelllinie 32D liefert quantifizierbare Transformationsraten, die einen schnellen und einfachen Vergleich verschiedener Vektoren ermöglicht. Die geringe Basistransformation macht diesen Test zudem sensitiver als zu Tumoren neigende Mausmodelle (Li et al. 2009). Eine durch den SIN.LV.SF-Vektor ausgelöste klonale Selektion bzw. funktionelle Transformation konnte mithilfe dieses Genotoxizitätstests bestätigt werden. Das genotoxische Potential des SIN.LV.SF-Vektors wurde hierbei mit  $1,0 \pm 0,5 \times 10^{-6}$  bestimmt, während mit dem SIN.LV.PGK-Vektor kein genotoxisches Potential festgestellt wurde (**Abbildung 3.34A**).

Die genaue Untersuchung der Lage der Integrate in *Gbr*, einem bevorzugten Integrationsort in transformierten Klonen dieses Genotoxizitätstests, zeigte eine Akkumulation von LV.SF.LTR-Integraten in einem 25 kb Bereich stromaufwärts von Exon 2, während die SIN.LV.SF-Integrate sich über einen deutlich größeren Bereich von 150 kb verstreuten (**Abbildung 3.34B**). Mit einem lentiviralen Vektor mit WT HIV LTR und zusätzlichem internem SFFV Promotor waren Integrate im *Gbr* Locus hingegen über 50 kb verteilt (Bokhoven et al. 2009). Auch die Integrationsprofile der in **Abschnitt 3.2.1** untersuchten gammaretroviralen Vektoren wiesen eine ähnliche Änderung in der Integrationsstellenverteilung auf. Integrate im *Mds1/Evi1* Locus wurden mit beiden Vektoren (SIN- und Voll-LTR) detektiert, mit dem SIN-Vektor jedoch mit reduzierter Frequenz und trotz ähnlichem Muster mit geringfügigen Abweichungen im Zielort (**Abbildung 3.6B**). Somit können in der globalen Integrationsstellenverteilung keine

signifikanten Unterschiede zwischen SIN- und Voll-LTR Vektoren festgestellt werden, hochauflösende Integrationsstellenanalysen zeigen aber sowohl bei lenti- als auch gammaretroviralen Vektoren eine Defokussierung der detektierten Integrate. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch das SIN-Design und die interne Lage des Promotors eine diffusere Integration in bestimmten genomischen Bereichen bzw. vielmehr eine weniger spezifische Selektion der Integrate stattfindet. Bushman et al. berichteten von ähnlichen Beobachtungen beim Vergleich bevorzugter Integrationsorte früher (Voll-LTR) und aktueller (SIN-LTR) gammaretroviraler Gentherapiestudien zur Behandlung der X-SCID (Vortrag F. Bushman, DG-GT 2013).

#### 4.2.3 Änderung des Integrationsstellenprofils durch Insulatoren

Zur Untersuchung des Einflusses weiterer Sicherheitselemente in lentiviralen Vektoren wurde eine bislang einmalige Datensammlung insulierter und nicht-insulierter Vektoren generiert und diese mit Hinblick auf die Effektivität des jeweiligen Insulators und dessen Auswirkung auf das Integrationsstellenprofil untersucht. Insgesamt konnten 12456 eindeutig zuordenbare Integrate identifiziert werden. Ein Vergleich der Integrationsprofile insulierter und analoger nicht-insulierter Vektoren nach bis zu 12 Wochen *in vitro* Kultur der transduzierten Zellen zeigte, dass mit dem Insulator ‚4xCTF‘ der Einfluss eines starken internen Promotors auf das Integrationsprofil nivelliert wurde (**Abbildung 3.38C**). Der Vektor mit diesem Insulator wies ein ähnliches Profil wie der SIN-lentivirale Vektor mit schwachem internen PGK Promotor auf, während die beiden anderen Insulatoren – ‚8xCTF‘ und ‚6xCTCF‘ – dies nicht bewirkten. Genetische Insulatoren sollen die Wechselwirkungen viraler und zellulärer Elemente minimieren und so die Aktivierung zellulärer Gene sowie die Stilllegung des Transgens verhindern. Einzig mit dem ‚4xCTF‘-Insulator erfolgte eine konstante Expression des Transgens, während diese mit den anderen Vektoren kontinuierlich abnahm (**Abbildung 3.38D**). Diese Daten zeigen, dass eine effektive Abschirmung viral-zellulärer Wechselwirkungen erfolgte, die eine Verschiebung des Integrationsprofils durch Promotor-vermittelte klonale Selektion verhinderte. Die Auswirkung des ‚4xCTF‘-Insulators wurde bei dessen Kombination mit einer modifizierten Integrase deutlich. Die H3 Integrase lenkt die Integration eines nicht-insulierten Vektors effektiv in nicht-kodierende Bereiche. In Verbindung mit einem 4xCTF-insulierten Vektor scheinen dagegen entscheidende Interaktionen verhindert zu werden, so dass keine gezielte Integration in heterochromatische Bereiche mehr stattfinden kann (**Abbildung 3.39**). Die Aktivität von Insulatoren geht mit einer Verminderung der DNA Methylierung und Modifikation des Chromatins, einschließlich einer Hyperacetylierung von H3K9/K14, einher (Litt et al. 2001, Mutskov et al. 2002, Gaussin et al. 2012). Diese Modifikationen könnten die Bindung der H3 Integrase an das Chromatin stören und so deren Funktion beeinträchtigen.

#### 4.2.4 Art und Lage des Promotors sind entscheidend für die aberrante Genexpression

Bei der Integromanalyse der Vektoren LV.SF.LTR, SIN.LV.SF und SIN.LV.PGK wurden graduelle Unterschiede in deren genotoxischem Potential festgestellt (**Abschnitt 4.2.2**), welches auf der Vektor-assoziierten Deregulation der zellulären Genexpression beruht. Folglich stellte sich die Frage, ob die beobachteten Unterschiede auch auf funktioneller Ebene messbar sind. Zunächst wurde in frühen murinen Vorläuferzellen die Häufigkeit viral-zellulärer ‚Readthrough‘-Transkripte untersucht, wodurch gezeigt werden konnte, dass diese sich mit den verschiedenen Vektoren in Abhängigkeit der LTR-Konfiguration und des Promotors deutlich unterschied (**Abbildung 3.29**). Interessanterweise wies auch der vollständig LTR-getriebene LV.SF.LTR Vektor eine hohe Frequenz viral-zellulärer ‚Readthrough‘-Transkripte auf. Die Terminierung der viralen Transkription im 3'-LTR erfolgt in HIV-1 und HIV-1-abgeleiteten Vektoren mit vollständigem LTR mit hoher Effizienz, wohingegen lentivirale Vektoren mit SIN-LTRs dies nicht vermögen (Zaiss et al. 2002). Die unterschiedliche Aktivität des Polyadenylierungssignals im 5'- und 3'-LTR wird in HIV-1 durch verschiedene Mechanismen geregelt. Während das Signal im 5'-LTR durch Wechselwirkungen mit dem stromabwärts liegenden kanonischen Spleißdonor unterdrückt wird (Ashe et al. 1995), wird das Signal im 3'-LTR durch Sequenzen in der U3 Region verstärkt. Ein 77 - 94 bp stromaufwärts zur Polyadenylierungsstelle AAUAAA liegendes Signalelement (‚upstream signaling element‘, USE) bindet das multimere Protein CPSF (‚cleavage/polyadenylation specificity factor‘) und stabilisiert dadurch den Polyadenylierungskomplex mit der Poly(A) Polymerase (Gilmartin et al. 1995). Die weitere funktionelle Zerlegung der U3 Region zeigte, dass 70 - 80% der Terminierungssignale innerhalb von 124 Nukleotiden der transkriptionellen Kontrollregion gelegen sind, die mit NF $\kappa$ B, Sp1 und TATA Bindungsstellen überlappen (Yang et al. 2007). Die Wirksamkeit der Signale zur Prozessierung der mRNA am 3'-Ende wird durch die Deletion der U3 erheblich gestört, so dass es in SIN-Vektoren vermehrt zur ‚Readthrough‘-Transkription kommt. Die hohe Inzidenz von chimären ‚Readthrough‘-Transkripten mit dem LV.SF.LTR zeigt, dass der Ersatz der HIV-1 U3 durch einen SFFV Promotor im LTR nicht ausreichend ist, den Verlust der originalen Terminationssignale auszugleichen. Bei den SIN-Vektoren fand mit einem internen SFFV Promotor deutlich mehr viral-zelluläre ‚Readthrough‘-Transkription statt als mit einem PGK Promotor. Der SFFV Promotor hat in hämatopoetischen Zellen eine etwa 4 - 5fach erhöhte Aktivität gegenüber dem PGK Promotor (Flasshove et al. 2000). Die Frequenz der viral-zellulären ‚Readthrough‘-Transkription hängt somit direkt von der Aktivität des internen Promotors ab.

In frühen murinen Vorläuferzellen (*lin*-) befanden sich  $75,1 \pm 3,1\%$  der chimären ‚Readthrough‘-Transkripte in genkodierenden Bereichen, signifikant mehr als der Anteil der Integrate auf DNA-Ebene (**Abbildung 3.30**). Die genomischen Sequenzen und/oder die Struktur des Chromatins, die den integrierten Vektor flankieren, können die Expression des Vektors beeinflussen (sogenannter ‚chromosomal position effect‘, (Emery 2011)). Die offene Form des Chromatins und die erhöhte transkriptionelle Aktivität im Bereich aktiv transkribierter Gene kann daher zum vermehrten Auftreten von viral-zellulären ‚Readthrough‘-Transkripten beitragen. Eine weitere Möglichkeit ist der Mechanismus der unterschiedlichen Regulierung der identischen 5‘- und 3‘-LTRs. Das Polyadenylierungssignal im 5‘-LTR von HIV-1 wird durch den kanonischen Spleißdonor unterdrückt. Das Einfügen eines Introns stromabwärts des 3‘-LTRs führt zudem zur Abschwächung der dort lokalisierten Poly(A)Stelle (Ashe et al. 1995). Einer der ersten Schritte der Assemblierung des Spliceosoms ist die effiziente Bindung der snRNP U1 (‚small nuclear ribonucleoprotein U1‘) an den Spleißdonor (Jamison et al. 1992). Das U1A Protein, welches Teil der snRNP U1 ist, könnte die Polyadenylierung unterdrücken. Die Inhibierung der Poly(A)Polymerase durch freies U1A Protein wurde von einer Position stromaufwärts der Poly(A)Stelle bereits beobachtet (Boelens et al. 1993, Gunderson et al. 1994). Die Bindung des snRNP Komplexes könnte die Termination der Transkription aber auch aufgrund des sterischen Effekts verhindern, worauf die vermehrte Detektion (>80%) von viral-zellulären ‚Readthrough‘-Transkripten hinweist, bei denen die Entfernung zum nächsten zellulären Spleißdonor weniger als 30 kb beträgt. Die Bildung chimärer Ghr-Fusionstranskripten in transformierten 32D Zellklonen ausschließlich aus Integraten, die innerhalb von ca. 25 kb stromaufwärts des Exons 2 von *Ghr* liegen (**Abbildung 3.34**), bekräftigt diese Hypothese. Die detektierten chimären ‚Readthrough‘-Transkripte werden aber nicht nur im Vektor sondern auch in zellulären Genen initiiert, worauf die signifikant erhöhte Frequenz von SIN.LV.PGK-Transkripten in Exon-Sequenzen hindeutet (**Abbildung 3.30**). Erfolgt die Expression des Transgens von einem Promotor mit schwacher Aktivität – wie dem PGK Promotor – nimmt neben der Zahl der regulären Transkripte auch der Anteil der Vektor-initiierten viral-zellulären ‚Readthrough‘-Transkripte ab. Dadurch werden chimäre Transkripte, die durch ‚Readthrough‘-Transkription zellulärer Gene zustande kommen, häufiger detektiert. Integrierte Vektoren in Intron-Sequenzen werden in zellulär-initiierten ‚Readthrough‘-Transkripten größtenteils durch reguläres Spleißen des zellulären Gens entfernt, während provirale Formen in Exon-Sequenzen erhalten bleiben, was deren vermehrte Detektion zur Folge hat. Der Einfluss zellulärer ‚Readthrough‘-Transkription könnte auch bei der Analyse der funktionellen Genklassen chimärer Transkripte zur Geltung kommen. Mit den SFFV-Vektoren sind diejenigen funktionellen Genklassen überrepräsentiert, die durch die Integrationspräferenz der Vektoren häufiger getroffen werden (**Abbildung 3.26 und 3.31**). Dagegen werden mit dem PGK-Vektor davon abweichende Genklassen gefunden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass dies ein Resultat der zellulären Genexpression darstellen könnte.

Transkripte, die im Vektor initiiert werden, können durch die Fusion viraler Spleißdonoren mit Spleißakzeptoren zellulärer Gen-Exons oder kryptischer Spleißakzeptoren verkürzte Transkripte des Gens generieren, die die reguläre Genexpression stören können. Die Untersuchung aberrant gespleißter mRNAs in ‚Lineage‘-negativen und IL-3-abhängigen murinen Zellen erbrachte Fusionen lentiviraler kanonischer und kryptischer Spleißdonoren mit Exons bekannter Gene sowie mit neuen nicht annotierten Transkripten, die mit Exon-ähnlichen, nicht zusammenhängenden genomischen Sequenzen übereinstimmten (**Abbildung 3.36**). Letzteres deutet auf die Bildung neuer Transkripte durch die Integration lentiviraler Vektoren hin, die potentiell wachstumsförderende Funktionen besitzen könnten. In primären Zellen wurden nur wenige chimäre Fusionen beobachtet, die ausschließlich unter Beteiligung des kanonischen viralen Spleißdonors gebildet wurden. Währenddessen gingen in transformierten Klonen der 32D-Zelllinie aus bis zu 60% der Integrate viral-zelluläre Fusionstranskripte hervor, bei denen auch verschiedene kryptische Spleißstellen benutzt wurden. Kürzlich wurde gezeigt, dass sowohl die Frequenz aberrant gespleißter Transkripte als auch die Nutzung unterschiedlicher Spleißstellen stark mit der Zelllinie variiert (Moiani et al. 2012). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Untersuchung aberranter Spleißprozesse, die ein gentherapeutischer Vektor auslöst, möglichst auch in den entsprechenden zu behandelnden Zelltypen durchgeführt werden sollte. Die Identifikation kryptischer Spleißstellen im Vektorkonstrukt ermöglicht eine Rekodierung der entsprechenden Sequenzen, wodurch das Risiko aberranter Transkripte deutlich verringert werden kann (Cesana et al. 2012). Der kanonische Spleißdonor kann hingegen nicht rekodiert werden, da dieser eine wichtige Rolle bei der Regulation des 5'-LTRs einnimmt und die Mutation dieser Sequenz daher zu einem drastischen Abfall der Virustiter und viralen Genexpression führt (Furger et al. 2001).

Die Anhäufung aberranter Transkripte wird in der Zelle unter anderem durch den Abbau über den ‚Nonsense-mediated mRNA Decay‘ (NMD) verhindert (Moiani et al. 2012). Tatsächlich wurden trotz der hohen Frequenz von ‚Readthrough‘-Transkripten in den murinen Stamm- und Vorläuferzellen kaum durch aberrantes Spleißen entstandene chimäre Fusionstranskripte detektiert (**Abbildung 3.32**).

Bei den untersuchten SIN-Vektoren wurde festgestellt, dass sich die Aktivität des internen Promotors entscheidend auf die Häufigkeit von ‚Readthrough‘- und Fusionstranskripten auswirkt. Die höhere Aktivität des SFFV Promotors gegenüber dem PGK Promotor hat eine generell höhere Transkriptionsrate zur Folge. Mit steigender Menge an zu prozessierenden Transkripten steigt prinzipiell auch die Möglichkeit einer fehlerhaften Prozessierung der mRNA, wodurch die deutlich höhere Frequenz an aberranten Transkripten erklärt werden kann. Bei der Bildung viral-zellulärer Transkripte unter Verwendung stromaufwärts des internen Promotors gelegener Spleißstellen muss jedoch noch ein weiterer Faktor dazu beitragen, dass mit dem

Vektor SIN.LV.SF mehr Fusionstranskripte detektiert werden als mit SIN.LV.PGK. Untersuchungen in Bcl-15 Einzelzellklonen zeigten, dass intern gelegene SFFV Verstärker-/Promotorsequenzen in lentiviralen Vektoren die Expression von einem intakten 5'-LTR erhöhen und dadurch zur vermehrten Transformation dieser Zellen führen (Knight et al. 2010). In SIN-Vektoren sind die Promotorsequenzen aus den LTRs deletiert, dennoch besitzen SIN-lentivirale Vektoren in der Nähe des 5'-LTRs eine verbleibende Promotoraktivität, die für die Produktion von Vektortranskripten voller Länge verantwortlich sind (Logan et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass auch die Restaktivität des 5'-SIN-LTRs durch die Aktivität des internen Promotors beeinflusst wird (**Abbildung 3.33**).

Die Bestimmung des genotoxischen Potentials der in dieser Arbeit untersuchten lentiviralen Vektoren bestätigte die Bedeutung des internen Promotors und dessen Auswirkung auf die Genotoxizität (**Abbildung 3.34A**), welche bei lentiviralen Vektoren maßgeblich von der Bildung viral-zellulärer Transkripte abhängt (Bokhoven et al. 2009). Die Analyse transformierter 32D-Einzelzellklone zeigte, dass LV.SF.LTR-Integrate zu 60%, SIN.LV.SF-Integrate zu 25% und SIN.LV.PGK-Integrate nur zu 3% in Fusionstranskripten resultierten. Das Risiko zur Entstehung von Fusionstranskripten zeigte sich neben der LTR-Konfiguration und dem Promotor auch von der Lokalisation des Provirus innerhalb des Gens abhängig (**Abbildung 3.34B**). So führten Integrate im Gen *Ghr* nur zu Fusionstranskripten, wenn diese innerhalb von 25 kb stromaufwärts von Exon 2 lokalisiert waren. Dies deutet darauf hin, dass zum effektiven Spleißen weitere räumliche Bedingungen, wie z.B. der Abstand zwischen Spleißdonor, Spleißakzeptor und dem sogenannten ‚branch point adenosine‘, erfüllt sein müssen.

Unsere Daten demonstrieren, dass die Häufigkeit chimärer Transkripte durch das Vektordesign, insbesondere LTR-Konfiguration und Promotor, entscheidend beeinflusst wird. Durch SIN-LTRs erhöht sich die Frequenz der ‚Readthrough‘-Transkription in lentiviralen Vektoren beträchtlich, jedoch resultiert vor allem in SIN-Vektoren nur ein geringer Teil in stabilen Fusionstranskripten, die potentiell für aberrante Proteine kodieren könnten. Auch fehlerhafte Proteine werden durch verschiedene Schutzmechanismen des Organismus degradiert, wie z.B. das Ubiquitin-Proteasom-System (Reinstein et al. 2006), so dass meist mehrere Defekte für die maligne Entartung einer Zelle notwendig sind (Weinberg, 2006).

Zusätzliche Vektorelemente dienen dazu, die Sicherheit und/oder Wirksamkeit gentherapeutischer Vektoren zu erhöhen. Montiel-Equihua et al. konstruierten einen lentiviralen Vektor, der die Korrektur von Krankheiten ermöglichen soll, die eine hohe Genexpression in verschiedenen Zelllinien erfordern. Dies wurde durch den konstitutiv aktiven Promotor EFS in Kombination mit der Kontrollregion des  $\beta$ -Globin-Lokus ( $\beta$ -LCR) zur effektiven systemischen Therapie erreicht (Montiel-Equihua et al. 2012). Genexpressionsanalysen dieses Vektors mit zusätzlichem  $\beta$ -LCR Element zeigten in murinen Erythroleukämie-Zellklonen bei 9% der

zellulären Gene innerhalb von  $\pm 100$  kb eine Hochregulation um mehr als 50% (Kooperation A. Thrasher, London, UK). Dieser Effekt des  $\beta$ -LCR Elements ist auf eine maximale Distanz von 150 kb beschränkt und somit geringer als die Wirkung von Vektoren mit vollständigen LTRs (Kustikova et al. 2005). Bei zwei unabhängigen *in vitro* Mutagenesetests konnte zudem kein erhöhtes Transformationspotential des Vektors festgestellt werden (Montiel-Equihua et al. 2012).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass SIN-retrovirale Vektoren (gammaretro- und lentiviral) die effiziente und sichere Gentherapie der X-CGD ermöglichen. Diverse Sicherheitselemente wie Promotoren, SIN-LTRs und Insulatoren beeinflussen das Integrationsprofil gammaretro- und lentiviraler Vektoren sowohl während der Integration als auch durch nachfolgende klonale Selektion. Es wurde gezeigt, dass Art und Lage des Promotors einen bedeutenden Einfluss auf die aberrante Genexpression haben. Die Quantifizierung der Genotoxizität aufgrund des Integrations- und Expressionsverhaltens neuer integrierender Vektorsysteme durch funktionelle Integromanalysen erleichtert somit die Konstruktion neuer gentherapeutischer Vektoren, deren Evaluation und Translation in die Klinik.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Aiuti, A., et al. (2012). "Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 2." Curr Opin Immunol **24**(5): 585-591.
- Aiuti, A., et al. (2009). "Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency." N Engl J Med **360**(5): 447-458.
- Aiuti, A., et al. (2002). "Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning." Science **296**(5577): 2410-2413.
- Almarza, D., et al. (2011). "Risk assessment in skin gene therapy: viral-cellular fusion transcripts generated by proviral transcriptional read-through in keratinocytes transduced with self-inactivating lentiviral vectors." Gene Ther **18**(7): 674-681.
- Almarza, E., et al. (2007). "Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the vav proto-oncogene: a weak and efficient promoter for gene therapy." Mol Ther **15**(8): 1487-1494.
- Anderson, W. F. (1984). "Prospects for human gene therapy." Science **226**(4673): 401-409.
- Ansorge, W. J. (2009). "Next-generation DNA sequencing techniques." N Biotechnol **25**(4): 195-203.
- Arens, A., et al. (2012). "Bioinformatical Clonality Analysis of Next Generation Sequencing Derived Viral Vector Integration Sites." Hum Gene Ther Methods.
- Ashe, M. P., et al. (1995). "Poly(A) site selection in the HIV-1 provirus: inhibition of promoter-proximal polyadenylation by the downstream major splice donor site." Genes Dev **9**(23): 3008-3025.
- Bach, C., et al. (2010). "Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes." Blood **115**(14): 2910-2918.
- Baum, C., et al. (2003). "Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells." Blood **101**(6): 2099-2114.
- Beard, B. C., et al. (2010). "Efficient and stable MGMT-mediated selection of long-term repopulating stem cells in nonhuman primates." J Clin Invest **120**(7): 2345-2354.
- Bianchi, M., et al. (2009). "Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis." Blood **114**(13): 2619-2622.
- Boch, J. (2011). "TALEs of genome targeting." Nat Biotechnol **29**(2): 135-136.
- Boelens, W. C., et al. (1993). "The human U1 snRNP-specific U1A protein inhibits polyadenylation of its own pre-mRNA." Cell **72**(6): 881-892.
- Bokhoven, M., et al. (2009). "Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors." J Virol **83**(1): 283-294.
- Boztug, K., et al. (2010). "Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome." N Engl J Med **363**(20): 1918-1927.
- Brenner, S., et al. (2006). "Polyclonal long-term MFGS-gp91phox marking in rhesus macaques after nonmyeloablative transplantation with transduced autologous peripheral blood progenitor cells." Mol Ther **14**(2): 202-211.
- Brinkmann, V., et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.
- Brown, J. R., et al. (2003). "Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease (CGD)." J Leukoc Biol **73**(5): 591-599.
- Bu-Ghanim, H. N., et al. (1995). "Molecular analysis in three cases of X91- variant

- chronic granulomatous disease." Blood **86**(9): 3575-3582.
- Bunnell, B. A., et al. (1998). "Gene therapy for infectious diseases." Clin Microbiol Rev **11**(1): 42-56.
- Buonamici, S., et al. (2004). "EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice." J Clin Invest **114**(5): 713-719.
- Calmels, B., et al. (2005). "Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells." Blood **106**(7): 2530-2533.
- Carmo, M., et al. (2006). "Relationship between retroviral vector membrane and vector stability." J Gen Virol **87**(Pt 5): 1349-1356.
- Cartier, N., et al. (2009). "Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy." Science **326**(5954): 818-823.
- Cattoglio, C., et al. (2010). "High-definition mapping of retroviral integration sites defines the fate of allogeneic T cells after donor lymphocyte infusion." PLoS One **5**(12): e15688.
- Cavazzana-Calvo, M., et al. (2012). "Gene therapy for primary immunodeficiencies: part 1." Curr Opin Immunol **24**(5): 580-584.
- Cavazzana-Calvo, M., et al. (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." Science **288**(5466): 669-672.
- Cavazzana-Calvo, M., et al. (2010). "Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia." Nature **467**(7313): 318-322.
- Cesana, D., et al. (2012). "Whole transcriptome characterization of aberrant splicing events induced by lentiviral vector integrations." J Clin Invest **122**(5): 1667-1676.
- Charrier, S., et al. (2007). "Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients." Gene Ther **14**(5): 415-428.
- Check, E. (2002). "Gene therapy: shining hopes dented - but not dashed." Nature **420**(6917): 735.
- Check, E. (2002). "A tragic setback." Nature **420**(6912): 116-118.
- Check, E. (2005). "Gene therapy put on hold as third child develops cancer." Nature **433**(7026): 561.
- Christian, M., et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." Genetics **186**(2): 757-761.
- Chung, J. H., et al. (1997). "Characterization of the chicken beta-globin insulator." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 575-580.
- Ciuffi, A., et al. (2005). "A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration." Nat Med **11**(12): 1287-1289.
- Cornetta, K., et al. (1991). "Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans." Hum Gene Ther **2**(1): 5-14.
- Corrigan-Curay, J., et al. (2012). "Challenges in vector and trial design using retroviral vectors for long-term gene correction in hematopoietic stem cell gene therapy." Mol Ther **20**(6): 1084-1094.
- Danos, O., et al. (1988). "Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6460-6464.
- Defendi, F., et al. (2009). "A novel point mutation in the CYBB gene promoter leading to a rare X minus chronic granulomatous disease variant--impact on the microbicidal activity of neutrophils." Biochim Biophys Acta **1792**(3): 201-210.
- Deichmann, A., et al. (2011). "Insertion sites in engrafted cells cluster within a limited repertoire of genomic areas after gammaretroviral vector gene therapy." Mol Ther **19**(11): 2031-2039.
- Deichmann, A., et al. (2007). "Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in

- SCID-X1 gene therapy." *J Clin Invest* **117**(8): 2225-2232.
- Dexter, T. M. (1984). "Blood cell development. The message in the medium." *Nature* **309**(5971): 746-747.
- Dexter, T. M., et al. (1987). "Growth and differentiation in the hemopoietic system." *Annu Rev Cell Biol* **3**: 423-441.
- Dickson, G. J., et al. (2009). "Hoxa6 potentiates short-term hemopoietic cell proliferation and extended self-renewal." *Exp Hematol* **37**(3): 322-333 e323.
- Du, Y., et al. (2005). "Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary bone marrow progenitor cells." *Blood* **106**(12): 3932-3939.
- Emery, D. W. (2011). "The use of chromatin insulators to improve the expression and safety of integrating gene transfer vectors." *Hum Gene Ther* **22**(6): 761-774.
- Esnault, G., et al. (2009). "Transcription factor CTF1 acts as a chromatin domain boundary that shields human telomeric genes from silencing." *Mol Cell Biol* **29**(9): 2409-2418.
- Felice, B., et al. (2009). "Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome." *PLoS One* **4**(2): e4571.
- Finer, M. H., et al. (1994). "kat: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes." *Blood* **83**(1): 43-50.
- Fischer, A., et al. (2008). "Gene therapy of inherited diseases." *Lancet* **371**(9629): 2044-2047.
- Flasshove, M., et al. (2000). "Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene." *J Cancer Res Clin Oncol* **126**(7): 391-399.
- Follenzi, A., et al. (2000). "Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences." *Nat Genet* **25**(2): 217-222.
- Friedmann, T. (1992). "A brief history of gene therapy." *Nat Genet* **2**(2): 93-98.
- Fuchs, M. (2006). "Gene therapy. An ethical profile of a new medical territory." *J Gene Med* **8**(11): 1358-1362.
- Furger, A., et al. (2001). "The retroviruses human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus adopt radically different strategies to regulate promoter-proximal polyadenylation." *J Virol* **75**(23): 11735-11746.
- Gabriel, R., et al. (2009). "Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy." *Nat Med* **15**(12): 1431-1436.
- Gabriel, R., et al. (2011). "An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity." *Nat Biotechnol* **29**(9): 816-823.
- Gaspar, H. B., 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**(4): 505-513.
- Gaspar, H. B., et al. (2011). "Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction." *Sci Transl Med* **3**(97): 97ra80.
- Gaspar, H. B., et al. (2004). "Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector." *Lancet* **364**(9452): 2181-2187.
- Gaussin, A., et al. (2012). "CTF/NF1 transcription factors act as potent genetic insulators for integrating gene transfer vectors." *Gene Ther* **19**(1): 15-24.
- Gilmartin, G. M., et al. (1995). "CPSF recognition of an HIV-1 mRNA 3'-processing enhancer: multiple sequence contacts involved in poly(A) site definition." *Genes Dev* **9**(1): 72-83.
- Goebel, W. S., et al. (2003). "Gene therapy for chronic granulomatous disease." *Acta Haematol* **110**(2-3): 86-92.

- Grez, M., et al. (2011). "Gene therapy of chronic granulomatous disease: the engraftment dilemma." *Mol Ther* **19**(1): 28-35.
- Gunderson, S. I., et al. (1994). "The human U1A snRNP protein regulates polyadenylation via a direct interaction with poly(A) polymerase." *Cell* **76**(3): 531-541.
- Gutierrez, A. A., et al. (1992). "Gene therapy for cancer." *Lancet* **339**(8795): 715-721.
- Hacein-Bey-Abina, S., et al. (2008). "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." *J Clin Invest* **118**(9): 3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina, S., et al. (2010). "Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." *N Engl J Med* **363**(4): 355-364.
- Hacein-Bey-Abina, 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.
- Hacein-Bey-Abina, S., et al. (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." *N Engl J Med* **348**(3): 255-256.
- Hacein-Bey-Abina, S., et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* **302**(5644): 415-419.
- Heckl, D., et al. (2012). "Lentiviral vector induced insertional haploinsufficiency of Ebf1 causes murine leukemia." *Mol Ther* **20**(6): 1187-1195.
- Herbst, F., et al. (2012). "Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo." *Mol Ther* **20**(5): 1014-1021.
- Holland, S. M. (2010). "Chronic granulomatous disease." *Clin Rev Allergy Immunol* **38**(1): 3-10.
- Howe, S. J., et al. (2008). "Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients." *J Clin Invest* **118**(9): 3143-3150.
- Huhn, R. D., et al. (1999). "Retroviral marking and transplantation of rhesus hematopoietic cells by nonmyeloablative conditioning." *Hum Gene Ther* **10**(11): 1783-1790.
- International Human Genome Sequencing, C. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature* **431**(7011): 931-945.
- Jamison, S. F., et al. (1992). "The spliceosome assembly pathway in mammalian extracts." *Mol Cell Biol* **12**(10): 4279-4287.
- Kahl, C. A., et al. (2006). "Effects of busulfan dose escalation on engraftment of infant rhesus monkey hematopoietic stem cells after gene marking by a lentiviral vector." *Exp Hematol* **34**(3): 369-381.
- Kalpana, G. V., et al. (1994). "Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5." *Science* **266**(5193): 2002-2006.
- Kang, E. M., et al. (2010). "Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils." *Blood* **115**(4): 783-791.
- Kang, E. M., et al. (2006). "Busulfan pharmacokinetics, toxicity, and low-dose conditioning for autologous transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells in the rhesus macaque model." *Exp Hematol* **34**(2): 132-139.
- Kang, H. J., et al. (2011). "Retroviral Gene Therapy for X-linked Chronic Granulomatous Disease: Results From Phase I/II Trial." *Mol Ther* **19**(11): 2092-2101.
- Kaufmann, K. B., et al. (2012). "Alpharetroviral Vector-mediated Gene Therapy for X-CGD: Functional Correction and Lack of Aberrant Splicing." *Mol Ther*.

- Kay, M. A., et al. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med **7**(1): 33-40.
- Khanna-Gupta, A. (2008). "Sumoylation and the function of CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha)." Blood Cells Mol Dis **41**(1): 77-81.
- Knight, S., et al. (2010). "Effect of the internal promoter on insertional gene activation by lentiviral vectors with an intact HIV long terminal repeat." J Virol **84**(9): 4856-4859.
- Knight, S., et al. (2012). "Safer, silencing-resistant lentiviral vectors: optimization of the ubiquitous chromatin-opening element through elimination of aberrant splicing." J Virol **86**(17): 9088-9095.
- Kondo, M., et al. (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell **91**(5): 661-672.
- Kootstra, N. A., et al. (2003). "Gene therapy with viral vectors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 413-439.
- Kustikova, O., et al. (2005). "Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking." Science **308**(5725): 1171-1174.
- Lander, E. S., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Lensch, M. W., et al. (2004). "Origins of mammalian hematopoiesis: in vivo paradigms and in vitro models." Curr Top Dev Biol **60**: 127-196.
- Li, C. L., et al. (2009). "Genomic and functional assays demonstrate reduced gammaretroviral vector genotoxicity associated with use of the cHS4 chromatin insulator." Mol Ther **17**(4): 716-724.
- Li, T., et al. (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." Nucleic Acids Res **39**(1): 359-372.
- Li, Z., et al. (2002). "Murine leukemia induced by retroviral gene marking." Science **296**(5567): 497.
- Litt, M. D., et al. (2001). "Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus." Science **293**(5539): 2453-2455.
- Llano, M., et al. (2004). "LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes." J Virol **78**(17): 9524-9537.
- Logan, A. C., et al. (2004). "Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration." J Virol **78**(16): 8421-8436.
- Lombardo, A., et al. (2011). "Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer." Nat Methods **8**(10): 861-869.
- Lupo-Stanghellini, M. T., et al. (2010). "Clinical impact of suicide gene therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Hum Gene Ther **21**(3): 241-250.
- Maetzig, T., et al. (2011). "Gammaretroviral vectors: biology, technology and application." Viruses **3**(6): 677-713.
- Malech, H. L. (1999). "Progress in gene therapy for chronic granulomatous disease." J Infect Dis **179** Suppl 2: S318-325.
- Maruggi, G., et al. (2009). "Transcriptional enhancers induce insertional gene deregulation independently from the vector type and design." Mol Ther **17**(5): 851-856.
- Metcalf, D. (1985). "The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors." Science **229**(4708): 16-22.
- Miller, A. D., et al. (1989). "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression." Biotechniques **7**(9): 980-982, 984-986, 989-990.

- Mitchell, R. S., et al. (2004). "Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences." *PLoS Biol* **2**(8): E234.
- Modlich, U., et al. (2006). "Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity." *Blood* **108**(8): 2545-2553.
- Modlich, U., et al. (2009). "Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors." *Mol Ther* **17**(11): 1919-1928.
- Modlich, U., et al. (2008). "Leukemia induction after a single retroviral vector insertion in Evi1 or Prdm16." *Leukemia* **22**(8): 1519-1528.
- Moiiani, A., et al. (2012). "Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts." *J Clin Invest* **122**(5): 1653-1666.
- Montiel-Equihua, C. A., et al. (2012). "The beta-globin locus control region in combination with the EF1alpha short promoter allows enhanced lentiviral vector-mediated erythroid gene expression with conserved multilineage activity." *Mol Ther* **20**(7): 1400-1409.
- Montini, E., et al. (2009). "The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy." *J Clin Invest* **119**(4): 964-975.
- Montini, E., et al. (2006). "Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration." *Nat Biotechnol* **24**(6): 687-696.
- Moolten, F. L., et al. (1992). "A model for predicting the risk of cancer consequent to retroviral gene therapy." *Hum Gene Ther* **3**(5): 479-486.
- Mueller, P. R., et al. (1989). "In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR." *Science* **246**(4931): 780-786.
- Müller-Kuller, U. (2012). „Development of safety improved lentiviral vectors containing ubiquitous chromatin opening elements.” ESGCT Conference Book.
- Mulder, L. C., et al. (2002). "Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18." *J Biol Chem* **277**(30): 27489-27493.
- Mutskov, V. J., et al. (2002). "The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation." *Genes Dev* **16**(12): 1540-1554.
- Nakamura, M., et al. (1987). "Monoclonal antibody 7D5 raised to cytochrome b558 of human neutrophils: immunocytochemical detection of the antigen in peripheral phagocytes of normal subjects, patients with chronic granulomatous disease, and their carrier mothers." *Blood* **69**(5): 1404-1408.
- Naldini, L., et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." *Science* **272**(5259): 263-267.
- Ott, M. G., et al. (2006). "Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1." *Nat Med* **12**(4): 401-409.
- Paruzynski, A., et al. (2010). "Genome-wide high-throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing." *Nat Protoc* **5**(8): 1379-1395.
- Peng, Z. (2005). "Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers." *Hum Gene Ther* **16**(9): 1016-1027.
- Perelson, A. S., et al. (1996). "HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time." *Science* **271**(5255): 1582-1586.
- Persons, D. A., et al. (2011). "Solving the problem of gamma-retroviral vectors containing long terminal repeats." *Mol Ther* **19**(2): 229-231.

- Pollock, J. D., et al. (1995). "Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production." Nat Genet **9**(2): 202-209.
- Qu, Y., et al. (2011). "Thioredoxin-like 2 regulates human cancer cell growth and metastasis via redox homeostasis and NF-kappaB signaling." J Clin Invest **121**(1): 212-225.
- Reichenbach, J. (2012). „Gamma-retroviral gene therapy for X-CGD: Differential outcome of single MDS1-Evi1 integration vs double MDS1-Evi1/STAT3 integration.” ESGCT Conference Book.
- Reya, T., et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Roos, D. (1994). "The genetic basis of chronic granulomatous disease." Immunol Rev **138**: 121-157.
- Rosenberg, S. A., 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**(9): 570-578.
- Rosenzweig, M., et al. (1999). "Efficient and durable gene marking of hematopoietic progenitor cells in nonhuman primates after nonablative conditioning." Blood **94**(7): 2271-2286.
- Rosenzweig, S. D. (2008). "Inflammatory manifestations in chronic granulomatous disease (CGD)." J Clin Immunol **28 Suppl 1**: S67-72.
- Santilli, G., et al. (2011). "Biochemical correction of X-CGD by a novel chimeric promoter regulating high levels of transgene expression in myeloid cells." Mol Ther **19**(1): 122-132.
- Schmidt, M., et al. (2003). "Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates." Nat Med **9**(4): 463-468.
- Schmidt, M., et al. (2007). "High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR)." Nat Methods **4**(12): 1051-1057.
- Schroder, A. R., et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." Cell **110**(4): 521-529.
- Schwäble, J., et al. (2011). "Gentherapie der septischen Granulomatose: Chancen und Risiken. Der Weg zur erfolgreichen Therapie einer angeborenen Immundefizienz." Pharm Unserer Zeit **40**(3): 264-271.
- Schwarzwaelder, K., et al. (2007). "Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo." J Clin Invest **117**(8): 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, B. H., et al. (2000). "Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease." Medicine (Baltimore) **79**(3): 170-200.
- Seger, R. A. (2008). "Modern management of chronic granulomatous disease." Br J Haematol **140**(3): 255-266.
- Seger, R. A., et al. (2002). "Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000." Blood **100**(13): 4344-4350.
- Seth, P. (2005). "Vector-mediated cancer gene therapy: an overview." Cancer Biol Ther **4**(5): 512-517.
- Shannon, C. E., et al. (1949). The mathematical theory of communication. Urbana, University of Illinois Press.
- Sherr, C. J. (2004). "Principles of tumor suppression." Cell **116**(2): 235-246.
- Silver, J., et al. (1989). "Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus." J Virol **63**(5): 1924-1928.

- Simpson, E. H. (1949). "Measurement of Diversity." Nature **163**(4148): 688-688.
- Skalnik, D. G., et al. (1991). "Targeting of transgene expression to monocyte/macrophages by the gp91-phox promoter and consequent histiocytic malignancies." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8505-8509.
- Stein, S., 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., et al. (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.
- Suerth, J. D., et al. (2012). "Alpharetroviral self-inactivating vectors: long-term transgene expression in murine hematopoietic cells and low genotoxicity." Mol Ther **20**(5): 1022-1032.
- van den Berg, J. M., et al. (2009). "Chronic granulomatous disease: the European experience." PLoS One **4**(4): e5234.
- Violot, S., et al. (2003). "The human polycomb group EED protein interacts with the integrase of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **77**(23): 12507-12522.
- von Kalle, C., et al. (1994). "Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector." Blood **84**(9): 2890-2897.
- Wang, G. P., et al. (2007). "HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications." Genome Res **17**(8): 1186-1194.
- Waterston, R. H., et al. (2002). "On the sequencing of the human genome." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3712-3716.
- Winkelstein, J. A., et al. (2000). "Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients." Medicine (Baltimore) **79**(3): 155-169.
- Woodman, R. C., et al. (1995). "A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells." Blood **85**(1): 231-241.
- Wu, C., et al. (2011). "Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity." Front Med **5**(4): 356-371.
- Wu, X., et al. (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science **300**(5626): 1749-1751.
- Yang, Q., et al. (2007). "Overlapping enhancer/promoter and transcriptional termination signals in the lentiviral long terminal repeat." Retrovirology **4**: 4.
- Zaiss, A. K., et al. (2002). "RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy." J Virol **76**(14): 7209-7219.
- Zhang, F., et al. (2010). "A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors." Mol Ther **18**(9): 1640-1649.
- Zhang, F., et al. (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.
- Zufferey, R., et al. (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." J Virol **72**(12): 9873-9880.
- Zychlinski, D., et al. (2008). "Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors." Mol Ther **16**(4): 718-725.

## 6 PUBLIKATIONEN, AUSZEICHNUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE

### 6.1 Publikationen

#### 6.1.1 Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit

Claudia A Montiel-Equihua, Lin Zhang, Sean Knight, Heba Saadeh, **Simone Scholz**, Marlene Carmo, Maria E Alonso-Ferrero, Michael P Blundell, Aiste Monkeviciute, Reiner Schulz, Mary Collins, Yasuhiro Takeuchi, Manfred Schmidt, Lynette Fairbanks, Michael Antoniou, Adrian J Thrasher and H. Bobby Gaspar.

“The  $\beta$ -Globin Locus Control Region in Combination With the EF1 $\alpha$  Short Promoter Allows Enhanced Lentiviral Vector-mediated Erythroid Gene Expression With Conserved Multilineage Activity”

*Molecular Therapy* **2012** Jul;20(7):1400-9

Anna Paruzynski, Anne Arens, Richard Gabriel, Cynthia C Bartholomae, **Simone Scholz**, Wie Wang, Stephan Wolf, Hanno Glimm, Manfred Schmidt, Christof von Kalle.

„Genome-wide high-throughput integrase analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing”

*Nature Protocols* **2010** Aug;5(8):1379-95

#### 6.1.2 Eingereichte Publikationen

Stefan Stein, **Simone Scholz (Co-Erstautor)**, Joachim Schwäble, Mohammed A Sadat, Ute Modlich, Stephan Schultze-Strasser, Margarita Diaz, Linping Chen-Wichmann, Uta Müller-Kuller, Christian Brendel, Raffaele Fronza, Kerstin B Kaufmann, Sonja Naundorf, Nancy K Pech, Jeffrey B. Travers, Juan D Matute, Robert G Presson, Jr, George E. Sandusky, Hana Kunkel, Eva Rudolf, Adelina Dillmann, Christof von Kalle, Klaus Köhlcke, Christopher Baum, Axel Schambach, Mary C. Dinauer, Manfred Schmid und Manuel Grez.

“From Bench to Bedside: Preclinical Evaluation of a SIN gammaretroviral vector for the Gene Therapy of X-linked Chronic Granulomatous Disease”.

*Eingereicht bei Human Gene Therapy Clinical Trials.*

Alexandre Artus, Caroline Duros, **Simone Scholz**, Isabelle Ragon, Daniela Cesana, Anna Paruzynski, Eugenio Montini, David Klatzmann, Christof von Kalle, Manfred Schmidt und Odile Cohen-Haguenauer.

„A novel genetic insulator based on the CTF/NF1 motif confers superior stability and safety in vitro and in vivo”.

*Eingereicht bei EMBO Molecular Medicine.*

### 6.1.3 Publikationen aus vorangegangener Tätigkeit

Zlatka Kostova, Jennifer Mariano, **Simone Scholz**, Caroline Koenig, Allan M Weissman.

„A Ubc7p-binding domain in Cue1p activates ER-associated protein degradation”

*Journal of Cell Science* **2009** May 1;122(Pt 9):1374-81

## 6.2 Auszeichnungen

März 2010                      Poster Award  
*Clinigene European Network of Excellence (Clinigene - NoE)*

März 2012                      Reisestipendium  
*Deutsche Gesellschaft für Gentherapie (DGGT)*

## 6.3 Kongressbeiträge (eigene Beiträge)

### 6.3.1 Vorträge

**Simone Scholz**, Anna Paruzynski, Cynthia C. Bartholomä, Ina Kutschera, Caroline Duros, Alexandre Artus, Eugenio Montini, Luigi Naldini, Adrian Thrasher, Steven J. Howe, Christof von Kalle, Odile Cohen-Haguenauer und Manfred Schmidt.

“Comprehensive Integration Site Analysis for Vector Biosafety Assessment”. 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis,

*Platform Meeting Clinigene European Network for the Advancement of Clinical Gene Transfer and Therapy*

*Lucca, Italien , 13.-17.09.2009*

**Simone Scholz**, Margarita Diaz, Stefan Stein, Axel Schambach, Hanno Glimm, Christof von Kalle, Manuel Grez und Manfred Schmidt<sup>1</sup>

„High Throughput Integration Site Analysis for Vector Biosafety Assessment in CGD Gene Therapy”.

*Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DG-GT)*

*München, Deutschland, 7.-9. Oktober 2010*

### 6.3.2 Posterpräsentationen

**Simone Scholz**, Alexandre Artus, Caroline Duros, Anna Paruzynski, Ina Kutschera, Christina Lulay, Cynthia Bartholomä, Christof von Kalle, Odile Cohen-Haguenauer und Manfred Schmidt.

“Functional Integration Site Analysis for Vector Biosafety Assessment”.

*Annual Meeting Clinigene - European Network for the Advancement of Clinical Gene Transfer and Therapy*

*Anney, Frankreich, 2.04.2009*

**Simone Scholz**, Alexandre Artus, Caroline Duros, Anna Paruzynski, Cynthia Bartholomä, Christof von Kalle, Odile Cohen-Haguenauer and Manfred Schmidt.

“Comprehensive Integration Site Analysis for Vector Biosafety Assessment”.

*Annual Meeting Clinigene - European Network for the Advancement of Clinical Gene Transfer and Therapy*

*Anney, Frankreich, 25.-28.03.2010*

**Simone Scholz**, Margarita Diaz, Stefan Stein, Axel Schambach, Hanno Glimm, Christof von Kalle, Manuel Grez und Manfred Schmidt.

“Integration Site Analysis and Deep Sequencing for Vector Biosafety Assessment in CGD Gene Therapy”.

*Annual Meeting European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT)*

*Milan, Italien, 22.-25.10.2010*

**Simone Scholz**, Alexandre Artus, Caroline Duros, Anna Paruzynski, Ina Kutschera, Christina Lulay, Christof von Kalle, Odile Cohen-Haguenauer und Manfred Schmidt.

“High Throughput Integration Site Distribution Profiling of Insulated and Targeted Vector Systems”.

*CliniGene - NoE Conference in Paris: Gene Transfer and Therapy: state of the art and eCHiPS*

*Paris, Frankreich, 7.-8.04.2011*

**Simone Scholz**, Margarita Diaz, Stefan Stein, Axel Schambach, Hanno Glimm, Christof von Kalle, Manuel Grez und Manfred Schmidt.

“Safety and Clonality Analyses for a New Vector for CGD Clinical Gene Therapy”.

*Annual Meeting American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT)*

*Seattle, USA, 18.-21.05.2011*

**Simone Scholz**, Margarita Diaz, Stefan Stein, Axel Schambach, Hanno Glimm, Christof von Kalle, Manuel Grez und Manfred Schmidt.

“High Throughput Integration Site Analysis Reveals an Improved Safety Profile of a SIN Gammaretroviral Vector for X-CGD Gene Therapy”.

*Annual Meeting European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT)*

*Brighton, England, 27.-31.10.2011*

**Simone Scholz**, Margarita Diaz, Stefan Stein, Axel Schambach, Hanno Glimm, Christof von Kalle, Manuel Grez und Manfred Schmidt.

“High Resolution Integrome Analyses Reveal an Improved Safety Profile of a SIN Gammaretroviral Vector for X-CGD Gene Therapy”.

*Annual PERSIST Meeting*

*Leukerbad, Schweiz, 11.-14.01.2012*

**Simone Scholz**, Giorgia Santilli, Christof von Kalle, Bobby Gaspar, Adrian Thrasher und Manfred Schmidt.

“High Throughput Integration Site Analysis of an X-CGD Patient Treated with a Lentiviral Vector”.

*Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DG-GT)*

*Frankfurt, Deutschland, 15.-17.03.2012*

**Simone Scholz**, Raffaele Fronza, Cynthia Bartholomä, Daniela Cesana, Eugenio Montini, Christof von Kalle und Manfred Schmidt.

“Nature and Strength of the Lentiviral Vector Promoter is Decisive for Aberrant Transcript Formation”.

*Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DG-GT)*

*Frankfurt, Deutschland, 27.02.-01.03.2013*

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

2D	2-dimensional (in 5'-und 3'-Richtung)
454	Pyrophosphatsequenziertechnologie
#	Anzahl
$\Delta$ U3/dU3	Deletierte U3-Region
$\beta$ -LCR	Lokuskontrollregion des $\beta$ -Globin Gens
$\gamma$	Gemeinsame gamma Kette („common gamma chain“)
$\mu$	Mikro-
$\psi$	Verpackungssignal (psi)
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ADA	Adenosin-Deaminase
ADA-SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt infolge eines ADA-Mangels („Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency“)
B-ALL	B-Zell akute lymphoblastische Leukämie
bp	Basenpaare
BLAT	„Blast Like Alignment Tool“
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BSA	Rinderalbumin („Bovine Serum Albumin“)
CD	„Cluster of Differentiation“
cDNA	Komplementäre DNA
CGD	Septische Granulomatose („Chronic Granulomatous Disease“)
CIS	Bevorzugter Integrationsort („Common Integration Site“)
cHS4	„chicken $\beta$ -globin locus control region HS4 element“
Chr	Chromosom
CLP	„common lymphoid progenitor“
CMP	„common myeloid progenitor“
CMV	Cytomegalovirus
CTCF	CCCTC-Bindungsfaktor
CTF	CAAT Box-bindender Transkriptionsfaktor
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)

dsDNA	Doppelsträngige DNA
EFS	‘elongation factor-1 short promoter’
eGFP	‘enhanced Green Fluorescent Protein’
ENV, env	Hüllproteine der Retroviren (‘Envelope’)
ERV	Endogener Retrovirus
FACS	‘Fluorescent Activated Cell Sorting’
FBS	Fötales Bovines Serum
FP	Fusionsprimer
Fr-MuLV	‘Friend Murine Leukemia Virus’
-g	-gramm
gag	Gruppenspezifisches Antigen
GALV	‘Gibbon-Ape Leukemia Virus’
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (‘Granulocyte-Colony Stimulating Factor’)
Gln	Glutamin
GMP	Granulozyten/Makrophagen Progenitorzellen
GvHD	‘Graft-versus-Host Disease’
h	Stunden
HBS	‘HEPES Buffered Saline’
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (‘High-performance liquid chromatography’)
HSC	Hämatopoetische Stammzellen (‘Hematopoietic Stem Cells’)
H SCT	Hämatopoetische Stammzell-Therapie (‘Hematopoietic Stem Cell Therapy’)
HSV	Herpes Simplex Viren
IK	Internes Vektorkontrollfragment
IL-3	Interleukin-3
IPA	‘Ingenuity Pathways Analysis’ Software
IS	Integrationsstelle
IVIM	‘In Vitro Immortalization Assay’
kb	Kilobasenpaare
-l	-liter
LAM-PCR	Lineare amplifikationsmedierte PCR
LM-PCR	Ligationsmedierte PCR
<i>lin</i> - Zellen	Frühe Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems der Maus

LK	Linkerkassette
LTR	„Long Terminal Repeat“
LV	Lentiviraler Vektor
-m	-meter
m-	Milli-
M	Molar
M	Monat
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEP	Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitorzellen
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
min	Minuten
MLD	Metachromatischen Leukodystrophie
MLV	Muriner Leukämie Virus
MOI	„Multiplicity of Infection“
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NET	„Neutrophil Extracellular Trap“
n-	Nano-
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMD	„Nonsense-mediated RNA Decay“
nrLAM-PCR	nicht-restriktive LAM-PCR
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes („Peripheral Blood Mononuclear Cells“)
PBS	Primerbindungsstelle
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGK	Phosphoglyceratkinase
pol	Vorläufergen für enzymatische Aktivitäten bei Retroviren (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease)
PPT	Polypurintrakt
qPCR	Quantitative Real-Time-PCR
R-Region	Redundante Region im LTR
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
rpm	Umdrehungen pro Minute

---

RRE	„Rev Responsive Element“
RT	Reverse Transkriptase
RTCGD	„Retrovirally Tagged Cancer Gene Database“
RV	gammaretroviraler Vektor
s	Sekunden
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SFEM	Serum-freies Expansions-Medium
SFFV	„Spleen Focus Forming Virus“
SIN	selbstinaktivierend
SOP	Standardarbeitsanweisung („Standard Operating Procedure“)
ssDNA	einzelsträngige („single-stranded“)
SV40	„Simian-Virus 40“
T-ALL	T-Zell akute lymphoblastische Leukämie
TCR	„T-cell receptor“
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
tRNA	Transfer-RNA
TSS	Transkriptionsstartstelle
TU	Transduktionseinheit („Transduction Unit“)
U3	„Unique 3“
U5	„Unique 5“
UCOE	„Ubiquitous Chromatin Opening Element“
VCN	Vektorkopienzahl („Vector Copy Number“)
VSV-G	Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus
WT	Wildtyp
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
X-ALD	X-gekoppelte Adrenoleukodystrophie
X-CGD	X-gekoppelte Septische Granulomatose
X-SCID	X-gekoppelter schwerer kombinierter Immundefekt („X-linked Severe Combined Immunodeficiency“)
ZFN	Zinkfingernukleasen

## 7.2 Zusätzliche Abbildung



**Abbildung 7.1:** Lage der (nr)LAM-PCR Primer im LTR bzw. der Leadersequenz HIV-1-basierter lentiviraler Vektoren zur Detektion von ‚Readthrough‘- und Fusionstranskripten in cDNA Proben. Die Primer SK LTR 3 bio, SK LTR 4 bio und SK LTR 5 bzw. SK LTR 5 1/2 wurden zur Detektion von ‚Readthrough‘- als auch Fusionstranskripten verwendet, während die Kombination von SK LTR 3 bio, FP LV 1 bio und FP LV 2 der Identifizierung von Fusionstranskripte diente. Die Verwendung des gemeinsamen Primers SK LTR 3 bio in der linearen PCR ermöglicht die gemeinsame Durchführung der Reaktionen bis zum Ligationsprodukt. (nr)LAM-PCR, (nicht-restriktive) lineare amplifikationsmedierte PCR; LTR, ‚Long Terminal Repeat‘; HIV-1, Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1; bio, biotinyliert; SD, Spleißdonor.



**Abbildung 7.2:** Lage der (nr)LAM-PCR Primer im LTR bzw. der Leadersequenz SFFV-basierter gammaretroviraler Vektoren zur Detektion von ‚Readthrough‘- und Fusionstranskripten in cDNA Proben. Die Primer U5 VI SFFV bio, LTR 25 SFFV bio und LTR 25 nested SFFV wurden zur Detektion von ‚Readthrough‘- als auch Fusionstranskripten verwendet, während die Kombination von U5 VI SFFV bio, FP RV 1 bio und FP RV 2 der Identifizierung von Fusionstranskripte diente. Die Verwendung des gemeinsamen Primers U5 VI SFFV bio in der linearen PCR ermöglicht die gemeinsame Durchführung der Reaktionen bis zum Ligationsprodukt. (nr)LAM-PCR, (nicht-restriktive) lineare amplifikationsmedierte PCR; LTR, ‚Long Terminal Repeat‘; SFFV, ‚Spleen Focus Forming Virus‘; bio, biotinyliert.

## DANKSAGUNG

Die letzten Zeilen meiner Arbeit möchte ich all denjenigen widmen, die mich in dieser Zeit unterstützt und zum erfolgreichen Abschluss meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Christof von Kalle möchte ich dafür danken, dass ich meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen durfte, wodurch mir die anwendungsorientierte Forschung und Mitarbeit an präklinischen und klinischen Studien ermöglicht wurde. Vielen Dank für die fortwährende Unterstützung und die guten fachlichen und menschlichen Ratschläge.

Prof. Dr. Frank Lyko danke ich für die Betreuung dieser Arbeit sowie die Bereitschaft als Zweitgutachter zur Verfügung zu stehen. Ich möchte mich bei ihm und Prof. Dr. Bartenschlager für ihre Zeit bedanken, die Sie sich für die Besprechung meiner Doktorarbeit genommen haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Manfred Schmidt bedanken, der die direkte Betreuung meiner Arbeit übernommen hat. Vielen Dank für die Unterstützung bei meiner persönlichen und fachlichen Weiterbildung, für die Möglichkeit zum selbstständigen Arbeiten, das wunderbare Arbeitsklima in unserer Gruppe und für seine unerschütterlich positive Sichtweise der Dinge, die mich immer wieder fasziniert hat. Nicht zuletzt möchte ich mich für die vielen Gelegenheiten zur Teilnahme an internationalen Kongressen und die damit verbundenen Erfahrungen bedanken.

Mein Dank geht auch an all unsere Kooperationspartner, insbesondere an Dr. Manuel Grez und seine Arbeitsgruppe, die mich bei diversen Laboraufenthalten immer herzlich aufgenommen haben. Ich danke Euch für die lustigen Unterhaltungen und interessanten fachlichen Gespräche.

Ein großer Dank geht natürlich an all meine Arbeitskollegen vom TP4 und an alle NCTler. Dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, für die tolle Arbeitsatmosphäre, für die unterhaltsamen „454 Besprechungen“ und für die vielen schöne Abende in der Heidelberger Altstadt, auf der Neckarwiese und bei zahlreichen Festen. Bei Cynthia und Richard möchte ich mich für ihre Hilfe bei jeglichen Fragen rund um die Integrationsstellenanalyse bedanken. Bei Anne und Raffaele für die bioinformatische Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bei Anna für ihre Freundschaft, ihr fröhliche Art und lange Abende mit vielen schönen Gesprächen bedanken, bei denen wir so einige Gemeinsamkeiten entdeckten - angefangen bei unserer Unermüdlichkeit bis hin zu unseren (versteckten) Talenten. Schön war die Zeit! Eliana war meine Verbündete, mit der ich Seite an Seite alle Höhen und Tiefen der Doktorarbeit durchlebt habe. Während dieser Zeit habe ich ihr herzliches Wesen, ihre Tierliebe sowie ihr italienisches Temperament sehr zu schätzen gelernt und wir sind sehr gute Freunde geworden. Danke für die ‚chocolate time‘, die lustigen Videoabende und die vielen Geschichten vom ‚casa cane/Ruggiero‘!

Weitere Verwandte im Geiste habe ich in Tine und Ina gefunden, bei denen ich mich auch für ihre Hilfe bei den unzähligen (nr)LAMs bedanken möchte, sowie in unserer lieben Schwester Stefanie, die uns leider für ihre Heimat verlassen hat. Tine war mit ihrer lustigen und hilfreichen Art nicht nur meine liebste Laborplatznachbarin, sie ist auch zu einer guten Freundin geworden. Besonders möchte ich mich bei ihr für ihren maßgeblichen Anteil bei der Vergrößerung meines Haushalts durch Sancho & Pancho bedanken, die mir sehr viel Freude bereitet haben und zu einem Teil meiner Familie geworden sind. Ina hat mich mit ihrer verrückten und lebensfrohen Natur immer wieder mitgerissen, zum Lachen gebracht und bei den verschiedensten Anlässen zu Höchstformen angetrieben. Danke für die Einblicke in das St. Leon-Roter (Nacht-)Leben, die guten Ratschläge in allen Lebenslagen, „es kann nur noch besser werden“-Sneak Previews und Mr. Wok! Die Freundschaft, die uns mittlerweile verbindet, möchte ich nicht mehr missen. Auch bei Steffi möchte ich mich für ihre Freundschaft bedanken, ihre ehrliche, heitere und unkomplizierte Art, dafür, dass sie immer zu jeder Schandtat bereit war, die langen Telefonate und ihre Geduld bei meinem Versprechen, sie auch eines Tages im hohen Norden besuchen zu kommen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden von ganzem Herzen danken. Besonders bei Steffi, Caro, Benni und meinem Patenkind Sebastian möchte ich mich für die seelische Unterstützung und ihren unerschütterlichen Glauben an mich bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Frieder, der (fast) klaglos meine unvorhersehbaren Stimmungsumschwünge ertragen und somit die meisten anderen davor bewahrt hat. Ich danke Dir dafür, dass Du mich immer wieder zum Lachen bringst, dass Du mich herausforderst und mich nicht aufgeben lässt. Danke für Deine Liebe, die mich stark macht und Deine „Tiefenentspanntheit“, auch wenn sie mich manchmal in den Wahnsinn treibt. Meine Familie, insbesondere meine Eltern, Manfred K., meine Schwester, meine Brüder und mein Freund sind die wichtigsten Menschen in meinem Leben und ich möchte mich bei Euch dafür bedanken, dass Ihr immer für mich da seid, mich unterstützt und immer an mich glaubt. Ihr seid mein fester Fels in der Brandung, mein Zufluchtsort, an dem ich abschalten und Kraft tanken kann und auf den ich mich immer verlassen kann.

**VIELEN DANK EUCH ALLEN!**

## 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 April 2013

.....

Simone Scholz