

**Korrektur der β c-defizienten Pulmonalen Alveolarproteinose (PAP)
durch hämatopoetischen Stammzell-Gentransfer
in einem β c-defizienten Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Veronika Kleff

aus Essen

Dezember 2006

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimente wurden an der Inneren Klinik (Tumorforschung), Direktor Prof. Dr. S. Seeber, der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bertram Opalka

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Angela Sandmann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2007

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	ix
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Pulmonale Alveolarproteinose (PAP).....	1
1.1.1 Krankheitsbild und Ätiologie.....	1
1.1.2 Behandlungsmöglichkeiten der PAP.....	2
1.1.3 Murine Modelle.....	2
1.2 Das hämatopoetische System.....	3
1.2.1 Aufbau des hämatopoetischen Systems.....	3
1.2.2 Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen.....	5
1.3 Gentherapie mit Zellen des blutbildenden Systems.....	5
1.3.1 Somatische Gentherapie mit hämatopoetischen Stammzellen.....	6
1.3.2 Gentherapie monogenetischer Erkrankungen.....	7
1.4 Chemotherapie-Resistenzgene als therapeutische Transgene.....	8
1.4.1 Klassifizierung von Chemotherapie-Resistenzgenen.....	8
1.4.2 MGMT ^{P140K} als Selektionsgen.....	9
1.5 Gamma-Retroviren.....	10
1.5.1 Aufbau und Lebenszyklus eines gamma-Retrovirus.....	10
1.5.2 Genomische Struktur der gamma-Retroviren.....	12
1.6 Gentransfer mit gamma-retroviralen Vektoren.....	14
1.6.1 Genomisches Design gamma-retroviraler Vektoren für die Gentherapie.....	14
1.7 Generierung geeigneter Vektorpräparationen für die Gentherapie.....	15
1.7.1 Stabile Verpackungszelllinien.....	15
1.7.2 Transiente Verpackungszelllinien.....	18
1.8 Ziel der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze.....	21
2.1.3 Antikörper.....	21
2.1.4 Wachstumsfaktoren.....	22
2.1.5 Puffer und weitere Lösungen.....	22

2.1.6	Geräte	23
2.1.7	Bakterien, primäre Zellen, Zelllinien und Tiere	24
2.1.8	Retrovirale Vektoren.....	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Klonierung des retroviralen Vektors SF91-m β c-IRES-MGMT ^{P140K}	25
2.2.2	Transformation kompetenter E. coli-Bakterien des Stammes DH5 α .	26
2.2.3	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	26
2.2.4	DNA Agarosegelelektrophorese	27
2.2.5	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	27
2.2.6	Einzelkolonie-PCR	27
2.2.7	Southern Blot.....	28
2.2.8	Radioaktive Hybridisierung der Blot-Membran	28
2.3	Zellbiologische Standardmethoden	29
2.3.1	Kultivierung von Zellen	29
2.3.2	Kryokulturen	29
2.3.3	Durchflusszytometrie.....	30
2.3.4	Antikörperfärbung.....	30
2.3.5	Beschichtung der Zellkulturflaschen mit RetroNektin [®]	31
2.4	Generierung einer stabilen Produzentenzelllinie zur Produktion	
	hochtitriger Virusüberstände	31
2.4.1	Transiente CaPO ₄ -Transfektion von Verpackungszelllinien	31
2.4.2	Transduktion von FNX-eco-Zellen mit RD114-Überständen	32
2.4.3	Anreicherung transduzierter FNX-eco-Zellen mittels Zytostatika.....	33
2.4.4	Produktion retroviraler Überstände von stabilen Produzentenzellen .	33
2.4.5	Titration retroviraler Überstände.....	33
2.5	In-vitro-Analysen mit mβc-defizienten primären Zellen.....	34
2.5.1	Isolierung muriner KM-Zellen für die anschließende Transduktion....	34
2.5.2	Transduktion muriner KM-Zellen	34
2.5.3	CFU-C-Assay mit primären murinen KM-Zellen	35
2.5.4	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen der GM-CSF-Sensitivität korrigierter m β c ^{-/-} Zellen	35
2.5.5	<i>In-vitro</i> -Selektion durch Zytostatika-Behandlung	36
2.6	In-vivo-Analysen im murinen mβc^{-/-}-Mausmodell nach	
	Knochenmarkstransplantation	36
2.6.1	Transplantation transduzierter KM-Zellen.....	36
2.6.2	Zytostatika-Behandlung der Empfängermause	37
2.6.3	CFU-C-Assay mit mononukleären Zellen aus murinem Knochenmark transplantierter Tiere	37
2.6.4	Analyse der Lungenpathologie	37
2.7	Statistische Analysen	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Konstruktion des retroviralen Vektors SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}	39

3.2	Herstellung hochtitriger ekotroper Virusüberstände	41
3.2.1	Transiente Transfektion von FNX-RD114-Zellen zur Herstellung RD114-pseudotypisierter Viruspräparationen.....	41
3.2.2	Generierung einer stabilen polyklonalen FNX-eco Produzentenzelllinie	41
3.2.3	Selektion der polyklonalen FNX-eco-Produzentenzelllinie durch Zytostatika-Behandlung mit BG/TMZ	42
3.3	In-vitro-Untersuchungen zum mβc-Gentransfer in murine βc-defiziente hämatopoetische Vorläuferzellen	44
3.3.1	Evaluierung der funktionellen m β c-Expression nach m β c-Gentransfer	45
3.3.2	Untersuchung der Dosisabhängigkeit der GM-CSF-Sensitivität m β c- transduzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen	47
3.3.3	Evaluierung der funktionellen MGMT ^{P140K} -Expression nach Transduktion mit dem SF91-m β c-IRES-MGMT ^{P140K} -Vektor	49
3.3.4	<i>In-vitro</i> -Selektion transduzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen ..	52
3.4	In-vivo-Untersuchungen zum mβc-Gentransfer in einem murinen βc- defizienten PAP-Modell	54
3.4.1	Effekte auf das hämatopoetische System	56
3.4.1.1	<i>Analysen der Zellzahlen im peripheren Blut</i>	56
3.4.1.2	<i>Analysen der KM-Zellen</i>	58
3.4.1.3	<i>Evaluierung der Gentransferraten</i>	63
3.4.2	Effekte auf die Lungenpathologie m β c-defizienter Mäuse	66
3.4.2.1	<i>Analyse der Lungenpathologie</i>	66
3.4.2.2	<i>Semiquantitative Bestimmung des PAP-positiven Materials</i>	68
4	Diskussion	70
4.1	Vektordesign	70
4.2	Generierung hochtitriger Virusüberstände.....	72
4.3	Effekt des m β c-Gentransfers auf die Hämatopoese	74
4.4	Korrektur der PAP durch den m β c-Gentransfer in vivo	77
4.5	Selektionen mit Chemotherapie-Resistenzgenen	78
4.6	Ausblick und weitere Sicherheitserwägungen	81
5	Zusammenfassung	84
6	Literatur	86

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
5-FU	5-Fluorouracil
ACNU	1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoharnstoff
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
BCNU	1,3-bis (2-chloroethyl)-1-Nitrosoharnstoff
BG	O ⁶ -Benzylguanin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CFU-C	Colony forming units cells
CTX-R	Chemotherapie-Resistenzgen
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamin-Tetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
env	retrovirale Sequenz der Hüllproteine
EPO	Erythropoetin
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FKS	fötales Kälberserum
FNX	Phoenix
gag	Gen für retrovirales Kapsidprotein
GALV	Gibbon Ape Leukemia Virus
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure

i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IC ₅₀	halbletale Dosis
IE	Infektiöse Einheiten
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
LB	Luria Bertani
L-Glu	L-Glutamin
LTR	lange terminale Sequenzwiederholung
mAK	monoklonaler Antikörper
MDR-1	Multidrug Resistance Gene 1
MESV	Murine Embryonic Stem Cell Virus
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
ml	Milliliter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MSCV	Murine Stem Cell Virus
MW	Mittelwert
mβc	gemeinsame murine beta-Kette der Rezeptoreinheit für die Zytokine GM-CSF, IL3 und IL5
mβc ^{-/-}	mβc-defizient
NTC-Platten	Non-Tissue-Culture-Platten; nicht beschichtete Zellkulturplatten
P/S	Penicillin + Streptomycin
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pol	Gen der retroviralen reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase)
rh	rekombinant human

rm	rekombinant murin
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	Natrium-Dodezylsulfat
Sec	Sekunde
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TC-Platten	Tissue-Culture-Platten; beschichtete Zellkulturplatten
TMZ	Temozolomid
U/min	Umdrehungen pro Minute

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hierarchische Struktur des hämatopoetischen Systems.....	4
Abbildung 2: Aufbau und Replikationszyklus eines gamma-Retrovirus.....	11
Abbildung 3: Gamma-retrovirales Genom und Design retroviraler Vektoren.....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer stabilen retroviralen Verpackungszelllinie.....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren.	25
Abbildung 6: Klonierungsstrategie zur Konstruktion des SF91-m β c-IRES-MGMT ^{P140K} -Vektors.	39
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analyse der Viruspräparationen vor und nach Selektion der Produzentenzellen.	43
Abbildung 8: Anstieg der retroviralen Titer nach Zytostatika-Behandlung transduzierter FNX-eco-Produzentenzelllinien.	44
Abbildung 9: Experimentelles Design der <i>In-vitro</i> -Versuche.....	45
Abbildung 10: Wiederherstellung des GM-CSF-abhängigen Koloniewachstums durch m β c-Gentransfer.....	46
Abbildung 11: Keine Veränderung der Koloniebildung in Wildtypzellen durch den m β c-Gentransfer allein.	47
Abbildung 12: GM-CSF-Sensitivitätsprofil von CFU-C nach erfolgtem m β c-Gentransfer.....	48
Abbildung 13: Funktionelle Analyse der MGMT ^{P140K} -Expression in murinen KM-Zellen in Gegenwart von GM-CSF.	50
Abbildung 14: Funktionelle Analyse der MGMT ^{P140K} -Expression in murinen KM-Zellen in Gegenwart von G-CSF, EPO und SCF.....	51
Abbildung 15: Koloniewachstum m β c-transduzierter m β c ^{-/-} -Zellen nach <i>In-vitro</i> -Selektion.....	53
Abbildung 16: Experimentelles Design der <i>In-vivo</i> -Versuche.	56
Abbildung 17: EGFP-positive Zellen im peripheren Blut.....	57

Abbildung 18: Kontrollversuche zum m β c-Gentransfer in einem murinen <i>In-vivo</i> -Modell.....	60
Abbildung 19: Effekt des m β c-Gentransfers auf die Hämatopoese im murinen <i>In-vivo</i> -Modell.....	62
Abbildung 20: Bestimmung transduzierter KM-Zellen in m β c ^{-/-} -Mäusen durch Messung der EGFP-Expression.	63
Abbildung 21: Abschätzung der Gentransferrate anhand der GM-CSF- und IL-3-stimulierten Kolonien genetisch korrigierter Tiere.....	64
Abbildung 22: Wiederherstellung der Lungenstruktur nach Transplantation von m β c-transduzierten KM-Zellen.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl von Chemotherapie-Resistenzgenen für die Gentherapie.....	8
Tabelle 2: Design der beiden durchgeführten <i>In-vivo</i> -Versuche.....	55
Tabelle 3: Ergebnisse der Einzelkolonie-PCR.....	65
Tabelle 4: Semiquantitative Analyse der alveolaren Proteinakkumulation.....	68

1 Einleitung

1.1 Die Pulmonale Alveolarproteinose (PAP)

1.1.1 Krankheitsbild und Ätiologie

Die Pulmonale Alveolarproteinose (PAP) ist eine Lungenerkrankung, die erstmals von Samuel Rosen beschrieben wurde [Rosen et al., 1958]. Die Krankheit ist charakterisiert durch die Akkumulation von **Perjodsäure(acid) Schiff (PAS)-positivem** Material in den Alveolarräumen, welches aus Surfactant-Proteinen und Phospholipiden besteht. Es beeinträchtigt den Gasaustausch und führt zu respiratorischer Insuffizienz. Die Alveolarproteinose ist sehr selten (die Prävalenz wird auf rund 4 pro 1.000.000 Personen geschätzt) und kann sich prinzipiell in jedem Lebensalter manifestieren. Die Krankheit zeigt allerdings zwei Häufigkeitsgipfel, zum einen im Säuglingsalter und zum anderen zwischen dem 3. und 5. Lebensjahrzehnt [Seymour and Presneill, 2002].

Ätiologisch lassen sich bei der PAP idiopathische, sekundäre und kongenitale Formen unterscheiden. Die idiopathische Form der PAP zeigt hohe Titer von neutralisierenden Anti-Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor-(GM-CSF-) Antikörpern [Bonfield et al., 2002; Kitamura et al., 1999]. Sekundäre Formen der PAP werden mit bösartigen hämatologischen Erkrankungen [Cordonnier et al., 1994; Green et al., 1980; Hildebrand et al., 1990; Tsushima et al., 1999], pharmakologischer Immunsuppression [Phelps and Rose, 1991; Ruben and Talamo, 1986], Inhalation von toxischem Staub oder Rauch [Keller et al., 1995] oder diversen Infektionen der Lunge [Ito et al., 1999; Trapnell et al., 2003; Uchida et al., 2004] in Verbindung gebracht. Die bekannteste Form der kongenitalen Alveolarproteinosen beruht auf Mutationen im Surfactant-Protein-B, insbesondere auf die 121ins2 Mutation [Nogee et al., 1994] und die 122delT Mutation im Exon 4 des Gens [Lin et al., 1998]. Die Defizienz der gemeinsamen beta-Kette (β_c) [Hayashida et al., 1990; Kitamura et al., 1991] der GM-CSF-/Interleukin 3- (IL-3-)/Interleukin 5- (IL-5-) Rezeptorfamilie [Burdach et al., 1998; Gorman et al., 1992; McCormack and Gonda, 1999; Scott and Begley, 1999] repräsentiert eine weitere, seltene Form der kongenitalen PAP [Dirksen et al., 1997]. Die Ursache der β_c -PAP liegt dabei in den Alveolarmakrophagen, da in diesen Zellen eine GM-CSF-Signaltransduktion durch die β_c -Kette des Rezeptors notwendig ist, um die Degradation des internalisierten

Surfactant-Proteins zu gewährleisten und somit die Surfactanthomöostase aufrecht zu erhalten [Berclaz et al., 2002a; Berclaz et al., 2002b; Bonfield et al., 2003; Shibata et al., 2001; Trapnell and Whitsett, 2002]. Es ist auch beschrieben, dass sich bei Kindern mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) eine PAP entwickeln kann, die mit einer β c-Defizienz der leukämischen Blasten assoziiert ist [Dirksen et al., 1998].

1.1.2 Behandlungsmöglichkeiten der PAP

Seit den frühen 60er Jahren ist die Bronchio-Alveoläre-Lavage (BAL) die Behandlung der Wahl für die meisten PAP-Patienten, die an idiopathischen oder sekundären Formen der Krankheit leiden. Die BAL führt aber nur zu einer zeitlich begrenzten Verbesserung der Symptomatik [Ramirez, 1971]. Patienten mit idiopathischer Form der PAP, die Anti-GM-CSF-Antikörper aufweisen, können zudem symptomatisch mit GM-CSF-Aerosol behandelt werden [Arai et al., 2004; Price et al., 2006; Tazawa et al., 2005; Uchida et al., 2004; Wylam et al., 2006]. Wenn eine sekundäre PAP mit einer hämatologischen Erkrankung assoziiert ist, die durch eine Knochenmarkstransplantation erfolgreich therapiert wird, kann dies gleichzeitig auch eine Heilung der PAP bewirken [Trapnell et al., 2003]. Dagegen ist bei schweren Formen kongenitaler PAP, bei der weder die Bronchio-Alveoläre-Lavage noch die Surfactant-Substitution eine wesentliche klinische Befundverbesserung der Patienten erreichen [Hamvas et al., 1994], eine Lungentransplantation oft der einzige Ausweg [Hamvas et al., 1997].

In letzter Zeit wird auch über genetische Therapien kongenitaler PAP-Formen diskutiert. Für die β c-PAP bestünde dabei die Möglichkeit einer dauerhaften transgenen Expression des β c-Proteins in Alveolarmakrophagen durch den Gentransfer der β c-cDNA in blutbildende Stammzellen, aus denen die Alveolarmakrophagen letztendlich entstehen.

1.1.3 Murine Modelle

Um murine Modelle für diese Krankheitsbilder zu entwickeln, wurden transgene Mäuse hergestellt, die entweder eine Defizienz im GM-CSF-Gen ($GM^{-/-}$) [Dranoff et al., 1994; Stanley et al., 1994] oder im Gen für die gemeinsame β c-Kette der GM-

CSF-3/IL-3/IL-5-Rezeptoren ($\beta c^{-/-}$) besitzen [Nishinakamura et al., 1995; Robb et al., 1995]. Diese Tiere weisen eine Lungenpathologie ähnlich der humanen PAP auf, während der Allgemeinzustand der Tiere bei halbsteriler Haltung vergleichsweise gut ist und sie eine annähernd normale Lebenserwartung zeigen. In diesen murinen Modellen kann die PAP in $GM^{-/-}$ -Mäusen entweder durch die lokale GM-CSF-Expression in den Lungen [Huffman et al., 1996; Zsengeller et al., 1998] oder durch Inhalation von GM-CSF [Reed et al., 1999] korrigiert werden, während die Transplantation von Wildtyp-Knochenmarkszellen den Defekt in $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen korrigiert [Cooke et al., 1997; Nishinakamura et al., 1996b]. Des Weiteren eignen sich die $m\beta c^{-/-}$ -Mäuse, wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, vorzüglich als ein Modell für die Gentherapie der βc -PAP.

1.2 Das hämatopoetische System

1.2.1 Aufbau des hämatopoetischen Systems

Das hämatopoetische System ist dadurch charakterisiert, dass die gesamte Hämatopoese lebenslang von einer relativ kleinen Anzahl so genannter hämatopoetischer Stammzellen ausgeht. Diese Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind multipotent, d.h. sie können in sämtliche differenzierte Zellen des lympho-hämatopoetischen Systems, wie Granulozyten, Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen differenzieren. Sie sind weiterhin zur lebenslangen Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems nach Transplantation fähig und werden auch als langzeitrepopulierende Stammzellen bezeichnet. Durch diese Eigenschaften sind sie interessante Zielzellen für korrektive gentherapeutische Ansätze auch solcher monogenetischer Erkrankungen, bei denen die Korrektur des genetischen Defekts in ausdifferenzierten Zellen des hämatopoetischen Systems angestrebt wird. Dabei zeigt das hämatopoetische System eine hierarchische Ordnung (Abbildung 1), nach der die differenzierten Funktionszellen nach erheblicher Proliferation, insbesondere auf der Ebene der Vorläuferzellen, aus den Stammzellen hervorgehen. Derzeit wird darüber diskutiert, ob die Funktionszellen, wie bisher angenommen, aus einer gemeinsamen lymphoiden oder aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle entstehen [Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997] oder ob mehrere gemeinsame

Vorläuferzellen für die myeloischen bzw. lymphoiden Linien existieren [Adolfsson et al., 2005].

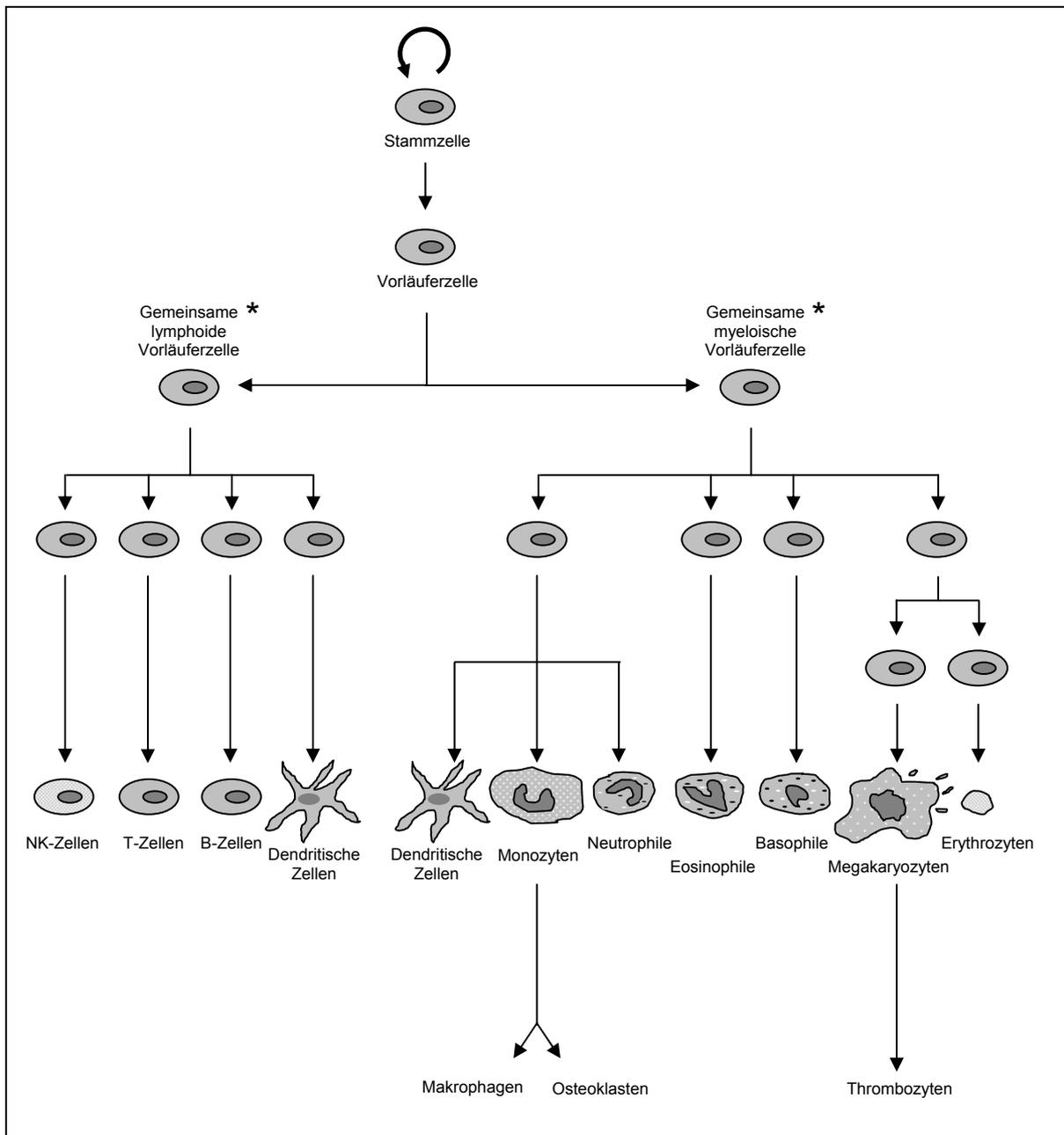


Abbildung 1: Hierarchische Struktur des hämatopoetischen Systems.

Gezeigt ist schematisch die Abstammung differenzierter Blutzellen aus einer postulierten gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle. Das Potential zur Differenzierung nimmt von der Stammzelle zu den reifen Funktionszellen ab. * Die Stringenz der Auftrennung in eine lymphoide und myeloische Vorläuferzelle wird zurzeit kontrovers diskutiert (s. Text).

1.2.2 Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen

Morphologisch und phänotypisch können hämatopoetische Stammzellen zwar beschrieben, zurzeit jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Ein bedeutender Schritt zur phänotypischen Charakterisierung dieser Zellen war daher die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen Stamm-/Vorläuferzellspezifische Oberflächenantigene [Gunji and Suda, 1995]. So beschrieben Andrews et al. einen monoklonalen Antikörper, mit dessen Hilfe sehr primitive koloniebildende Vorläuferzellen aus humanem Knochenmark angereichert werden konnten [Andrews et al., 1986]. Das von diesen Antikörpern erkannte, später als CD34 bezeichnete Antigen, wird auf humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, vielen Leukämie-Zellen, Endothelzellen und einigen fetalen mesenchymalen Zellen exprimiert [Fina et al., 1990; Krause et al., 1994; Krause et al., 1996]. Im murinen System wird zurzeit vor allem die Kombination von Markern für differenzierte Zellen (lin^-) sowie die Stammzellmarker *c-kit* und *sca-1* ($lin^-sca-1^+c-kit^+$) zur Charakterisierung von Stammzellen verwendet [Donnelly et al., 1999; Spangrude et al., 1988].

Eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung hämatopoetischer Stamm-/Vorläuferzellen kann jedoch durch funktionelle Assays erfolgen. Klonogene humane und murine Vorläuferzellen lassen sich indirekt durch ihre Fähigkeit, *in vitro* in semisolidem Medium Kolonien (colony-forming units - culture [CFU-C]) zu bilden, charakterisieren. Außerdem lassen sich die murinen hämatopoetischen Stammzellen *in vivo* durch (serielle) Transplantationen in letal bestrahlte Empfängertiere nachweisen. Ein Nachweisverfahren für Stammzellen mit Repopulationsfähigkeit ist der spleen colony assay [Magli et al., 1982; Till and McCulloch, 1972]: Nach Transfusion geeigneter Zellen in letal bestrahlte Tiere bilden sich Kolonien hämatopoetischer Zellen in der Milz, wobei jede Kolonie von jeweils einer injizierten Vorläuferzelle (CFU-S: colony forming unit-spleen) abstammt.

1.3 Gentherapie mit Zellen des blutbildenden Systems

Unter Gentherapie versteht man eine medizinische Intervention, bei der Gene in Zellen eines Patienten eingeführt werden, um Krankheiten zu heilen oder Symptome zu mildern [Mulligan, 1993]. Hierbei unterscheidet man prinzipiell zwischen

Keimbahn-Gentherapie und somatischer Gentherapie. Bei der Keimbahn-Gentherapie wird das Erbgut von Ei- oder Samenzellen verändert. Dadurch betrifft die genetische Veränderung sämtliche Körperzellen, auch die Keimzellen, so dass die Genkorrektur an die Nachkommen weitervererbt werden kann. Die Keimbahntherapie am Menschen wird weltweit aus ethischen Gründen bislang nicht durchgeführt. Bei der somatischen Gentherapie wird die genetische Veränderung in den Körperzellen vorgenommen, betrifft nur den behandelten Organismus und kann nicht an die Nachkommen weitergegeben werden.

1.3.1 Somatische Gentherapie mit hämatopoetischen Stammzellen

Wegen ihrer bereits oben beschriebenen langen Lebensdauer, ihrer Differenzierungs- und Proliferationskapazität sowie des einfachen Zugriffs stellen hämatopoetische Stammzellen eine besonders attraktive Zielpopulation für die somatische Gentherapie dar. Für monogene Erkrankungen des lymphohämatopoetischen Systems, für die oft nur ungenügende oder sehr risikobehaftete Therapieansätze wie die allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung stehen, ist mit dem korrektiven Gentransfer in autologe Blutstammzellen die Hoffnung auf eine dauerhafte Heilung verbunden. Dabei stellt der retrovirale Gentransfer derzeit das klinisch am weitesten entwickelte System zur Expression therapeutischer Gene in hämatopoetischen Zellen dar [Aiuti et al., 2002; Cavazzana-Calvo et al., 2000; Gaspar et al., 2004; Ott et al., 2005; Ott et al., 2006]. Ein Problem dieser Technologie ist jedoch die niedrige, für therapeutische Zwecke oft ungenügende Effizienz bei der Transduktion primitiver hämatopoetischer Zellen. So lag die Gentransfereffizienz in transplantierbare Stammzellen in den ersten klinischen Studien Mitte der 90er Jahre deutlich unterhalb von 1%. Diese Situation konnte mittlerweile durch (a) den Einsatz geeigneter hämatopoetischer Wachstumsfaktoren zur Proliferationsinduktion, (b) die Verwendung von Fibronectinfragmenten während der Transduktion zur Verbesserung des Kontakts von Virionen und Zielzellen, (c) den Einsatz pseudotypisierter viraler Partikel mit erhöhter Bindungsspezifität für hämatopoetische Stammzellen sowie (d) die Optimierung der Transgen-Expression von den retroviralen Vektorkonstrukten deutlich verbessert werden [Baum et al., 2006b; Halene and Kohn, 2000; Moritz and Williams, 1998]. Auch unter derart optimierten Bedingungen wurde jedoch in den meisten Fällen nur eine Gentransfereffizienz von

5 - 20% erreicht [Abonour et al., 2000; Kiem et al., 1998], was für die therapeutische Anwendung nicht immer ausreichend ist.

1.3.2 Gentherapie monogenetischer Erkrankungen

Die erste erfolgreiche hämatopoetische Stammzell-Gentherapie wurde im Jahr 2000 beschrieben [Cavazzana-Calvo et al., 2000] und erwies sich als effektive, kurative Behandlungsmethode für eine monogenetische Erkrankung. Hier wurde gezeigt, dass Patienten, die an der X-chromosomal-gekoppelten Immunschwäche (SCID-X1) erkrankt waren, die durch einen Defekt der gemeinsamen γ -Kette (γ_c) der IL-2-/IL-4-/IL-7-/IL-9-/IL-15-/IL-21-Rezeptoren verursacht wird, mit Hilfe einer Gentherapie geheilt werden konnten. In dieser Studie wurden von zehn SCID-X1-Patienten hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor transduziert, der die cDNA der gemeinsamen γ -Kette enthielt. Diese Zellen wurden den Patienten anschließend reinjiziert. Drei der 10 Patienten entwickelten in der Folge jedoch eine T-Zell-Leukämie aufgrund der Insertion des retroviralen Vektors in die Nähe der Promotorregion des Protoonkogens *LMO2* [Hacein-Bey-Abina et al., 2003]. Als Folge dieser Ereignisse wurden die Untersuchungen zur Sicherheit von Gentherapieverfahren, und insbesondere zur Integrationsmutagenese retroviraler Vektoren, deutlich genauer noch einmal untersucht [Baum et al., 2004].

Nichts desto trotz wurden zwei weitere erfolgreiche klinische Gentherapiestudien durchgeführt, bei denen die Korrektur eines Gendefekts und in Folge eine Heilung der Patienten erzielt wurde: 2002 wurde von der erfolgreichen Behandlung der durch Adenosindeaminase-Mangel hervorgerufenen Immunmangelerkrankung (ADA-SCID) berichtet [Aiuti et al., 2002], und 2005 wurde die erfolgreiche Behandlung zweier Patienten mit chronischer Granulomatose mittels Gentherapie beschrieben [Ott et al., 2005]. Diese Studien zeigen prinzipiell, dass die Gentherapie eine Erfolg versprechende Therapieform darstellen kann, die auch den Gendefekt der β_c -defizienten PAP korrigieren könnte. Da mit der derzeitigen Gentransfertechnologie in hämatopoetischen Stammzellen in der Regel nur eine mäßige Transduktionseffizienz zu erreichen ist, die für eine Heilung der β_c -defizienten PAP vielleicht nicht ausreicht, könnte eine (*In-vivo*-)Anreicherung der genetisch korrigierten hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen notwendig werden, um einen therapeutisch wirksamen

Anteil korrigierter reifer Blutzellen zu erhalten. Die (*In-vivo*-)Anreicherung könnte z.B. durch die Koexpression eines Chemotherapie-Resistenzgens zusammen mit dem therapeutischen Gen erreicht werden, wobei die transduzierten Zellen (*in vitro*) bzw. die Tiere mit den transduzierten Zellen (*in vivo*) einer Chemotherapie unterzogen werden. Dabei sind die transduzierten Zellen aufgrund der Expression des Chemotherapie-Resistenzgens vor dieser Zytostatika-Behandlung geschützt und es kommt somit zu einer Selektion der transduzierten Zellen.

1.4 Chemotherapie-Resistenzgene als therapeutische Transgene

1.4.1 Klassifizierung von Chemotherapie-Resistenzgenen

Chemotherapie-Resistenzgene (CTX-R) kodieren Proteine, die Zellen vor den zytotoxischen Effekten chemotherapeutischer Medikamente (Zytostatika) schützen. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl dieser Resistenzgene [Flasshove et al., 2003; Moritz and Williams, 2001].

Tabelle 1: Auswahl von Chemotherapie-Resistenzgenen für die Gentherapie.

Gen (Produkt)	Medikamentengruppen	Resistenzmechanismus	Lokalisation des Produkts
Multidrug Resistance Gen-1 (MDR-1)	Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Etoposid, Taxol	Transmembraner Stofftransport via Effluxpumpe	Zellmembran
Multidrug Resistance related Protein (MRP)	Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Etoposid, Taxol	Transmembraner Stofftransport via Effluxpumpe	Zellmembran
Aldehyddehydrogenase (ALDH)	Cyclophosphamid	Intrazelluläre Detoxifikation	Zytoplasma
Dihydrofolat-reduktase (DHFR)	Methotrexat, Trimetrexat	Mutante Form wird von Medikamenten nicht inhibiert	Zytoplasma
Cytidineaminase (CDD)	Cytosin-Arabinosid, Gemcitabin	Intrazelluläre Detoxifikation	Zytoplasma
O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)	Chloroethylnitrosoharnstoffe (ACNU, BCNU), Triazene (TMZ)	Repariert O ⁶ -Addukte	Zellkern

Die (Über)-Expression eines CTX-R-Gens in einer Zelle führt zur erhöhten Resistenz dieser Zelle gegenüber einer Zytostatika-Behandlung. Neben der klinischen Anwendungsmöglichkeit eines CTX-R-Genstransfers zum Schutz der Hämatopoese im Rahmen dosisintensiver Chemotherapie-Protokolle besteht das zusätzliche therapeutische Potenzial einiger dieser CTX-R-Gene in der *In-vivo*-Selektion genetisch korrigierter Stammzellen.

1.4.2 MGMT^{P140K} als Selektionsgen

In verschiedenen Mausmodellen hat sich eine mutante Form des Gens für die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), MGMT^{P140K}, als ein geeignetes Selektionsgen erwiesen [Jansen et al., 2002; Persons et al., 2003; Richard et al., 2004]. Bei der MGMT handelt es sich um ein DNA-Reparaturprotein, das die besonders zytotoxischen Alkylierungen an der O⁶-Position des Guanins nach Exposition gegenüber Substanzen wie Chloroethylnitrosoharnstoffen oder Triazenen repariert. Im Vergleich zu anderen Geweben haben hämatopoetische Zellen eine sehr niedrige natürliche MGMT-Aktivität [Gerson et al., 1996] und sind gegen O⁶-alkylierende Zytostatika besonders empfindlich. Ein gewisser Schutz blutbildender Zellen vor O⁶-alkylierenden Zytostatika (siehe Tabelle 1) durch Überexpression der Wildtyp-MGMT konnte *in vitro* und in Mausmodellen zwar belegt werden, aber die Chemotherapieresistenz Wildtyp-MGMT-überexprimierender Zellen war nur mäßig erhöht, und die Selektion transduzierter Zellen in murinen Transplantationsmodellen war häufig unbefriedigend [Davis et al., 1999].

Als besser geeignet erwiesen sich mutante Formen der MGMT, die gegen den MGMT-spezifischen Inhibitor O⁶-Benzylguanin (BG) resistent sind. BG ist ein Guanin-Analogon, welches an das katalytische Zentrum der MGMT bindet und das Protein irreversibel inaktiviert [Pegg, 1990]. Bei einer kombinierten Therapie mit BG und O⁶-alkylierenden Substanzen (ACNU, BCNU, TMZ) wird die endogene MGMT somit inaktiviert und kann die entstandenen O⁶-Alkylierungen durch die Zytostatika nicht mehr reparieren. In klinischen Studien wurde BG erfolgreich eingesetzt, um die O⁶-Alkyl-Reparaturkapazität MGMT-überexprimierender Tumoren herabzusetzen und das Ansprechen auf O⁶-alkylierende Substanzen (BCNU) zu erhöhen [Spiro et al., 1999]. Für BG-resistente Mutanten der MGMT wurde mittlerweile in mehreren Studien sowohl ein effizienter Schutz der Hämatopoese vor einer kombinierten

Chemotherapie mit BG und O⁶-alkylierenden Substanzen als auch eine effiziente Anreicherung genetisch veränderter Zellen gezeigt [Davis et al., 2000; Koc et al., 1999; Ragg et al., 2000; Reese et al., 1999; Sawai et al., 2001]. Besonders geeignet erscheint dabei die nahezu vollständig BG-resistente Mutante MGMT^{P140K} [Xu-Welliver et al., 1998]. So wurde von mehreren Gruppen gezeigt, dass im murinen Modell Empfängertiere durch die Transplantation MGMT^{P140K}-transduzierter Zellen effektiv vor der Hämatotoxizität einer kombinierten Verabreichung von BG und O⁶-alkylierenden Zytostatika geschützt werden können. Darüber hinaus wurde während der chemotherapeutischen Behandlung eine erhebliche Anreicherung transduzierter Zellen beobachtet, die für manche Zellkompartimente, wie z.B. Granulozyten, weit über 90% lag [Jansen et al., 2002; Ragg et al., 2000]. Weitere Studien in Mausmodellen zur Gentherapie der β -Thalassämie sowie der Erythropoetischen Protoporphyrinurie belegen ebenfalls eine Anreicherung korrigierter Vorläuferzellen mittels Zytostatika-Behandlung wenn das therapeutische Gen in Kombination mit der MGMT^{P140K} exprimiert wurde [Persons et al., 2003; Richard et al., 2004].

1.5 Gamma-Retroviren

1.5.1 Aufbau und Lebenszyklus eines gamma-Retrovirus

Zurzeit stellt der retrovirale Gentransfer das klinisch am weitesten entwickelte System zur Expression therapeutischer Transgene in hämatopoetischen Zellen dar [Halene and Kohn, 2000; Moritz and Williams, 1998; Ochs and Thrasher, 2006; Ott et al., 2005]. Gamma-Retroviren gehören zu den RNA-Viren, die sich über eine intermediäre DNA replizieren [Coffin, 1996]. Das Retrovirion hat einen Durchmesser von 100 nm und besteht aus einer Hülle sowie einem Kernkomplex (Abbildung 2). Die Hülle (env) setzt sich aus der Wirtszellmembran und viralen Glykoproteinen, dem Oberflächen-Hüllprotein und dem Transmembran-Glykoprotein zusammen. Der Kernkomplex enthält virale Replikationsenzyme (pol), das Kapsid (gag) und zwei Kopien des linearen, einzelsträngigen (+ Strang) RNA-Moleküls von 7 - 11 kb Größe. Die Infektion der Zielzelle erfolgt durch spezifische Interaktionen zwischen dem Oberflächen-Hüllprotein und einem zellulären Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle, wobei die viralen Hüllproteine die Wirtsspezifität der Virionen bestimmen

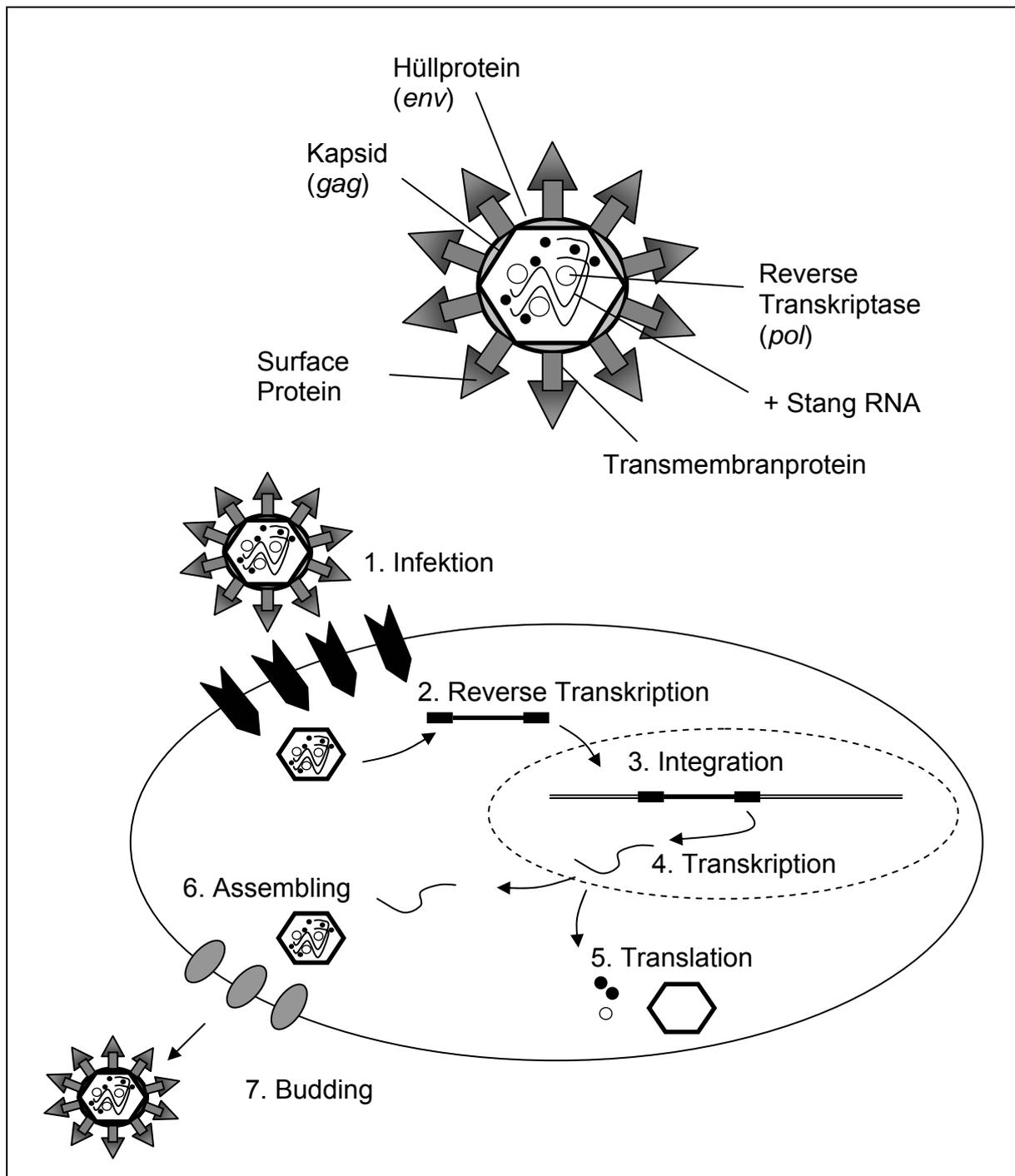


Abbildung 2: Aufbau und Replikationszyklus eines gamma-Retrovirus.

Oben: Das Virion besteht aus einer Umhüllung aus dem Hüllprotein, welches von dem *env*-Gen kodiert wird, dem Surface-Protein und dem Transmembranprotein. Im Inneren befinden sich das Kapsid, das von dem *gag*-Gen kodiert wird, die reverse Transkriptase, die von dem *pol*-Gen kodiert wird und die (+ Stang-)RNA. Unten: Nachdem die Virushülle mit der Zellmembran fusioniert hat, wird die virale RNA revers transkribiert, in das Wirtsgenom als Provirus integriert und mit der zellulären DNA repliziert. Zur Herstellung der Viruspartikel wird die provirale DNA transkribiert und translatiert. Im Zytoplasma werden dann virale Partikel zusammengesetzt („Assembling“) und schließlich aus der Zellmembran abgeschnürt („Budding“).

(Abbildung 2). Anschließend fusionieren durch das Transmembran-Glykoprotein die Virus- und die Wirtszellmembran, und der Kernkomplex des Virus wird in das Zytoplasma entlassen. Nach Freisetzung des viralen Genoms aus dem Kapsid in das Zytoplasma wird die virale RNA durch die reverse Transkriptase in eine lineare doppelsträngige DNA umgeschrieben, in den Nukleus transportiert und schließlich in das Genom der Wirtszelle stabil integriert [Miller, 1990]. Der Integrationsort dieser als Provirus bezeichneten DNA wurde bislang als rein zufällig angesehen; inzwischen gibt es jedoch Hinweise auf bevorzugte Integrationsstellen, beispielsweise in aktiven Genregionen [Baum et al., 2006a; Von Kalle et al., 2004]. Die provirale Sequenz wird wie ein zelluläres Gen während des Zellzyklus repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Die Transkription des Provirus führt sowohl zur Bildung (gespleißter) viraler mRNA, als auch der ungespleißten viralen genomischen RNA. Im Zytoplasma wandern die von der viralen mRNA synthetisierten viralen Kernproteine zur Zellmembran und lagern sich mit der genomischen, viralen RNA zusammen (assembling). Die viralen Glykoproteine werden integriert und das neu entstandene Virion schnürt sich von der äußeren Zellmembran der Wirtszelle ab (budding). Außerhalb der Wirtszelle findet die endgültige Zusammenlagerung der Kernproteine statt, was zur vollständigen Reifung des infektiösen Viruspartikels führt. Da gamma-Retroviren eine intakte Kernmembran nicht passieren können, ist zu ihrem Eintritt in den Kern die Auflösung der Kernmembran bei einer Zellteilung erforderlich.

1.5.2 Genomische Struktur der gamma-Retroviren

Das in das Genom der Wirtszelle integrierte Provirus besitzt am 5'- und 3'-Ende zwei identische Sequenzen, die so genannten LTRs (Long Terminal Repeats). Diese Bereiche tragen sämtliche cis-aktiven Elemente, die für die virale Genexpression notwendig sind, wie den Promoter, den Transkriptionsterminator und das Polyadenylierungssignal (Abbildung 3). Am Ende der LTRs befinden sich Bindungsstellen (att, attachment sites), die für die virale Integration in die zelluläre DNA essentiell sind. Zudem sind zusätzliche cis-aktive Signale enthalten, die für die reverse Transkription erforderlich sind, wie z.B. die Primer-Bindungsstelle (PBS). Des Weiteren liegt in der Nähe der 5'-LTR das Verpackungssignal ψ (Ψ), das für die Verpackung der viralen RNA in die Virus-Partikel notwendig ist. Normalerweise sind die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* zwischen den LTRs lokalisiert. Dabei können

Retroviren mittels des *env*-Gens verschiedene Hüllproteine exprimieren, die jeweils andere Rezeptoren erkennen. So bindet zum Beispiel das ekotrope *env*-Protein, das ein eingeschränktes Wirtsspektrum aufweist und somit nur auf Nagerzellen erkannt wird, an den mCAT-1-Rezeptor, einen Translokator für basische Aminosäuren [Wang et al., 1991]. Das feline Retrovirus RD114, dem der natriumabhängige Aminosäuretransporter hASCT2 als Rezeptor dient [Rasko et al., 1999], kann dagegen sowohl canine, Primaten- als auch humane Zellen infizieren [Klement and Mcallister, 1972; Nelson-Rees et al., 1973; Niman et al., 1977]. Die Art des *env*-Proteins determiniert somit den Zelltropismus des Retrovirus, da die passenden Rezeptoren nicht in allen Spezies vorkommen und innerhalb eines Organismus differenzierungsabhängig exprimiert werden.

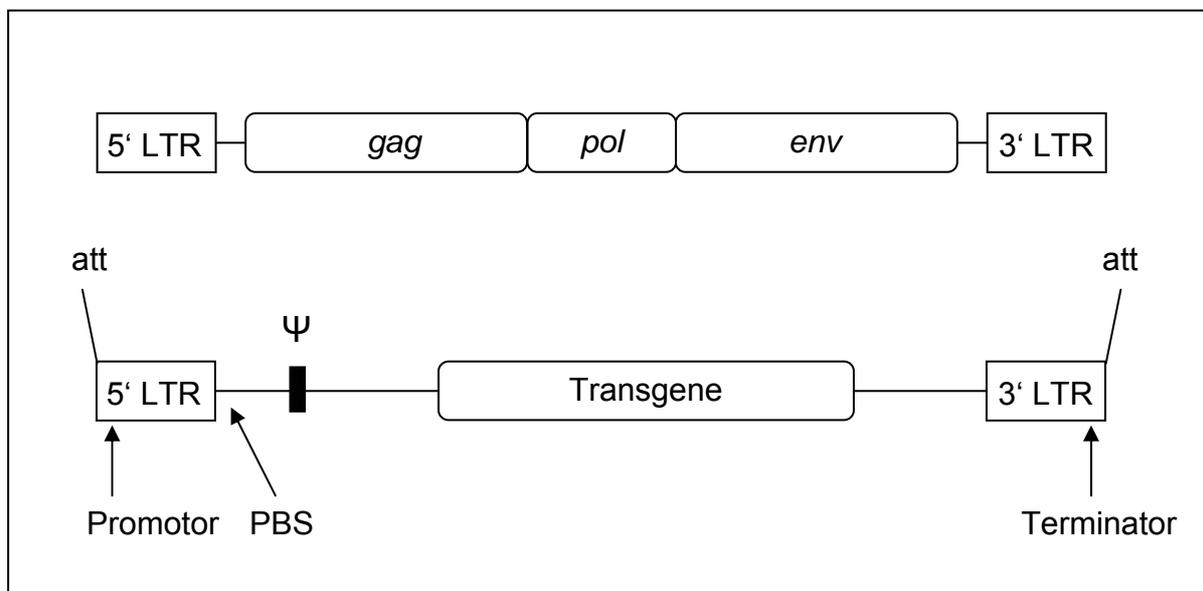


Abbildung 3: Gamma-retrovirales Genom und Design retroviraler Vektoren.

Oben: Genomische Struktur des Provirus eines gamma-Retrovirus; unten: retroviraler Vektor mit cis-aktiven Elementen. Die retroviralen Gene wurden durch Transgene ersetzt. *att*: attachment sites; PBS: Primer-Bindungsstellen; Ψ : Verpackungssignal; LTR: Long Terminal Repeat. *Gag*: kodiert für das Kapsid; *pol*: kodiert für die reverse Transkriptase; *env*: kodiert für das Hüllprotein.

1.6 Gentansfer mit gamma-retroviralen Vektoren

1.6.1 Genomisches Design gamma-retroviraler Vektoren für die Gentherapie

Die relativ einfache Genomstruktur der gamma-Retroviren erlaubt ein unkompliziertes Design von replikationsdefizienten Vektorsystemen [Miller, 1997]. Bei der Konstruktion retroviraler Vektoren werden gewöhnlich große Anteile der Virus-Strukturgene entfernt, lediglich die LTRs und das Verpackungssignal bleiben komplett erhalten. Die Entfernung aller Virus-Strukturgene reduziert das Problem der Entstehung replikationskompetenter Viren und die Toxizität bzw. Immunogenität viraler Proteine, wie sie bei der Transduktion mit Herpes- und adenoviralen Vektoren beschrieben ist [Leib and Olivo, 1993; Tripathy et al., 1996]. Zur Produktion infektiöser Vektorpartikel bedarf es daher so genannter Verpackungszelllinien, welche die erforderlichen viralen Proteine komplementieren [Miller, 1990]. Derzeitige gamma-retroviral-abstammende Vektoren erlauben die Verpackung von bis zu 8 kb RNA und können die kodierenden Regionen von zwei verschiedenen Transgenen enthalten. Bei den Transgenen handelt es sich entweder um therapeutische Gene oder auch selektierbare Markergene wie das *lacZ*-Gen (kodiert die β -Galaktosidase), das *neo^R*-Gen (kodiert die Neomycinphosphotransferase) oder das *EGFP*-Gen (kodiert das Enhanced Green Fluorescent Protein). Die Transkription bicistronischer messenger-RNAs (mRNAs) kann in eukaryotischen Zellen jedoch sehr ineffizient sein, weshalb unterschiedliche Vektorkonstrukte etabliert wurden, um dieses Problem zu lösen: Anfänglich wurde dazu eines der Gene vom Promotor in der 5'-LTR exprimiert, während das zweite Gen von einem internen Promotor abgeschrieben wurde [Malik et al., 1995]. Diese Konstellation erwies sich jedoch als unzuverlässig, da trotzdem die Expression des zweiten Gens gegenüber dem ersten häufig deutlich vermindert war [Wu et al., 1996]. Ein weiterer Ansatz war der Einsatz einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES), die zwischen den beiden Transgenen platziert wird und auch in eukaryotischen Zellen die effiziente cap-unabhängige Translation des 3'-gelegenen *open reading frames* (orf) einer bicistronischen mRNA unter Kontrolle des 5'-LTR-Promotors erlaubt [Adam et al., 1991; Aran et al., 1994]. Alternativ können Fusionsgene eingesetzt werden, welche die Produkte zweier Gene in einem Polypeptid vereinigen [Budak-Alpdogan et al., 2004]. In einem neueren Konzept wird die autoproteolytische 2A-

Sequenz des Maul-und-Klauen-Seuche-Virus in retroviralen Vektoren verwendet [De Felipe and Izquierdo, 2000]. Hierbei werden die zu koexprimierenden Gene über die 2A-Sequenz verknüpft, so dass ein Fusionsprotein entsteht. Die 2A-Sequenz vermittelt anschließend die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins, so dass beide Proteine über einen einzigen Promotor im äquimolaren Verhältnis synthetisiert werden. All diese Konstrukte können prinzipiell die dauerhafte Expression der Transgene in der Zielzelle garantieren. Die Expression des Transgens wird jedoch oft durch Mechanismen der Wirtszellen wie z.B. das „Silencing“ der heterologen (viralen) Promotoren durch CpG-Methylierung verringert. Daher ist die Entwicklung von retroviralen Vektoren, die auf die jeweilige Zielzelle optimiert sind, erstrebenswert. Um eine effizientere Expression von Transgenen in primären hämatopoetischen Vorläuferzellen zu ermöglichen, wurden Vektorkonstrukte entwickelt, die sowohl regulatorische Elemente des „Spleen Focus-forming Virus“ (SFFV) als auch des „Murine Embryonic Stem Cell Virus“ (MESV) enthalten [Baum et al., 1995; Becker et al., 1998; Eckert et al., 1996].

1.7 Generierung geeigneter Vektorpräparationen für die Gentherapie

Um Zielzellen effizient mit retroviralen Vektoren zu infizieren, benötigt man hochtitrige Viruspräparationen. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten, geeignete Viruspräparationen zu generieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Zweck zwei verschiedene Typen von Verpackungszelllinien verwendet, zum einen stabile und zum anderen transiente Verpackungszelllinien, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

1.7.1 Stabile Verpackungszelllinien

Ein bedeutender Schritt der retroviralen Gentransfer-Technologie war die Generierung von Zelllinien, die rekombinante retrovirale RNAs in infektiöse Partikel verpacken konnten. Hierdurch wurde es möglich, effektiv retrovirale Partikel herzustellen, die in den therapeutischen Zielzellen nicht mehr in der Lage waren,

replikationsfähige Viren (siehe 1.5.1) zu produzieren [Danos, 1991; Miller, 1990]. Zur Herstellung stabiler Produzentenzelllinien, die dauerhaft infektiöse Partikel produzieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Verpackungszelllinie Phoenix (FNX)-eco eingesetzt [Kinsella and Nolan, 1996]. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um gentechnisch modifizierte 293T-Zellen, eine humane embryonale Nierenzelllinie, die mit E1A und E1B von Adenovirus 5 transformiert wurde und ein temperaturabhängiges T-Antigen des SV40-Affenvirus trägt [Dubridge et al., 1987]. Diese Zellen tragen stabil integriert die viralen Sequenzen *gag*, *pol* und *env*. Das Verpackungssignal Ψ und die LTR-Sequenzen des Wildtyp-Virus wurden eliminiert, um die Produktion replikationskompetenter Viren zu verhindern. Früher wurden Verpackungszelllinien mittels Transfektion hergestellt, wobei neben dem gewünschten Transgen ein Selektionsgen koexprimiert wurde. Da das eingebrachte Transgen dabei nur transient in den Zellen vorlag, mussten die Produzentenzellen unter Selektion gehalten werden, um dauerhaft Viruspartikel mit dem gewünschten Transgen produzieren zu können. Heutzutage können Verpackungszellen auch generiert werden, indem sie mit Virenpartikeln, die das retrovirale Verpackungssignal Ψ , Transkriptions- und Prozessierungselemente sowie das gewünschte Transgen tragen, transduziert werden. Nach der Transduktion kommt es zur reversen Transkription der viralen Vektor-RNA, gefolgt von der stabilen Integration des Provirus in die genomische DNA der Verpackungszelle. Es kommt zur Transkription der proviralen Sequenz und Expression der viralen Proteine (ausgehend von den *gag*-, *pol*- und *env*-Sequenzen) und schließlich zur Entstehung und dauerhaften Sekretion reifer Virenpartikel ins Medium (= retroviraler Überstand) (Abbildung 4). Die auf diese Weise produzierten retroviralen Partikel können Zielzellen einmalig infizieren und dabei das Transgen übertragen, sind aber nicht in der Lage, sich zu replizieren, da die genomische Information für die Verpackungsproteine nicht mit dem retroviralem Partikel übertragen wird (= replikationsinkompetente Viren). Diese infektiösen retroviralen Partikel im Überstand können durch die sog. Titration berechnet werden, indem ein festgelegtes Volumen des Überstandes auf eine bestimmte Zellzahl gegeben wird. Die Berechnung wird anhand der Zellzahl, des Überstandsvolumens und der Transduktionsrate der Zellen ermittelt und ergibt den sog. Titer, die infektiösen Einheiten (IE) pro Milliliter. Der Titer, der von solchen Verpackungszellen produziert wird, ist generell niedrig (10^3 - 10^4 IE/ml). Daher ist es in der Regel notwendig, den Titer durch geeignete Maßnahmen zu erhöhen. Wurde

zum Beispiel ein Zytostatika-Resistenzgen in die Verpackungszelllinie eingebracht, ist es möglich, durch eine Zytostatika-Behandlung den Anteil der transduzierten Zellen in der Verpackungszellpopulation zu erhöhen. Außerdem können aus dem Pool der Produzentenzelllinie einzelne Klone isoliert und Subklone herangezogen werden, die hohe Virustiter produzieren (siehe 2.4.5). Allerdings ist die Herstellung stabiler Produzentenzelllinien mit hohem zeitlichem und materiellem Aufwand verbunden und die Prozedur muss für jedes einzelne Konstrukt wiederholt werden. Der Vorteil besteht jedoch darin, dass, wenn diese Zelllinie einmal generiert ist, der Aufwand der eigentlichen Virusproduktion sehr gering ist.

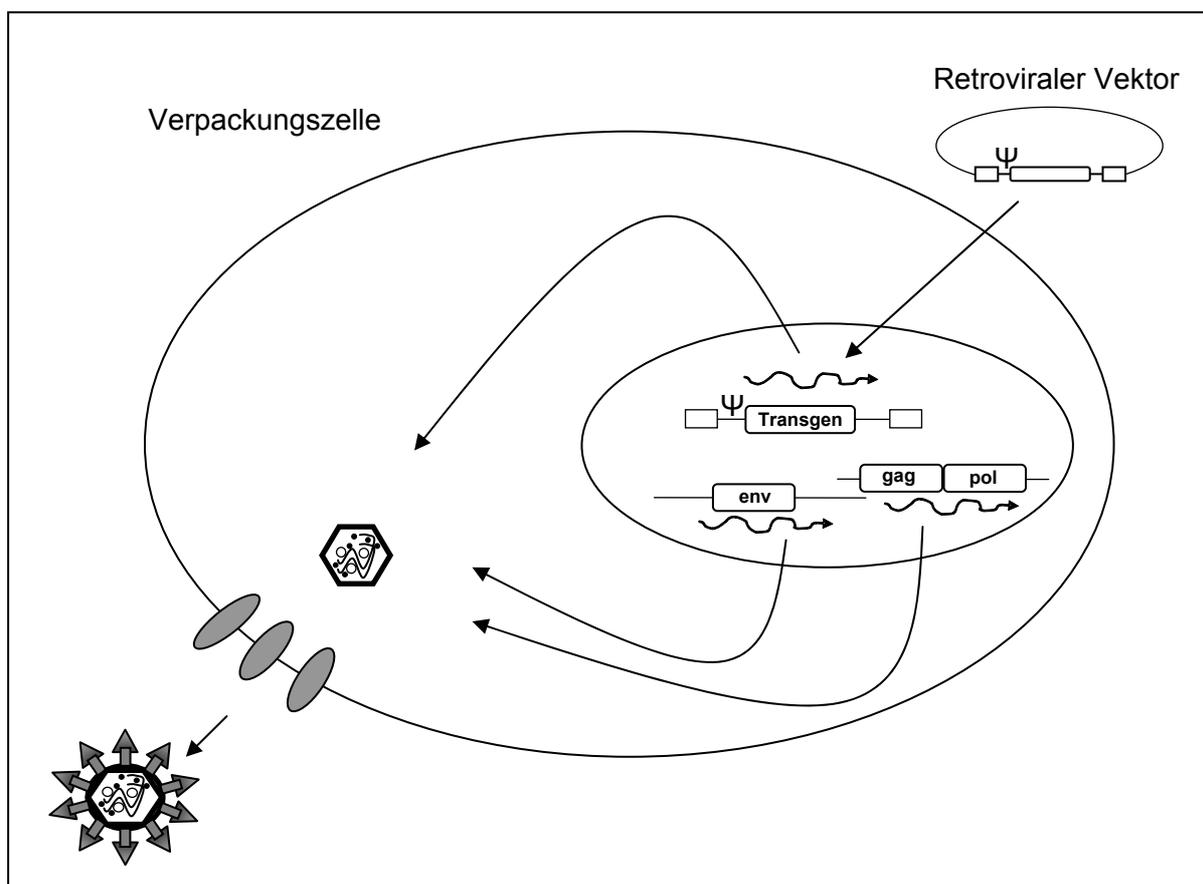


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer stabilen retroviralen Verpackungszelllinie.

Die Gene *gag*, *pol* und *env* sind stabil im Genom der Zelle integriert, aus Sicherheitsgründen häufig in verschiedenen Loci. Das Verpackungssignal Ψ findet sich ausschließlich auf dem zusätzlich transduzierten retroviralen Vektor. Nach Translation der Strukturproteine und Zusammensetzen aller Elemente entsteht ein replikationsdefizientes Viruspartikel, welches das gewünschte Transgen trägt, dem die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* jedoch fehlen.

1.7.2 Transiente Verpackungszelllinien

Eine Möglichkeit, für experimentelle Zwecke einfacher infektiösen Überstand herzustellen, besteht in der Verwendung transienter Verpackungszelllinien, die nur vorübergehend intakte Viruspartikel produzieren. Dieses erstmals von G. Nolan hergestellte System [Pear et al., 1993] basiert ebenfalls auf der 293T-Zelllinie (vgl. Abschnitt 1.7.1). Die retroviralen Strukturgene (*gag*, *pol*) sind stabil in das Genom der 293T-Zelle integriert. Der retrovirale Vektor wird in Form eines Plasmids mit Hilfe der transienten Transfektion in die Verpackungszelle eingeschleust. Da das Plasmid nicht stabil in die genomische DNA der Verpackungszelllinie integriert, findet eine Virusproduktion nur vorübergehend statt. In diesem System kann auch das *env*-Gen, das die Wirtsspezifität des reifen Viruspartikels bestimmt, gleichzeitig mit dem retroviralen Vektor transfiziert werden. Hochtitrige transiente Verpackungszelllinien, die in Weiterentwicklung dieses Systems für die Transduktion humaner bzw. muriner Zielzellen weit verbreitet sind, sind die amphotropen und ekotropen FNX-Zelllinien [Grignani et al., 1998], bei denen das *env*-Gen (*ampho* oder *eco*) ebenfalls stabil in das Genom der FNX-Zelllinie integriert ist.

1.8 Ziel der Arbeit

Die kongenitale, β c-defiziente Pulmonale Alveolarproteinose ist eine schwere Lungenerkrankung im Kleinkindalter, für die zurzeit nur eine Lungentransplantation als potentiell kurative Behandlungsoption offen steht. Diese Operation ist allerdings bei den schwerstkranken Kleinkindern nur selten möglich. Der Gentransfer der defizienten gemeinsamen β -Kette (β c) der Rezeptoren für GM-CSF, IL-3 und IL-5 in hämatopoetische Stammzellen könnte in Zukunft eine weitere Behandlungsmöglichkeit darstellen, um die Funktion der bei dieser Erkrankung defekten Alveolarmakrophagen wieder herzustellen. Diese Hypothese wird durch *In-vivo*-Experimente gestützt: Nach Transplantation von gesunden murinen primären Knochenmarkszellen (KM-Zellen) in $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen wurde eine vollständige Rückbildung des PAP-Phänotyps beobachtet [Cooke et al., 1997; Nishinakamura et al., 1996b]. Aufbauend auf diesen Ergebnissen war es Ziel dieser Arbeit, die Möglichkeit einer Gentherapie der $m\beta c$ -defizienten PAP im Mausmodell zu überprüfen. Hierzu wurden folgende Teilziele formuliert:

- Es sollte im ersten Schritt ein retroviraler Vektor konstruiert werden, der die murine β c-Kette in Kombination mit dem $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ -Selektionsgen exprimieren kann, damit eine gleichzeitige Gentherapie zur Korrektur des Gendefekts mit einer Chemotherapie zur Selektion genetisch korrigierter Zellen ermöglicht wird.
- Für die erfolgreiche retrovirale Transduktion primärer hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen wurden Viruspräparationen mit verlässlich hohen Virustitern benötigt. Es sollte daher eine stabile Produzentenzelllinie erzeugt werden, die einen entsprechenden hochtitrigen virushaltigen Überstand produziert.
- Es sollte in *In-vitro*-Experimenten zum einen gezeigt werden, dass mittels retroviralem Gentransfer der murinen β c-cDNA in $\text{m}\beta$ c-defiziente KM-Zellen eine funktionelle Rekonstitution des Rezeptors erreicht wird und damit die Fähigkeit der genetisch korrigierten Zellen zu einer β c-abhängigen Zytokinantwort rekonstituiert werden kann. Zum anderen sollte geprüft werden, ob sich $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ -transduzierte primäre hämatopoetische $\text{m}\beta$ c-defiziente Zellen mittels Chemotherapie *in vitro* selektieren lassen.
- Vor allem aber sollte erstmalig der Gentransfer von $\text{m}\beta$ c in hämatopoetische Zellen $\text{m}\beta$ c-defizienter Mäuse in einem murinen *In-vivo*-Knochenmarkstransplantationsmodell untersucht werden. Hierbei sollte zum einen der Effekt des Gentransfers auf die Hämatopoese zum anderen und im besonderen Maße aber auf die Lungenpathologie der Tiere evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

BG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	Fluka Biochemica
Cytofix/Cytoperm™-Kit	BD Pharmingen, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Endofree Plasmid Kit	Sigma, Taufkirchen
Ficoll	Serva, Heidelberg
FKS	Life Technologies, Eggenstein
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
High Fidelity PCR-Kit	Roche, Mannheim
MassRuler DNA-Mix, ready to use	Fermentas, Leon-Roth
Methyzellulose	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
N+Nylon-Membran	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Nonidet P-40	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
NuSieve-GTG-Agarose	Cambrex, Verviers, Belgien
PBS	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzym BamHI	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsenzym EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsenzym SalI	New England Biolabs, Frankfurt
Retronektin®	TaKaRa, Otsu, Japan
Taq DNA-Polymerase	GeneCraft, Lüdighausen
TMZ	Schering Plough Research Institute, Madison, NJ, USA
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA

Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System	Promega, Mannheim
X-OMAT-AR-Film	Kodak, Stuttgart
Zelldissoziationspuffer	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA

Alle Chemikalien wurden in p.a.-Qualität verwendet.

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (High Glucose)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IMDM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.3 Antikörper

Anti-mouse IL-3R β subunit (AIC2B), Klone HB	MoBiTec, Göttingen
Mouse anti-MGMT mAK (Klon MT3.1)	Chemicon, Hampshire, United Kingdom
PE-konjugierter goat anti-mouse Ig-spezifischer pAK	BD Pharmingen, Heidelberg
PE-konjugierter mAK CD3 ϵ (500A2)	BD Pharmingen, Heidelberg
PE-konjugierter mAK CD45/B220 (RA3-6B2)	BD Pharmingen, Heidelberg
PE-konjugierter mAK GR-1 (RB6-8C5)	BD Pharmingen, Heidelberg
PE-konjugierter mAK rabbit Anti-hamster IgG(H+L)	Biozol, Eching

2.1.4 Wachstumsfaktoren

EPO (rh)	Boehringer, Mannheim
G-CSF (rh)	Neupogen® 30, AMGEN, Thousand Oaks, CA, USA
GM-CSF (rm)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
IL-3 (rm)	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
IL-6 (rh)	Sandoz, Basel, Schweiz
SCF (rm)	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA

2.1.5 Puffer und weitere Lösungen

50-fach TAE-Puffer	242 g/l Tris 57,1 ml/l Eisessig 50 mM EDTA pH 8,5
BG-Injektionslösung (25 mg/kg)	40% Polyethylenglykol 400 60% PBS, v/v
Church-Puffer (Hybridisierungspuffer)	500 mM Tris pH 7,5 7% SDS
Ethidiumbromid	1 µg/ml in 1x TAE-Puffer
Gelatine-Lösung	0,1% Gelatine in PBS
Higuchi-Puffer	1 M KCl 1 M Tris/HCl pH 8,3 1 M MgCl ₂ 0,1% Gelatine 0,45% Nonidet P-40 0,45% Tween 20
IMDM/Methylzellulose	2,1% Methylzellulose in IMDM

SSC (20-fach)	175,3 g/l NaCl 88,2 g/l Na ₃ -Citrat * 2 H ₂ O pH 7,0
TMZ-Injektionslösung (70 mg/kg)	10% DMSO 90% Saline, v/v
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05% Trypsin 0,53 mM EDTA in PBS
Waschpuffer für die Filterhybridisierung	40 mM Natriumphosphat 1% SDS

2.1.6 Geräte

ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Sequenzierer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Blutbilddifferenzierer VetABC	scil animal care company, Viernheim
CO ₂ -Inkubator NU 2700 E	NUAIRE, Plymouth, USA
DNA Engine MJ Research PTC-200 Thermocycler	Biozym, Hess. Oldendorf
Durchflusszytometer EPICS XL	Coulter Electronics, Krefeld
Gammacell 1000 Elite MDS (Bestrahlungsgerät)	Nordion, Fleurus, Belgien
Gefrierschrank -80°C, ULT 2186-7-Ultima 12	REVCO, Asheville, NC, USA
Gilson-Pipetten	Villers-le-Bel, Frankreich
Knick pH-Meter 761, Calimatic	Ingold Messtechnik, Steinbach
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Rochester, NY, USA
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Nikon Eclipse E600-Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Phasenkontrastinversionsmikroskop CK2	Olympus Optical Co., Hamburg
pipetus-akku, P 990 7001/0294	Hirschmann, Eberstadt
pipetus-standard, P990 30 01	Hirschmann, Eberstadt

Präzisionswaage AE120	Bosch, Jungingen
Sicherheitswerkbank NU4400-400E	NUAIRE, Plymouth, USA
Sicherheitswerkbank NU4400-600E	NUAIRE, Plymouth, USA
Vortexer L46	GLW, Würzburg
Wasserbad TWB 22	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge EBA 12 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge GS-6R	Beckman Instruments, München
Zentrifuge J2-21	Beckman Instruments, München
Zentrifuge TJ-6	Beckman Instruments, München

2.1.7 Bakterien, primäre Zellen, Zelllinien und Tiere

293T	ATCC, Manassas, VA, USA
E. coli DH5 α	Invitrogen, Karlsruhe
FNX-eco	ATCC, Manassas, VA, USA
FNX-RD114	ATCC, Manassas, VA, USA
GP+E86 CI29	Dr. S. Ragg, Riley Hospital, Indianapolis, IN, USA
HT1080	ATCC, Manassas, VA, USA
m β c-defiziente (m β c ^{-/-}) Mäuse	Uta Dirksen, Münster
NIH-3T3	ATCC, Manassas, VA, USA
Wildtypmäuse (C57Bl/6J-)	Harlan, Borchon

2.1.8 Retrovirale Vektoren

Für die Expression der gemeinsamen murinen beta-Kette (m β c) der GM-CSF-/IL-3-/IL-5-Rezeptoren wurde der Vektor SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K} kloniert (Abbildung 5), der die cDNA des m β c-Gens sowie die der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Mutante (MGMT^{P140K}) enthält, welche an der Codonposition 140 einen Lysin- statt eines Prolinrestes besitzt. In Kombination mit der m β c-cDNA wird MGMT^{P140K} als Reportergen über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) koexprimiert. Als Kontrolle diente der Vektor SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}, der

anstelle der m β c-cDNA die EGFP-cDNA beinhaltet. Beide Vektoren (Abbildung 5) basieren auf einem SFFV/MESV-Hybridvektor [Baum et al., 1995; Hildinger et al., 1999], der für die Expression in hämatopoetischen Zellen optimiert wurde.

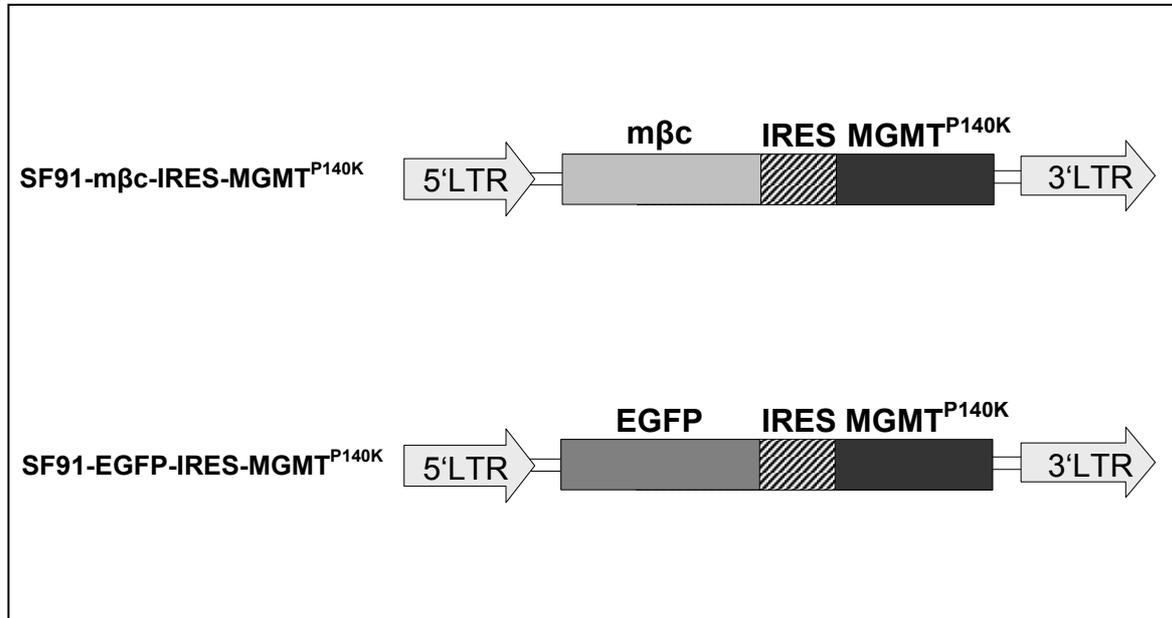


Abbildung 5: Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren.

Die Hybridvektoren des Spleen Focus Forming Virus (SFFV)/Murine Embryonic Stem Cell Virus (MESV) enthalten entweder die cDNA für die murine gemeinsame β -Kette (m β c) der GM-CSF-/IL-3-/IL-5-Rezeptoren oder die cDNA für das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) in Kombination mit der cDNA die für die Mutante der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT^{P140K}) kodiert. Die Expression wird über die Promotor- und Enhancer-Elemente des Hybridvektors reguliert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierung des retroviralen Vektors SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}

Zunächst wurde der offene Leserahmen der murinen β c-cDNA mittels PCR von einem intermediären Konstrukt (#68pCRmbc; von Dr. Bury, Münster, zur Verfügung gestellt), das auf dem pME18AIC2B Vektor beruht [Kitamura et al., 1991], mit dem High Fidelity PCR-Kit (Roche, Mannheim) amplifiziert, wobei ein 5'-Primer mit einer EcoRI-Schnittstelle (CCG GAA TTC CGG ATG GAC CAG CAA ATG GCA CTC AC) und ein 3'-Primer mit einer SalI-Schnittstelle (CCT TGT CGA CTC AGC ACA CCT TCC CAG ACT GGC) verwendet wurde. Für die Amplifikation der m β c-cDNA wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt: 5 min bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen je 40 sec bei 94°C, 40 sec bei 58°C und 2,5 min bei 72°C. Die Größe des PCR-Fragments

wurde anschließend durch Gelelektrophorese bestimmt, wobei ein m β c-Fragment der Größe von 2700 bp erwartet wurde. Das PCR-Produkt wurde mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up-System (Promega, Mannheim) aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI 2 h bei 37°C verdaut. Der Verdau des DNA-Fragments wurde anschließend erneut auf einem Agarosegel aufgetrennt, mit dem Clean-up System aufgereinigt und schließlich in den retroviralen Vektor pSF91-OGG-6-IRES-MGMT^{P140K}, der auf dem pSF91.1-kozak-OGG-6-Plasmid beruht [Kobune et al., 2001] und bei dem zuvor die OGG-6-cDNA über die EcoRI/SalI-Schnittstellen entfernt wurde, ligiert. Dazu wurde das Vektor-Insert-Verhältnis von 1:2 unter Verwendung von 2x Ligationspuffer und T4-Ligase (Promega) für 15 min bei RT und anschließender Inkubation für 10 min bei 70°C gewählt. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch eine Sequenzanalyse der gesamten Kassette zwischen der 5'- und 3'-LTR (Sequenzierungsservice des Universitätsklinikums Essen) bestätigt.

2.2.2 Transformation kompetenter E. coli-Bakterien des Stammes DH5 α

Für die Präparation von Plasmid-DNA der retroviralen Vektoren wurden E. coli-Zellen des Stammes DH5 α verwendet. Dazu wurden 50 μ l Bakteriensuspension mit 5 ng DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschock bei 37°C und anschließender Kühlung auf Eis wurden 950 μ l LB-Medium zu den Zellen gegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C mit 225 U/min geschüttelt. Je 50 μ l und 100 μ l der Bakteriensuspension wurden danach auf LB-Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den Platten wurden einzelne Kolonien gepickt und Übernachtskulturen (4 ml LB-Medium für Mini-Präparationen bzw. 250 ml LB-Medium für Maxi-Präparationen mit jeweils 100 μ g/ml Ampicillin) für eine anschließende Plasmidpräparation angelegt.

2.2.3 Plasmidpräparation aus Bakterien

Die präparative Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde mit dem „Endofree Plasmid Kit“ der Firma Sigma nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst und spektrophotometrisch quantifiziert. Aliquots der

Plasmid-DNA wurden mittels eines analytischen Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese kontrolliert.

2.2.4 DNA Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese [Ausubel et al., 1996] wurde für die Analyse von verdauter Plasmid-DNA, die Kontrolle von PCR-Produkten sowie für die Einzelkolonie-PCRs (siehe 2.2.6) durchgeführt. Dabei wurde 1 µg DNA in 1,0 - 1,5%igen Agarosegelen bzw. 10 µl PCR-Ansatz in 1,0 - 4,0%igen NuSieve-GTG-Agarose Gelen (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien), hergestellt mit 1x TAE-Puffer und abhängig von der erwarteten Fragmentgröße, aufgetrennt. Nach dem Gellauf bei einer Spannung von 100 Volt für 1 h wurde das Gel für 10 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert, anschließend in H₂O gewaschen und unter UV-Belichtung und Verwendung eines Orangefilters auf Polaroidfilm Typ 667 ISO3000/DIN36 fotografiert.

2.2.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml [Sambrook et al., 1989]. Zusätzlich wurde die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, damit aus dem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ die Proteinkontamination der Lösung abgeschätzt werden konnte. Es wurde ausschließlich DNA mit einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis zwischen 1,7 und 1,9 verwendet.

2.2.6 Einzelkolonie-PCR

Einzelne Zellkolonien wurden von klonogenen Methylzellulosekulturen in 1 ml PBS überführt, 5 min bei 8000 U/min zentrifugiert und in 100 µl Higuchi-Puffer [Higuchi, 1989] mit 0,6 µl 10 mg/ml Proteinase K resuspendiert. Die Zellysate wurden für 1 h bei 56°C inkubiert, gefolgt von der Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei

95°C. Die Lysate wurden bis zur PCR bei -20°C gelagert. 25 µl des Lysats wurden in einem 50 µl Reaktionsansatz bestehend aus je 20 pmol der spezifischen Primer für die MGMT-cDNA (5'-Primer: CGC CAT GAG AGG CAA TCC; 3'-Primer: CTG CTG CAG ACC ACT CTG) oder der Primer für die genomische murine beta-Aktin (5'-Primer: AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC; 3'-Primer: CTT CTG CAT CCT GTC AGC AA), 1 U Taq DNA-Polymerase, 0,2 mM dNTPs mit Higuchi-Puffer auf 50 µl aufgefüllt und in die PCR eingesetzt. Für die Amplifikation der MGMT-cDNA wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt: 2 min bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen je 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 57°C und 30 sec bei 72°C. Für die Amplifikation genomischer beta-Aktin-Sequenzen wurde der Zyklus auf 5 min bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen je 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 62°C und 30 sec bei 72°C eingestellt. Die Größe der PCR-Fragmente wurde anschließend durch Gelelektrophorese bestimmt, wobei ein MGMT-Fragment von 60 bp und ein beta-Aktin-Fragment von 650 bp erwartet wurde.

2.2.7 Southern Blot

Für den Nachweis der MGMT-cDNA wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend über Nacht auf N+Membranen geblottet [Southern, 1975]. Als Transferpuffer diente 0,4 N NaOH. Nach dem Transfer der DNA auf Nylonmembranen wurden diese in 2x SSC neutralisiert, getrocknet und bis zur Hybridisierung, in Folie verpackt, dunkel gelagert.

2.2.8 Radioaktive Hybridisierung der Blot-Membran

Die Southern Blots wurden mit einer kommerziell hergestellten, spezifischen ³²P-markierten internen 24-mer-Sonde (TGT CAA GAT CCT CAT CCC GTG CCA), die an eine Sequenz bindet, die sich zwischen den beiden MGMT-Primern befindet, hybridisiert. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte mit 10 ml Church-Puffer bei 65°C für 2 h gefolgt von der Hybridisierung mit frischem Church-Puffer und 2 x 10⁶ cpm/ml Sonde (gelöst in Church-Puffer) bei 65°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 15 min bei 65°C im Waschpuffer gewaschen, getrocknet und bei -80°C für 1 - 3 Tage exponiert. Als Negativkontrolle diente die DNA von nicht-transduzierten klonogenen Zellen.

2.3 Zellbiologische Standardmethoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Sämtliche Lösungen und Plastikwaren waren entweder herstellerseitig steril oder wurden durch entsprechende Methoden (Autoklavieren, Sterilfiltration) vor der Benutzung sterilisiert.

2.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten primären Zellen und Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit entsprechendem Kulturmedium bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Adhärente Zellen wurden regelmäßig alle 2 bis 3 Tage oder spätestens beim Erreichen der Konfluenz in eine neue Kulturflasche überführt. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 3 - 5 ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von 0,5 - 1,5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung konnten die Zellen nach einigen Minuten Inkubation bei RT vom Gefäßboden abgelöst werden. Der tryptische Verdau wurde durch die Zugabe von Medium mit 10 - 20% FKS gestoppt. Ein Aliquot, typischerweise 1/3 bis 1/20 der Zellen, wurde nach Resuspendierung in eine neue, mit Gelatine beschichtete Kulturflasche mit frischem Kulturmedium überführt. Zur Beschichtung mit Gelatine wurde der Boden des Kulturgefäßes mit 5 ml einer 0,2%igen Gelatine/PBS Lösung bedeckt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend abgesaugt.

2.3.2 Kryokulturen

Um Zellen dauerhaft zu lagern, wurden sie in Medium mit 45% FKS und 10% DMSO in einer Dichte von 3 - 5 x 10⁶/ml suspendiert und in 1 ml-Aliquots in einem Einfrierbehälter auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Kryokulturen in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen einer Kryokultur erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die Zellsuspension wurde sofort nach dem Auftauen mit 5 ml FKS versetzt und 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 5 - 10 ml

des dem Zelltyp entsprechenden Kulturmediums resuspendiert, in eine T25- oder eine T75-Zellkulturflasche überführt und kultiviert.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können Zellcharakteristika wie Zellgröße, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Die Zellen werden durch einen Flüssigkeitsstrom geleitet, der es erlaubt, diese Parameter von jeder einzelnen Zelle zu erfassen. Hierfür passieren die Zellen einen Argon-Laserstrahl, der zum einen durch die Zellen gestreut wird und so die Werte für die Zellgröße und Granularität liefert und zum anderen die in/auf den Zellen vorhandenen Fluorochrome (wie z. B. Fluoreszein und EGFP) anregt, was zur Emission von Fluoreszenz-charakteristischer Wellenlänge führt. Diese Fluoreszenz wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und dokumentiert. Zur Analyse wurde das Durchflusszytometer Epics XL der Firma Coulter verwendet. Bei jeder Messung wurden die jeweiligen nicht-transduzierten Ausgangszelllinien als Negativkontrolle benutzt. Eine Messung umfasste 10 000 - 30 000 detektierte Ereignisse. EGFP wurde im Kanal FL1, und PE-konjugierte Antikörper im Kanal FL2 gemessen.

2.3.4 Antikörperfärbung

Zur Anfärbung der murinen β c-Kette auf der Zelloberfläche wurden die Zellen (in 200 μ l FACS-Puffer) mit 5 μ l eines Anti-mouse IL-3R β subunit (AIC2B) monoklonalen Antikörpers (mAK) und danach mit 5 μ l eines sekundären PE-konjugierten rabbit anti-hamster IgG(H+L) mAK für je 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Für die Analyse der MGMT-Expression wurden die Zellen in 2 ml PBS gewaschen und mit dem BD Cytotfix/CytopermTM-Kit (BD Pharmingen) nach Herstellerangaben permeabilisiert. Die Antikörperfärbung wurde mit 0,25 μ l eines mouse Anti-MGMT mAK und 2,5 μ l eines PE-konjugierten goat Anti-mouse Ig-spezifischen polyklonalen Antikörpers (pAK) für je 30 min bei 4°C im Dunkeln durchgeführt. Nach den Färbungen für m β c und MGMT wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und im Fall der m β c-Färbung anschließend mit 3,8 %igem Formalin in PBS für 30 min fixiert. Die Proben wurden erneut gewaschen, anschließend in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und

am Durchflusszytometer analysiert. Für die Analyse der Granulozyten und Lymphozyten des peripheren Blutes von Mäusen aus den Transplantationsexperimenten wurden die Proben mit einem granulozytenspezifischen, PE-konjugierten α -GR-1 mAK bzw. mit den lymphozytenspezifischen mAK α -B220 PE (B-Zellen) und dem α -CD3e PE mAK (T-Zellen) gefärbt. Hierzu wurden zur Lyse der Erythrozyten je 50 μ l heparinisiertes Blut mit 2 ml PharMLyse-Puffer für 5 min auf Eis inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 μ l FACS-Puffer mit je 2 μ l des entsprechenden Antikörpers aufgenommen, für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, mit 3,8%igem Formaldehyd für 30 min fixiert und schließlich in 200 μ l FACS-Puffer durchflusszytometrisch analysiert.

2.3.5 Beschichtung der Zellkulturflaschen mit RetroNektin[®]

Murine primäre hämatopoetische Zellen wurden in Kulturgefäßen (NTC, non tissue culture, nicht für die Gewebekultur vorbehandelt) die mit RetroNektin beschichtet worden waren (4 μ g/cm², in PBS, 4°C, über Nacht), transduziert. RetroNektin ist ein rekombinantes Fibronektinfragment mit virus- und zellbindenden Domänen [Moritz et al., 1996] und wird eingesetzt, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Vor der Transduktion wurden die Gefäße einmal mit PBS gewaschen und zur Absättigung noch freier Bindestellen auf den Oberflächen mit PBS/2% BSA für 20 min inkubiert, gefolgt von zwei Waschschritten mit PBS.

2.4 Generierung einer stabilen Produzentenzelllinie zur Produktion hochtitriger Virusüberstände

2.4.1 Transiente CaPO₄-Transfektion von Verpackungszelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl ekotrope als auch RD114-pseudotypisierte Viruspräparationen generiert. Beide retroviralen Präparationen wurden mit Hilfe einer transienten CaPO₄-Transfektion mit 293T- [Dubridge et al., 1987] oder FNX-RD114-Zellen [Neff et al., 2004] generiert. Dazu wurden 5 x 10⁶ Zellen auf einer 10 cm-Gewebekulturplatte in DMEM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml

Streptomycin (P/S) und 20 mM HEPES) ausgesät und am nächsten Tag 8 h bei 37°C mit 5 µg SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}- oder SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Vektor-DNA, 10 µg pHIT60-Plasmid (gag/pol) [Soneoka et al., 1995] und CaPO₄-Transfektionsreagenz plus 25 µM Chloroquin transfiziert. Bei der Transfektion der 293T-Zellen wurde zusätzlich das K73-Plasmid verwendet [Morita et al., 2000], welches das Gen für das ekotrope Hüllprotein enthält. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in Medium plus 10mM Natriumbutyrat für 8 h inkubiert und anschließend wiederum ein Mediumwechsel durchgeführt. Der Virusüberstand wurde dann an den folgenden 2 Tagen im Abstand von 12 h (48h, 60h, 72h nach Transfektion) von den Platten abgenommen, gefiltert (0,45 µm Porengröße) und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Transduktion von FNX-eco-Zellen mit RD114-Überständen

Der generierte RD114-pseudotypisierte retrovirale Überstand wurde für die Transduktion der FNX-eco-Zellen [Kinsella and Nolan, 1996] eingesetzt. Dazu wurden 3×10^4 FNX-eco Zellen je Vertiefung einer 6-Loch-Platte in DMEM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml P/S und 20 mM HEPES) inkubiert und nach 24 h mit 1 ml des Virusüberstandes in Gegenwart von 8 µg/ml Polybrene für 4 h transduziert. Diese Prozedur wurde an 3 aufeinander folgenden Tagen für jeweils 4 h durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 1 - 2 Wochen kultiviert, mittels Durchflusszytometrie auf den Prozentsatz an MGMT^{P140K}- oder mβc-exprimierenden Zellen analysiert und danach für die Überstandsproduktion eingesetzt. Dazu wurden 5×10^6 Zellen in 10-cm-Gewebekulturplatten in DMEM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml P/S und 20 mM HEPES) ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und 24 h und 48 h später konnte der Virusüberstand abgenommen werden. Die Durchführung erfolgte wie bereits oben beschrieben. Der Virusüberstand wurde bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

2.4.3 Anreicherung transduzierter FNX-eco-Zellen mittels Zytostatika

Um den retroviralen Titer der stabilen Produzentenzellen zu erhöhen wurden die transduzierten Zellen mit Hilfe einer Zytostatika-Behandlung mit O⁶-Benzylguanin (BG) und Temozolomid (TMZ, ein bereits zugelassenes Medikament) angereichert. 5×10^6 SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}- bzw. SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte FNX-eco-Zellen wurden je Vertiefung einer 6-Loch-Platte über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zytostatika-Behandlung wobei die Zellen für 1 h in 10 μ M BG und anschließend für 2 h in 775 μ g/ml TMZ (alles bei 37°C und 5% CO₂) inkubiert wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen in Medium gewaschen und expandiert, bis sie zur Überstandsproduktion eingesetzt wurden.

2.4.4 Produktion retroviraler Überstände von stabilen Produzentenzellen

Zur Produktion retroviraler Überstände mittels stabiler Produzentenzelllinien wurden 5×10^6 Produzentenzellen in 10 ml DMEM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml P/S und 20 mM HEPES) pro 10-cm-Platte ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h und 48 h wurde der Überstand abgenommen, filtriert (0,45 μ m Porengröße) und bei -80°C gelagert.

2.4.5 Titration retroviraler Überstände

Die Titer der hergestellten Überstände wurden durch die Expression der m β c- oder der MGMT^{P140K}-cDNA in transduzierten Zielzellen ermittelt. Als Zielzellen für die Titration wurden NIH-3T3 Zellen für ekotrope und HT1080-Zellen für RD114-pseudotypisierte Überstände verwendet. 3×10^4 Zellen wurden je Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und am folgenden Tag, nachdem die Zellzahl pro Vertiefung bestimmt wurde, für 4 h mit je 1 ml zunehmender Verdünnungen (unverdünnt, 1:10 und 1:100) der Virusüberstände zusammen mit 8 μ g/ml Polybrene in Doppelbestimmungen transduziert. Danach wurde das Medium gewechselt, die Zellen für weitere 3 Tage inkubiert und dann die Expression der Transgene durch durchflusszytometrische Analyse bestimmt (siehe 2.3.4). Als Kontrolle wurde gleichzeitig eine Titration mit einem Überstand bekannten Titers durchgeführt. Hierzu wurde für die NIH-3T3-Zellen der ekotrope Überstand von den GP+E86 Cl29-

Produzenten eingesetzt (freundlicherweise von Dr. S. Ragg zur Verfügung gestellt), die MSCV-MGMT^{P140K}-IRES-EGFP-haltige Viren produzieren, und für die HT1080-Zellen die Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV)-pseudotypisierten PG13-Zellen [Miller et al., 1991], die SFβ1-EGFP-haltige Viren produzieren [Bardenheuer et al., 2005], eingesetzt. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Zellteilungsrate von transduzierten und nicht transduzierten Zellen kann mit Hilfe der folgenden Formel auf die zum Zeitpunkt der Transduktion pro ml Überstand enthaltenen infektiösen Einheiten (IE/ml), der sog. Titer, geschlossen werden:

Titer [IE/ml] = Zellzahl (Zeitpunkt der Transduktion) • Anteil transduzierter Zellen • Verdünnungsfaktor

2.5 *In-vitro*-Analysen mit mβc-defizienten primären Zellen

2.5.1 Isolierung muriner KM-Zellen für die anschließende Transduktion

8 - 12 Wochen alte Wildtyp- oder mβc^{-/-}-Spendertiere wurden 72 h vor Knochenentnahme 150 mg/kg Körpergewicht 5'-Fluoruracil intraperitoneal (i.p.) injiziert. Zur Isolierung des Knochenmarks wurden die Tiere durch Genicküberstreckung getötet und Tibia, Femur und Coxa präpariert. Die KM-Zellen wurden durch Spülen der Knochenhöhlen mit IMDM (ohne Zusätze) mittels einer 20 ml-Spritze und einer G28-Kanüle isoliert, durch ein 70 μm Zellsieb filtriert, abzentrifugiert und für 5 min mit PharMLyseTM auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Die mononukleären Zellen wurden resuspendiert und anschließend für 48 h auf NTC-Platten mit einer Zelldichte von 1 - 2 x 10⁷ Zellen/ml in IMDM (20 % FKS, P/S, 2 mM L-Glu) mit 20 ng/ml IL-6 und 20 ng/ml SCF prästimuliert.

2.5.2 Transduktion muriner KM-Zellen

Für die Transduktion der KM-Zellen wurden Retronektin[®]- und BSA-beschichtete 6-Loch-NTC-Platten mit jeweils 2 ml retroviralem Überstand für 30 min bei 37°C vorinkubiert (preloading). Danach wurde der Überstand entfernt und 6 x 10⁶ - 1 x 10⁷ prästimulierte KM-Zellen in 2 ml retroviralem Überstand mit 20 ng/ml IL-6 und 20 ng/ml SCF resuspendiert und für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt. Diese Prozedur wurde am darauf folgenden Tagen wiederholt. 24 h später wurden die Zellen geerntet indem sie zunächst mit eiskaltem PBS abgespült und dann mit Zelldissoziationspuffer (5-10 min) abgelöst wurden. Für den zweiten *In-vivo*-Versuch (Exp. 2) wurde zusätzlich retroviraler Überstand eingesetzt, der mit Medium 1:5 verdünnt wurde.

2.5.3 CFU-C-Assay mit primären murinen KM-Zellen

Der CFU-C-Assay erlaubt die Detektion der klonalen Nachkommenschaft individueller Vorläuferzellen, die sich in der Gesamtheit der $lin^{-}sca-1^{+}ckit^{+}$ -Zellen befinden. Die Zellen werden dazu in einem semisoliden Medium ausgesät, das Zellmigration weitgehend verhindert. Reife hämatopoetische Zellen sterben gewöhnlich in Kultur innerhalb weniger Tage ab. Die Nachkommen von Vorläuferzellen, die sich in diesem Kultursystem weiter teilen können, bilden dagegen Kolonien, die in dem semisoliden Medium unter dem Mikroskop identifiziert werden können. Für den CFU-C-Assay wurden $3 - 20 \times 10^4$ SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}- bzw. SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte oder nicht-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ - oder $1 - 4 \times 10^4$ transduzierte oder nicht-transduzierte Wildtyp-KM-Zellen in 1 ml IMDM mit 0,9% Methylzellulose, 35% FKS und einem der drei folgenden Zytokincocktails in 35 mm-Kulturschalen inkubiert: (a) 20 ng/ml GM-CSF, (b) 10^3 U/ml G-CSF, 6 U/ml EPO und 20 ng/ml SCF oder (c) 10 ng/ml IL-3. Kolonien ab einer Größe von 50 Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 5 - 7 Tagen bei 37°C und 5% CO₂ als CFU-C unter einem Phasenkontrastinversionsmikroskop gezählt.

2.5.4 *In-vitro*-Untersuchungen der GM-CSF-Sensitivität korrigierter $m\beta c^{-/-}$ Zellen

Um die GM-CSF-Sensitivität der $m\beta c$ -transduzierten $m\beta c^{-/-}$ -Zellen zu untersuchen, wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen (0 - 1000 ng/ml) GM-CSF inkubiert.

2.5.5 *In-vitro*-Selektion durch Zytostatika-Behandlung

Für die Untersuchung der Zytostatikaresistenz der CFU-C *in vitro* wurden die KM-Zellen in 10 μM BG für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ und anschließend in zunehmenden Konzentrationen (0 - 800 $\mu\text{g/ml}$) TMZ für 2 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Medium gewaschen und in CFU-C-Assays mit den Zytokinansätzen (a) oder (b) ausgesät (siehe 2.5.3). Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Koloniezahlen von Triplikaten in Abwesenheit von TMZ gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte der Triplikate in Anwesenheit von TMZ wurden relativ dazu in Prozent angegeben.

2.6 *In-vivo*-Analysen im murinen $m\beta c^{-/-}$ -Mausmodell nach Knochenmarkstransplantation

Um den Effekt des $m\beta c$ -Gentransfers in dem hämatopoetischen System der $m\beta c^{-/-}$ -Mäuse *in vivo* zu beobachten wurde ein etabliertes Knochenmarkstransplantations-/Gentransfermodell angewandt [Rattmann et al., 2006]. Das Schema dieses Protokolls ist in Abbildung 16 dargestellt, die einzelnen Schritte werden nachfolgend ausführlich beschrieben.

2.6.1 Transplantation transduzierter KM-Zellen

Vor der Transplantation wurden 10 - 12 Wochen alte weibliche $m\beta c^{-/-}$ -Empfängermäuse einer Ganzkörperbestrahlung mit einer letalen Dosis von 9 Gy (verteilt auf zwei Zyklen, 6 und 3 Gy, im Abstand von 4 Stunden) unterzogen. Anschließend wurden 4×10^6 SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}- oder SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte männliche $m\beta c^{-/-}$ - oder SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte männliche Wildtyp-KM-Zellen in 200 μl IMDM (ohne Zusätze) pro Maus resuspendiert und zur Transplantation in die Schwanzvene der Tiere injiziert.

2.6.2 Zytostatika-Behandlung der Empfängermäuse

Nach der hämatopoetischen Rekonstitution, etwa 24 - 26 Tage nach Transplantation, die anhand von Blutwerten bestimmt wurde, wurden den Empfängertieren über 5 Wochen wöchentlich einmal 25 mg/kg BG gefolgt von, im Abstand von 1 h, 70 mg/kg TMZ i.p. injiziert. Kontrolltiere blieben unbehandelt. Blutwerte der Tiere wurden vor der 1. und 4. sowie nach der letzten Applikation und am Versuchsende bestimmt indem jeweils 30 μ l und 100 μ l peripheres Blut entnommen und ein Blutbild erstellt (VetABC) bzw. der Anteil an transgenen (EGFP+) Zellen durchflusszytometrisch bestimmt wurde (siehe 2.3.4). Die Experimente endeten 3 - 5 Wochen nach der letzten BG/TMZ-Behandlung und Knochenmark und Lungen der Tiere wurden für die weiteren Analysen entnommen.

2.6.3 CFU-C-Assay mit mononukleären Zellen aus murinem

Knochenmark transplanteder Tiere

3 - 20 x 10⁴ KM-Zellen transplanteder und nicht-transplanteder $m\beta c^{-/-}$ und Wildtypmäuse wurden in 1 ml IMDM mit 0,9 % Methylzellulose, 35% FKS und (a) 20 ng/ml GM-CSF oder (b) 10³ U/ml G-CSF, 6 U/ml EPO und 20 ng/ml SCF oder (c) 10 ng/ml IL-3 in 35 mm-Petrischalen ausplattiert und für 5 - 7 Tage inkubiert. Die Auszählung der Kolonien erfolgte unter einem Phasenkontrastinversionsmikroskop.

2.6.4 Analyse der Lungenpathologie

Die Lungen der transplanteden und nicht-transplanteden Mäuse wurden in Medium gewaschen, in pH-stabilisiertem 4%igen Formaldehyd für wenigstens 24 h fixiert und anschließend longitudinal geschnitten. Gewebesektionen wurden in Paraffin eingebettet, auf einem Microtom (3 μ m) geschnitten und einer PAS-Färbung (Periodic acid-Schiff-) unterzogen. Diese Arbeiten wurden von Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die mikroskopische Auswertung (Nikon Eclipse E600-Mikroskop) der Schnitte erfolgte semiquantitativ anhand der PAS-positiven Akkumulationen in den Alveolarräumen: 0 (normale Lunge, weniger als 2% des Alveolarraumes gefüllt mit

PAS-positiven Proteinmaterial), 1 (wenige Abnormitäten, 2 - 10% des Alveolarraumes gefüllt mit PAS-positiven Proteinmaterial), 2 (größere Abnormitäten, 10 - 50% des Alveolarraumes gefüllt mit PAS-positiven Proteinmaterial) und 3 (schwere Lungenpathologie, 50 - 100% des Alveolarraumes gefüllt mit PAS-positiven Proteinmaterial) mit einem Minimum an 1000 ausgezählten Alveoli pro Maus.

2.7 Statistische Analysen

Wenn nicht anders angegeben sind alle dargestellten Daten als Mittelwerte ($n = 2$) oder als Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of Mean, entspricht dem Quotienten aus Standardabweichung und der Wurzel aus n ; $n \geq 3$) angegeben. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS 13.0 für Windows erstellt (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde anhand des Kruskal-Wallis-Tests (Anreicherung der transduzierten Zellen bei unterschiedlichen Zytostatikadosen) oder des Mann-Whitney-U-Tests (Koloniezahlen transduzierter gegenüber nicht-transduzierten Zellen und Koloniezahlen transduzierter Zellen mit und ohne Zytostatika-Behandlung) berechnet, wobei p -Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion des retroviralen Vektors SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}

Im ersten Schritt wurde der für die Therapie vorgesehene retrovirale Vektor kloniert, der die cDNA der therapeutischen murinen β -Kette (m β c) in Kombination mit der cDNA der Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Mutante (MGMT^{P140K}) exprimiert. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 6 dargestellt.

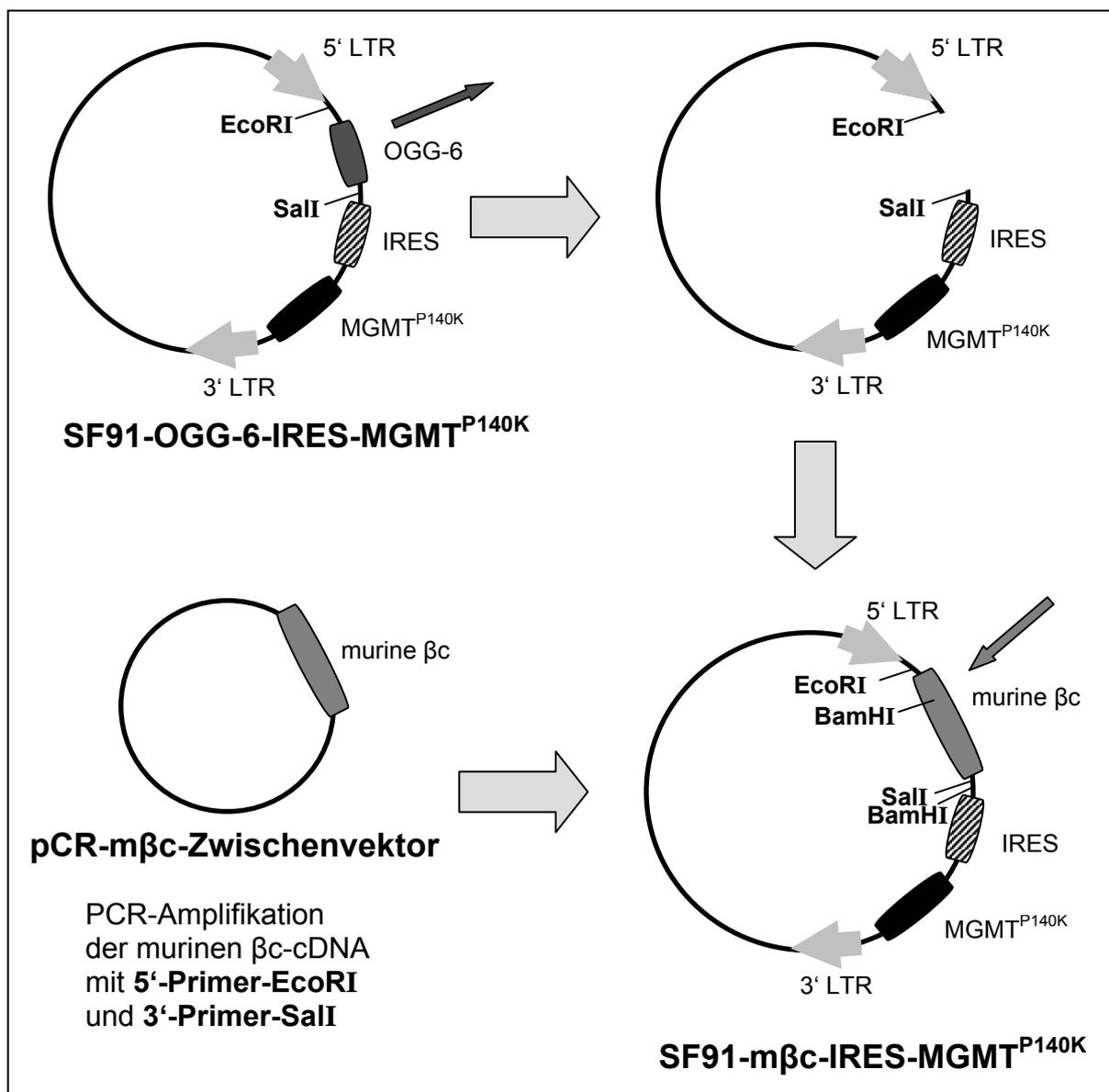


Abbildung 6: Klonierungsstrategie zur Konstruktion des SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-Vektors. Dargestellt ist die Klonierung des SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-Vektors. Im SF91-OGG-6-IRES-MGMT^{P140K}-Vektor wurde die OGG-6-cDNA über die EcoRI-/SalI-Schnittstellen durch das amplifizierte m β c-Insert ersetzt (Erklärung siehe Text).

Dazu wurde zunächst aus dem SF91-OGG-6-IRES-MGMT^{P140K}-Vektor die OGG-6-cDNA über die EcoRI- und SalI-Schnittstellen herausgeschnitten. Die beiden entstandenen Fragmente wurden durch eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und konnten mit der Größe von ca. 6000 bp und ca. 1100 bp dem Vektor (ca. 6000 bp) und dem OGG-6-Insert (ca. 1080 bp) zugeordnet werden. Der linearisierte Vektor von ca. 6000 bp Länge wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Parallel wurde die mβc-cDNA aus einem intermediären Vektorkonstrukt (pCRMβc-Zwischenvektor) mittels PCR unter Verwendung eines 5'-Primers mit einer EcoRI-Schnittstelle und eines 3'-Primers mit einer SalI-Schnittstelle amplifiziert. Die Größe des PCR-Fragments wurde durch Agarosegelelektrophorese bestimmt. Das PCR-Produkt wies die erwartete Größe von 2700 bp auf. Nach dem Aufreinigen wurde das mβc-Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und schließlich erneut aufgereinigt. Das EcoRI-/SalI-geschnittene mβc-Fragment wurde über die EcoRI- und SalI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert. Zur Kontrolle der Ligation und der Orientierung des Inserts im Vektor wurde der klonierte Vektor einem Kontrollverdau mit EcoRI/SalI sowie BamHI unterzogen. Nach Auftrennung der resultierenden Spaltprodukte zeigten sich nach dem EcoRI/SalI-Doppelschnitt zwei Fragmente, wobei das größere von ca. 6000 bp den Vektor und das kleinere von ca. 2700 bp das mβc-Insert darstellte. Somit zeigte sich, dass beide Schnittstellen nach der Klonierung noch vollständig waren. Aus dem BamHI-Verdau gingen zwei Fragmente hervor (6700 bp Vektor, 2000 bp Teil des Inserts), da sich im mβc-Insert, 700 bp vom 5'-Ende entfernt, und direkt am 3'-Ende gelegen, je eine BamHI-Schnittstelle befindet. Diese Analyse wies auf die Präsenz zu erwartender Fragmente von ca. 6700 bp und ca. 2000 bp Größe auf die korrekte Orientierung des mβc-Inserts im Zielvektor hin. Am Ende der Klonierungsarbeiten wurde die Sequenz der gesamten Kasette zwischen der 5'- und 3'-LTR auf die Richtigkeit hin mittels Sequenzierung überprüft. Diese Untersuchung ergab keine Abweichungen von der zu erwartenden Sequenz, so dass der gewünschte Vektor korrekt zur Verfügung stand.

3.2 Herstellung hochtitriger ekotroper Virusüberstände

Eine für therapeutische Zwecke ungenügend niedrige Gentransfereffizienz bei der Transduktion primitiver hämatopoetischer Zellen gehörte lange Zeit zu den Hauptproblemen des Gentransfers mit gamma-Retroviren. Obwohl diese Situation inzwischen deutlich verbessert wurde, existieren nach wie vor häufig Probleme bei der Herstellung von Viruspräparationen mit verlässlich hohen Titern.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb für die Transduktion der murinen hämatopoetischen Zellen mit dem Vektor SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K} und dem Kontrollvektor SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K} hochtitrige, ekotrope, retrovirale Präparationen benötigt, zu deren Herstellung die nächsten Experimente durchgeführt wurden. Zur Herstellung geeigneter stabiler ekotroper Viruspartikel erschien es zum Zwecke einer optimalen Transduktion der FNX-eco-Produzentenzellen sinnvoll, mit Hilfe der transienten Transfektion zunächst RD114-pseudotypisierte Virusüberstände herzustellen, die dann für die spätere stabile Transduktion der FNX-eco-Zellen durch virale Infektion eingesetzt werden konnten, um schließlich geeignete stabile ekotrope Viruspartikel für die Transduktionsexperimente mit primären murinen hämatopoetischen Zellen herzustellen.

3.2.1 Transiente Transfektion von FNX-RD114-Zellen zur Herstellung RD114-pseudotypisierter Viruspräparationen

Um im ersten Schritt RD114-pseudotypisierte Virusüberstände herzustellen, wurden FNX-RD114-Zellen mit Hilfe der transienten Transfektion transfiziert. Die produzierten Überstände zeigten Titer von $3,8 \times 10^2$ IE/ml (Infektiöse Einheiten/ml) für den SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-Vektor und $1,4 \times 10^2$ IE/ml für den SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Vektor (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Generierung einer stabilen polyklonalen FNX-eco Produzentenzelllinie

Die Generierung einer stabilen polyklonalen Produzentenzelllinie mit Hilfe der transienten Transfektion ist eine gebräuchliche Alternative zur Überstandsproduktion.

Eine hierzu vielfach verwendete Zelllinie ist die auf 293T-Zellen basierende FNX-eco-Zelllinie, die *eco/env*- und *gag/pol*-Konstrukte stabil in ihrem Genom integriert trägt. Diese liefern nach Einbringen des retroviralen Vektorkonstruktes mit dem Verpackungssignal Ψ in die Zellen die nötigen Strukturproteine zum Zusammenbau infektiöser Viruspartikel (vgl. Abbildung 4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die transient hergestellten RD114-pseudotypisierten SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}- und SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Viruspräparationen verwendet, um FNX-eco-Zellen zu transduzieren mit dem Ziel, stabile Produzentenzelllinien zu generieren. Hierzu wurden FNX-eco-Zellen dreimal mit den Überständen transduziert. Die Transduktionsraten wurden durchflusszytometrisch über die EGFP-, MGMT- oder m β c-Expression bestimmt und lagen bei 3,8% für den SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}- und 1,4% für den SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Überstand. Weiterhin wurden Kulturüberstände entnommen und die in ihnen enthaltenen Viruspartikel durch Titration infektiöser Einheiten in NIH3T3-Zellen gemessen. Die Titer der mit diesen polyklonalen Produzentenzellen hergestellten Überstände lagen bei 5×10^2 IE/ml für den SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-Überstand und bei 5×10^3 IE/ml für den SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Überstand und damit niedriger, als für den therapeutischen Einsatz wünschenswert war (Abbildung 7A,B).

3.2.3 Selektion der polyklonalen FNX-eco-Produzentenzelllinie durch Zytostatika-Behandlung mit BG/TMZ

Um die Titer zu erhöhen, wurden die polyklonalen Produzentenzellen zunächst für weitere 10 - 20 Tage expandiert und anschließend zur Selektion von Resistenzgen-tragenden Zellen einer Zytostatika-Behandlung unterzogen. Dabei wurden die Zellen für eine Stunde in 10 μ M BG gefolgt von zwei Stunden in 775 μ g/ml TMZ inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen für 10 - 14 Tage expandiert und anschließend zur Überstandsproduktion eingesetzt. Die viralen Überstände wurden vor und nach Zytostatika-Behandlung produziert und unverdünnt sowie in unterschiedlichen Verdünnungsstufen für die Transduktion der NIH3T3-Zellen eingesetzt, um die Titer der hergestellten Überstände zu bestimmen. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen der transduzierten NIH3T3-

Zellen, die zur Bestimmung der Virustiter verwendet wurden. Nach Zytostatika-Behandlung der Produzentenzellen ist deutlich eine Erhöhung der viralen Titer anhand der höheren Transduktionsraten sowohl für den SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Überstand (von 14,6% auf 85,6%) als auch für den SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}-Überstand (von 2,1% auf 59,1%) in NIH3T3-Zellen zu erkennen (Abbildung 7). Anhand der berechneten Titer dieser Überstände zeigte sich, dass die Zytostatika-Behandlung eine 4000-fache Erhöhung des Titers des SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}-Überstandes, von 5×10^2 auf 2×10^6 IE/ml, und eine 400-fache Erhöhung des Titers des SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Überstandes, von 5×10^3 auf 2×10^6 IE/ml bewirkte (Abbildung 8).

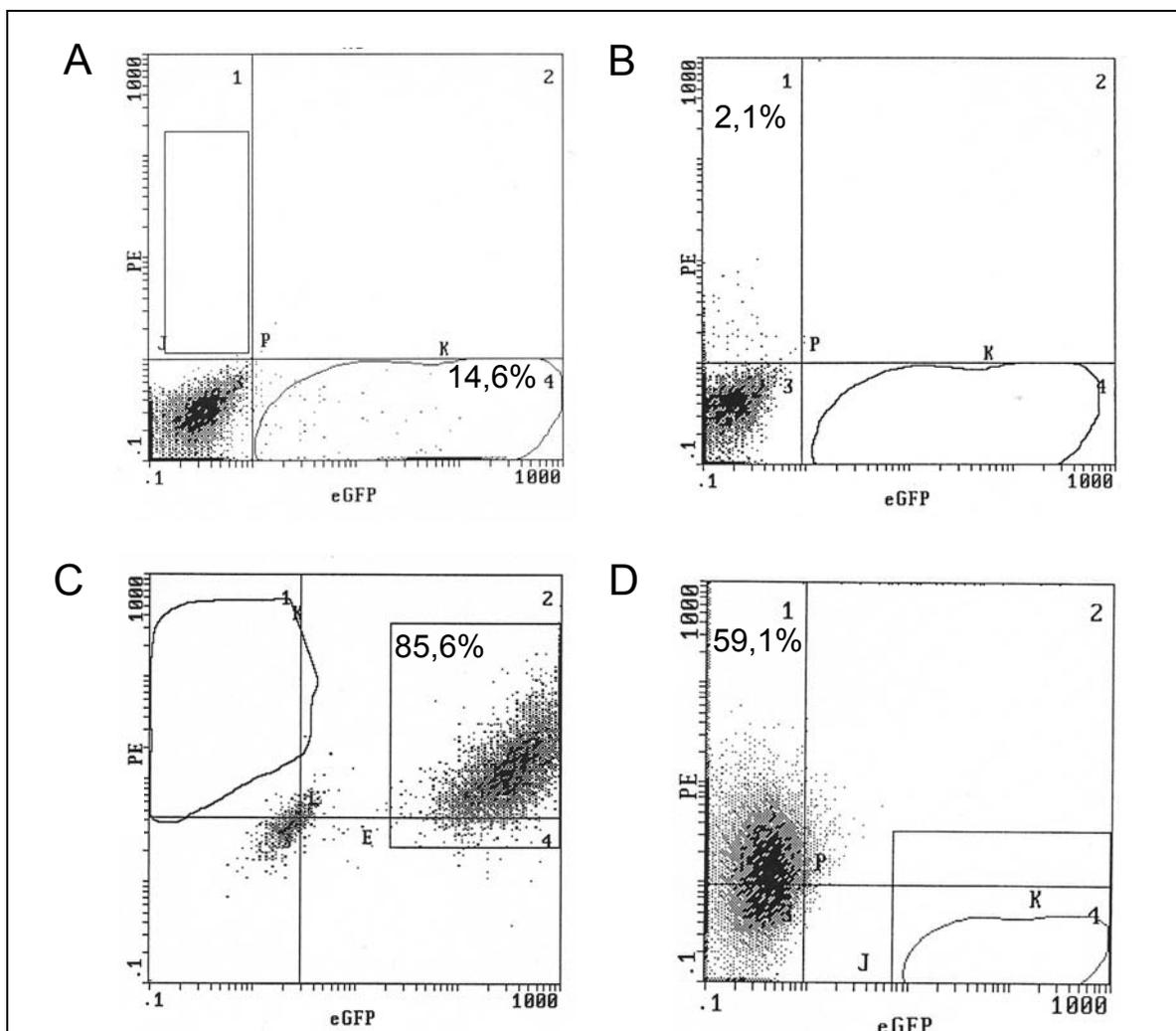


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analyse der Viruspräparationen vor und nach Selektion der Produzentenzellen.

Gezeigt sind transgene Expressionsraten (in %), die in SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}- (A, C) oder SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten (B, D) NIH3T3-Zellen gemessen wurden. Der verwendete Überstand wurde vor (A, B) und nach Selektion der Produzentenzellen (C, D) hergestellt und für die Transduktion der NIH3T3-Zellen verwendet. PE: Messung des PE-konjugierten MGMT-Antikörpers; eGFP: Messung der transgenen EGFP-Expression

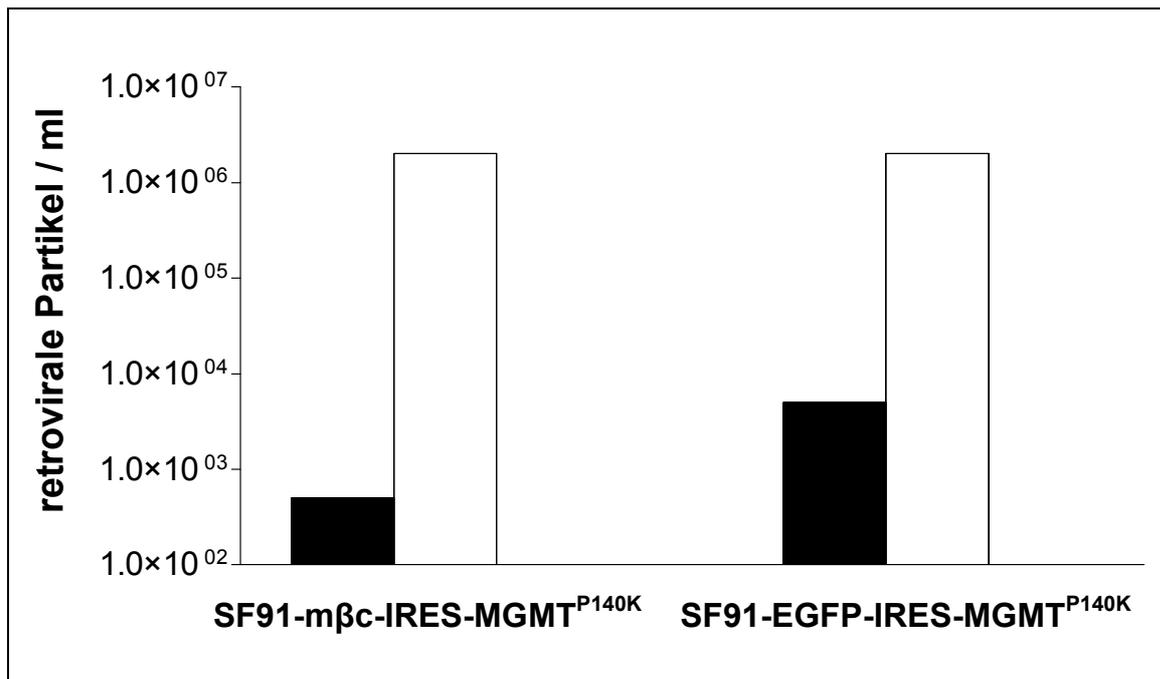


Abbildung 8: Anstieg der retroviralen Titer nach Zytostatika-Behandlung transduzierter FNX-eco-Produzentenzelllinien.

Gezeigt sind die Titer der Überstände der SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}- und SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten FNX-eco-Produzentenzellen vor (schwarze Balken) und nach (weiße Balken) Zytostatika-Behandlung (n = 1).

3.3 *In-vitro*-Untersuchungen zum mβc-Gentransfer in murine βc-defiziente hämatopoetische Vorläuferzellen

Zunächst wurde in *In-vitro*-Experimenten die Fähigkeit des SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}-Vektorkonstruktes untersucht, die mβc-Aktivität in mβc-defizienten (mβc^{-/-}) hämatopoetischen Zellen wieder herzustellen. Dazu wurden KM-Zellen von 5-FU-vorbehandelten mβc^{-/-}- oder Wildtypmäusen isoliert, mit Zytokinen prästimuliert und mittels retroviralem Überstand transduziert. Nach der Transduktion wurden die Zellen in CFU-C-Assays mit oder ohne GM-CSF zur Evaluierung der funktionellen mβc-Expression, gemessen als die Fähigkeit zur GM-CSF-abhängigen Koloniebildung, und mit oder ohne Zytostatika zur Analyse der MGMT^{P140K}-Expression, kultiviert und die Kolonien nach 5 - 7 Tagen ausgezählt (Abbildung 9).

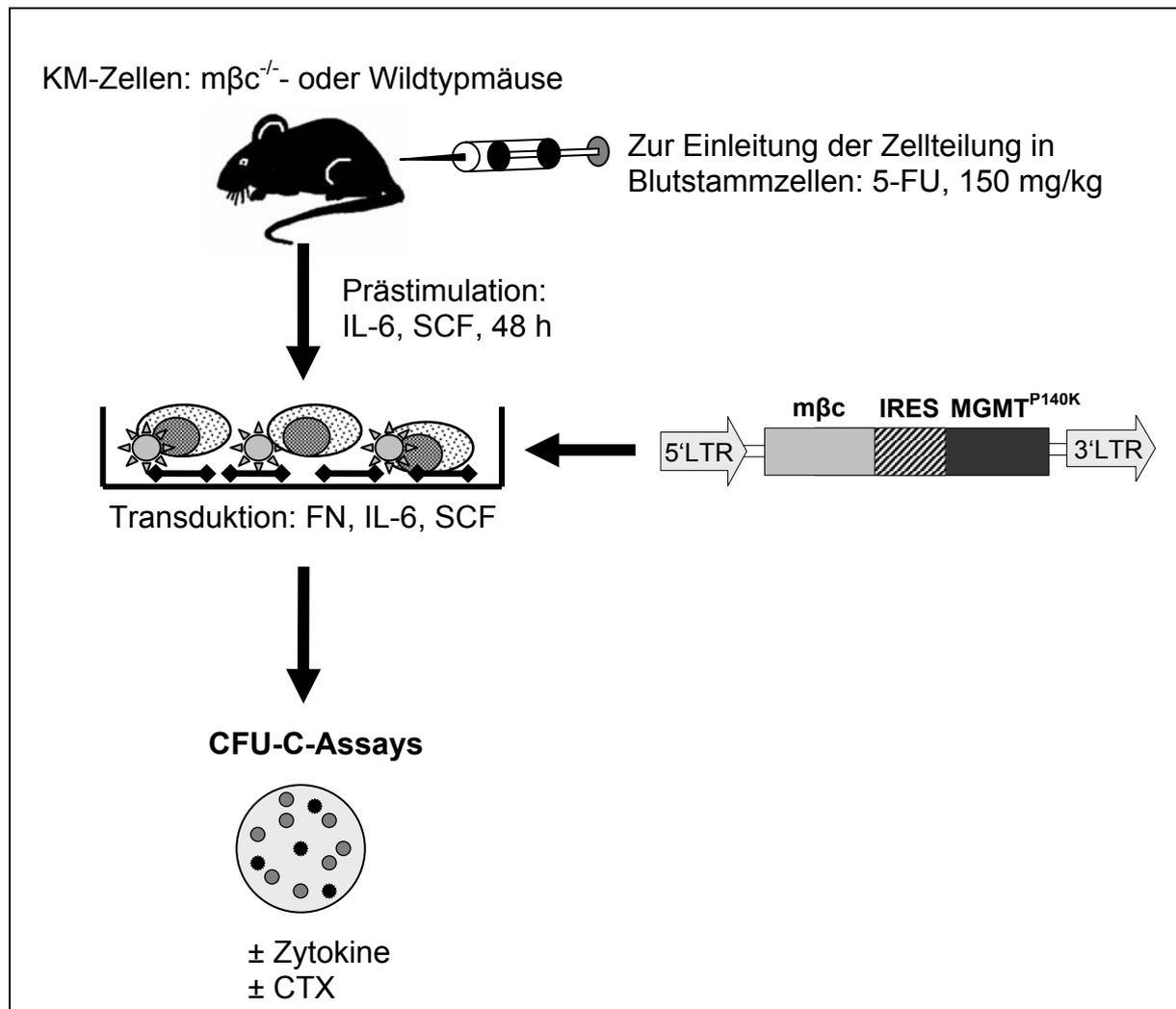


Abbildung 9: Experimentelles Design der *In-vitro*-Versuche.

Das Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten m β c^{-/-}- oder Wildtypmäusen wurde isoliert und mit IL-6 und SCF für 48 h prästimuliert. Die Transduktion mit dem SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K} retroviralen Überstand erfolgte auf Fibronectin-Fragmenten (FN) in Gegenwart von IL-6/SCF. Anschließend wurden die Zellen in CFU-C-Assays mit oder ohne Zytokinen und mit oder ohne Chemotherapeutika (CTX) ausgesät und die Kolonien nach 5 - 7 Tagen ausgezählt.

3.3.1 Evaluierung der funktionellen m β c-Expression nach m β c-Gentransfer

Nach der Transduktion primärer KM-Zellen von m β c^{-/-}- und Wildtypmäusen mit dem SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-Vektor wurden die Zellen in CFU-C-Assays mit verschiedenen Wachstumsfaktoren kultiviert. In insgesamt 11 Experimenten konnte in Gegenwart von GM-CSF allein ein minimales Koloniewachstum in Kulturen mit nicht-transduzierten m β c^{-/-}-Zellen von $1 \pm 0,5$ CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen erfasst werden, während ein statistisch signifikanter Anstieg der Koloniebildung bei SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten m β c^{-/-}-Zellen zu beobachten war (19 ± 5 CFU-

C/1 x 10⁵ KM-Zellen; p < 0,001, Abbildung 10). Dies lässt auf eine funktionelle mβc-Expression des retroviralen Konstruktes schließen. Hingegen zeigte sich in insgesamt 7 Versuchen kein signifikanter Unterschied in der Koloniebildung von transduzierten (132 ± 45 CFU-C/1 x 10⁵ KM-Zellen) und nicht-transduzierten (120 ± 51 CFU-C/1 x 10⁵ KM-Zellen) mβc^{-/-}-KM-Zellen in Kontrollkulturen, denen die βc-unabhängigen Zytokine G-CSF, EPO und SCF zugefügt wurden, was die GM-CSF-Spezifität der wiederhergestellten Zytokinsensitivität belegt. Die Gentransfereffizienz in diesen Experimenten, die anhand des Prozentsatzes der Kolonien in Gegenwart von GM-CSF gegenüber G-CSF/EPO/SCF abgeschätzt wurde, lag im Bereich von 10 - 15% (Kalkulationen wurden wie in Abschnitt 3.4.1.3 beschrieben durchgeführt).

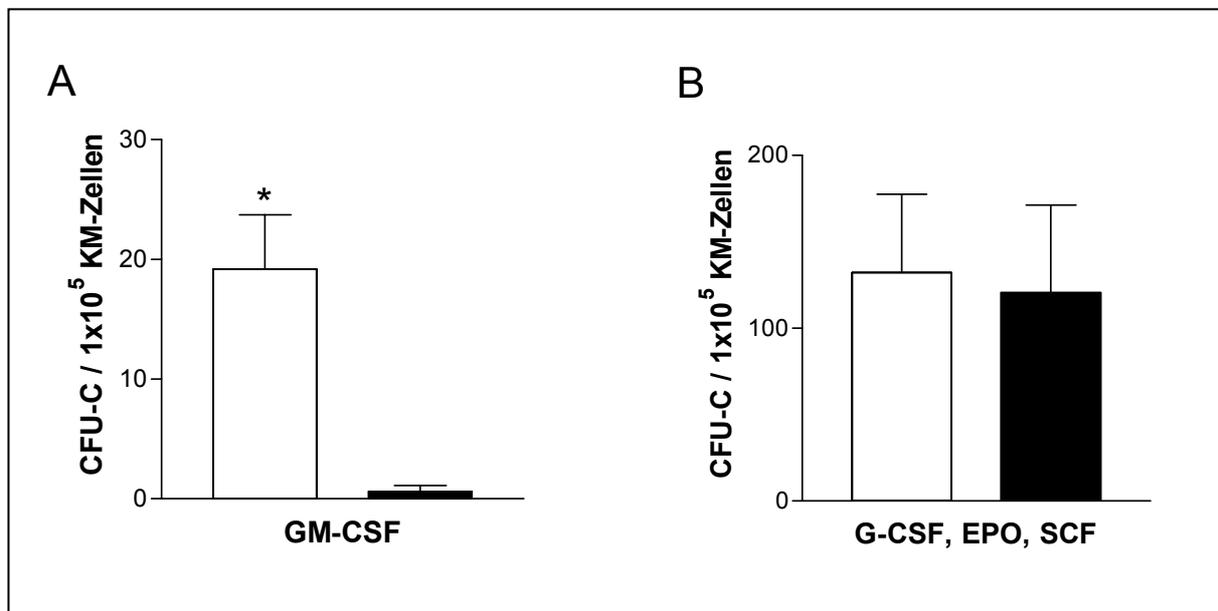


Abbildung 10: Wiederherstellung des GM-CSF-abhängigen Koloniewachstums durch mβc-Gentransfer.

Gezeigt sind die Koloniezahlen (Mittelwerte ± SEM) pro 1 x 10⁵ KM-Zellen, die von SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten (weiße Balken) und nicht-transduzierten (schwarze Balken) mβc^{-/-}-Zellen stammen und in CFU-C-Assays in Gegenwart von (A) GM-CSF alleine (n = 11) oder (B) G-CSF, EPO und SCF (n = 7) gewachsen sind. * signifikanter Unterschied (p < 0,001; Mann-Whitney-U-Test).

Für Wildtypzellen wurde nach Überexpression von mβc kein signifikanter Unterschied in der Koloniebildung beobachtet (Abbildung 11). SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Zellen bildeten 642 ± 79 CFU-C/1 x 10⁵ KM-Zellen und nicht-transduzierte Zellen 711 ± 129 CFU-C/1 x 10⁵ KM-Zellen in Gegenwart von GM-CSF alleine (n = 6). Außerdem zeigten transduzierte Zellen 131 ± 44 CFU-C/1 x 10⁵ KM-Zellen und nicht-transduzierte Zellen 129 ± 34 CFU-C/1 x 10⁵ KM-Zellen nach Stimulation mit G-CSF/EPO/SCF (n = 3). Diese Ergebnisse lassen darauf

schließen, dass die Überexpression der $m\beta c$ -Kette keinen wesentlichen Einfluss auf die Klonogenität der Zellen hat.

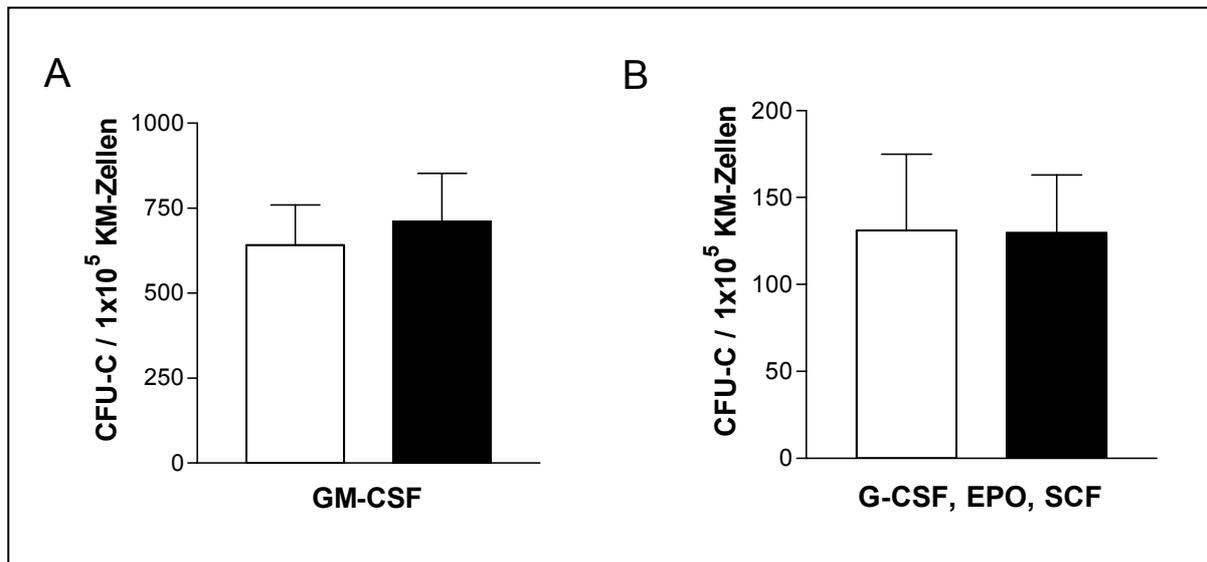


Abbildung 11: Keine Veränderung der Koloniebildung in Wildtypzellen durch den $m\beta c$ -Gentransfer allein.

Gezeigt sind die Koloniezahlen (Mittelwerte \pm SEM) pro 1×10^5 KM-Zellen, die von SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten (weiße Balken) und nicht-transduzierten (schwarze Balken) Wildtypzellen stammen und in CFU-C-Assays in Gegenwart von (A) GM-CSF alleine ($n = 6$) oder (B) G-CSF/EPO/SCF ($n = 3$) gewachsen sind.

3.3.2 Untersuchung der Dosisabhängigkeit der GM-CSF-Sensitivität $m\beta c$ -transduzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen

Nachdem die funktionelle $m\beta c$ -Expression vom SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-Vektor festgestellt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Dosisabhängigkeit der GM-CSF-Sensitivität transduzierter $m\beta c^{-/-}$ -Zellen im CFU-C-Assay untersucht und mit transduzierten und nicht-transduzierten Wildtypzellen verglichen. Hierbei wurde ein ähnliches Sensitivitätsprofil gegenüber GM-CSF für alle drei Populationen beobachtet (Abbildung 12). Das Koloniewachstum begann bei 0,01 - 0,3 ng/ml GM-CSF und erreichte im Bereich von 10 ng/ml GM-CSF ein Plateau. Die geringeren Koloniezahlen transduzierter $m\beta c^{-/-}$ -Zellen, die im Vergleich zu den Wildtypzellen beobachtet wurden, reflektieren die geringen Transduktionsraten dieser Experimente die im Bereich von 10 - 15% lagen. Diese Daten demonstrieren einerseits die Wiederherstellung der GM-CSF-Sensitivität der $m\beta c^{-/-}$ -Zellen nach dem $m\beta c$ -

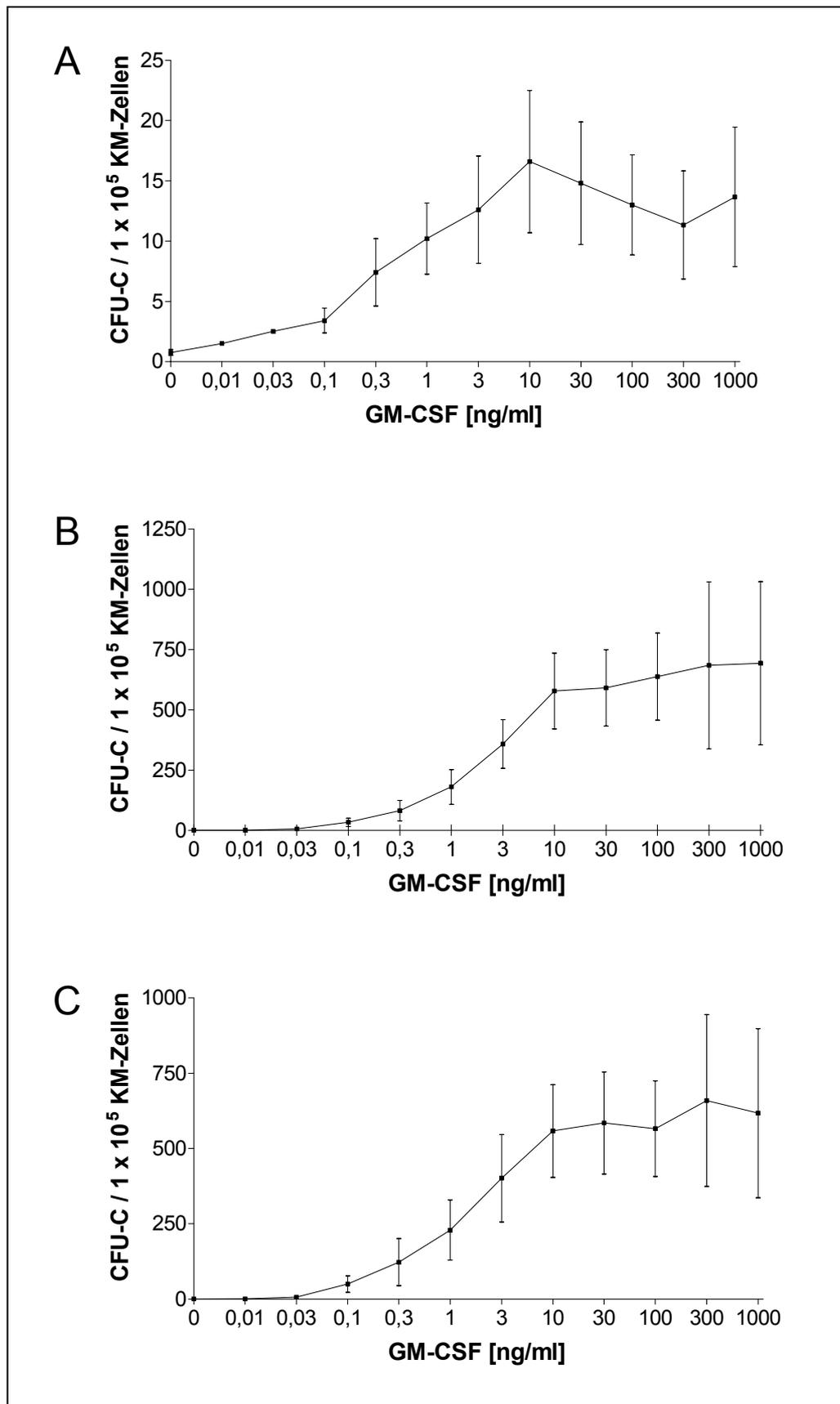


Abbildung 12: GM-CSF-Sensitivitätsprofil von CFU-C nach erfolgtem m β c-Gentransfer.

Gezeigt ist das klonogene Wachstum als Anzahl von CFU-C / 1 x 10⁵ KM-Zellen von (A) SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten m β c^{-/-}-Zellen sowie (B) nicht-transduzierten und (C) SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten Wildtypzellen in Gegenwart ansteigender GM-CSF-Konzentrationen (0 - 1000 ng/ml; n = 5; Konzentrationen 0,01 ng/ml und 0,03 ng/ml n = 2).

Gentransfer und andererseits die unveränderte GM-CSF-Sensitivität der Wildtypzellen nach Überexpression des $m\beta c$ -Gens.

3.3.3 Evaluierung der funktionellen MGMT^{P140K}-Expression nach Transduktion mit dem SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-Vektor

Im nächsten Schritt wurde die funktionelle Expression der MGMT^{P140K}-Mutante vom SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-Vektorkonstrukt untersucht. Dazu wurden SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte und nicht-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ und Wildtypzellen einer kombinierten Behandlung mit 10 μ M BG und ansteigenden Konzentrationen von TMZ (0 - 800 μ g/ml) unterzogen und anschließend in CFU-C-Assays in Gegenwart von GM-CSF (Abbildung 13) oder G-CSF/EPO/SCF kultiviert (Abbildung 14).

Koloniewachstum von transduzierten und nicht-transduzierten Wildtypzellen in Anwesenheit von GM-CSF konnte im Bereich von 0 - 200 μ g/ml TMZ beobachtet werden, wobei sich eine höhere Überlebensrate bei den transduzierten Zellen zeigte (Abbildung 13A). Wenn transduzierte und nicht-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen nach Zytostatika-Behandlung unter diesen Bedingungen kultiviert wurden, konnte ein Koloniewachstum nur von transduzierten Zellen bei 0 - 400 μ g/ml TMZ festgestellt werden, da nicht-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen aufgrund der βc -Defizienz keine GM-CSF-abhängigen Kolonien bilden (Abbildung 13B). Des Weiteren fällt im Vergleich von transduzierten $m\beta c^{-/-}$ -Zellen zu transduzierten Wildtypzellen eine deutlich höhere TMZ-Resistenz des klonogenen Wachstums auf. Diese Beobachtung lässt sich durch die Verwendung von GM-CSF als alleinigen Wachstumsfaktor in den CFU-C-Assays erklären. Da unter diesen Bedingungen nur transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen überleben, reflektieren die Daten der $m\beta c^{-/-}$ -Zellen die TMZ-Resistenz einer vollständig transduzierten Population, wohingegen die Daten der Wildtypzellen eine Population mit nur 10 - 20% transduzierter Zellen repräsentieren.

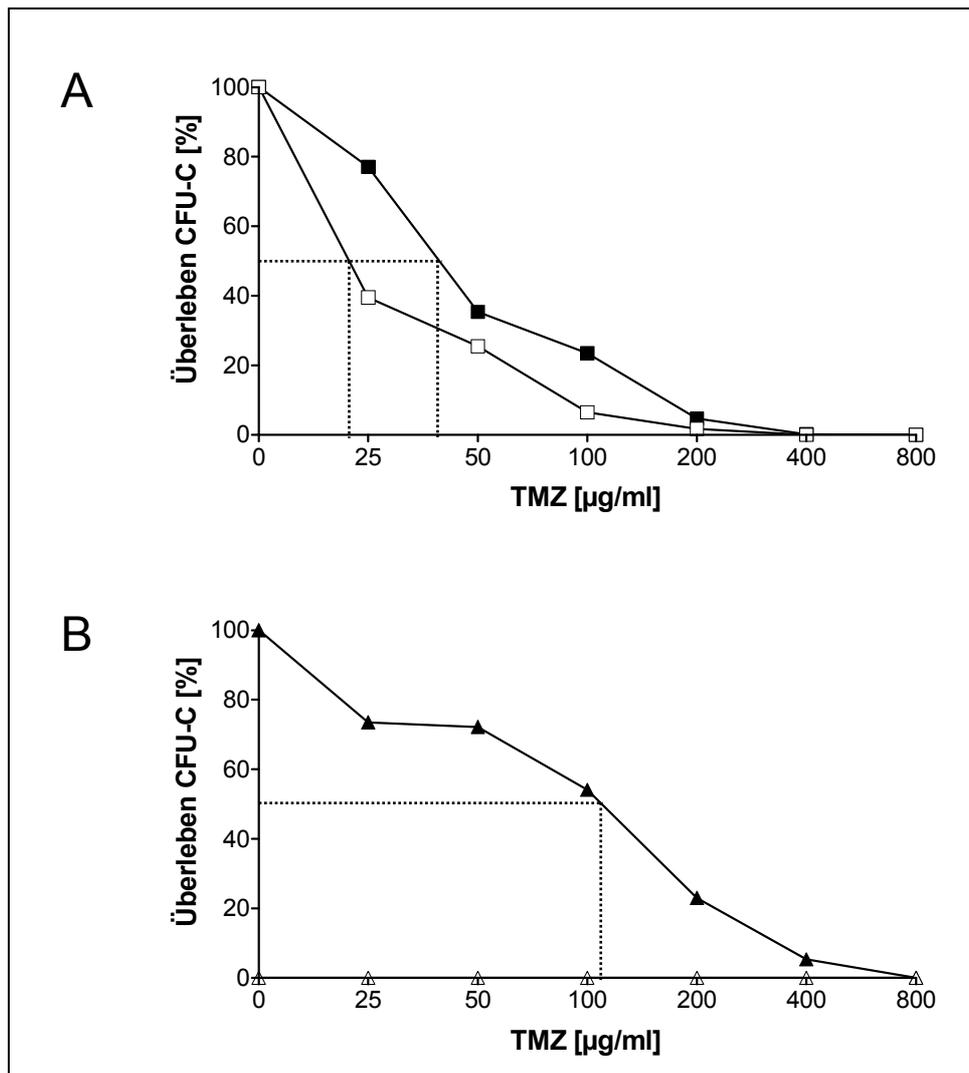


Abbildung 13: Funktionelle Analyse der MGMT^{P140K}-Expression in murinen KM-Zellen in Gegenwart von GM-CSF.

Abgebildet sind die prozentualen Überlebensraten der Kolonien (A) SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierter und nicht-transduzierter Wildtypzellen (schwarze und weiße Quadrate, n = 2) und (B) SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierter und nicht-transduzierter m β c^{-/-}-Zellen (schwarze und weiße Dreiecke, n = 2). Die Zellen wurden 10 μ M BG und ansteigenden TMZ-Konzentrationen (0 - 800 μ g/ml) ausgesetzt und in CFU-C-Assays in Gegenwart von GM-CSF als einzigem Zytokin kultiviert. ---: IC₅₀-Werte für die entsprechenden TMZ-Konzentrationen

Wenn transduzierte und nicht-transduzierte m β c^{-/-}-Zellen nach Zytostatika-Behandlung in CFU-C-Assays in Gegenwart einer β c-unabhängigen Zytokinkombination (G-CSF/EPO/SCF) kultiviert wurden, war ebenfalls ein erhöhtes Überleben transduzierter m β c^{-/-}-Zellen aufgrund der funktionellen MGMT^{P140K}-Expression zu beobachten (Abbildung 14), wobei die Überlebensraten der transduzierten m β c^{-/-}-Zellen weitgehend denen der transduzierten Wildtypzellen bei GM-CSF-Stimulation gleich (vgl. Abbildung 13A).

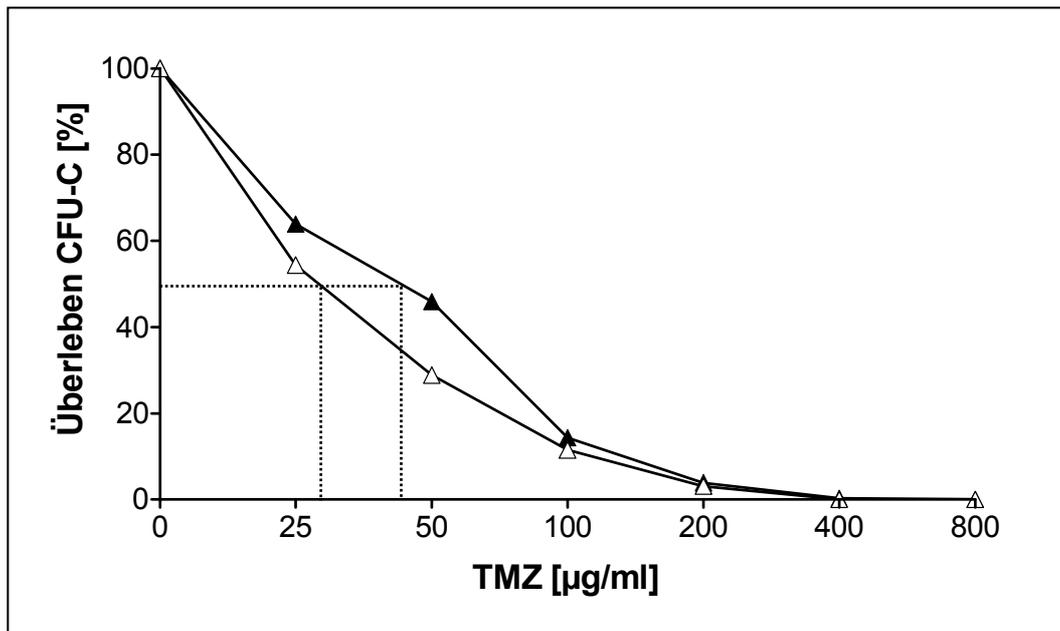


Abbildung 14: Funktionelle Analyse der MGMT^{P140K}-Expression in murinen KM-Zellen in Gegenwart von G-CSF, EPO und SCF.

Abgebildet sind die prozentualen Überlebensraten der Kolonien SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierter (schwarze Dreiecke) und nicht-transduzierter (weiße Dreiecke) m β c^{-/-}-Zellen (n = 2). Die Zellen wurden 10 μ M BG und ansteigenden TMZ-Konzentrationen (0 - 800 μ g/ml) ausgesetzt und in CFU-C-Assays in Gegenwart von G-CSF, EPO und SCF kultiviert. ---: IC₅₀-Werte für die entsprechenden TMZ-Konzentrationen

Die erhöhte TMZ-Resistenz SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierter gegenüber nicht-transduzierter KM-Zellen zeigte sich auch bei der Betrachtung der IC₅₀-Werte, d.h. derjenigen TMZ-Dosis, bei der das Koloniewachstum zu 50% inhibiert wurde. Diese Werte lagen in transduzierten Populationen von Wildtypzellen in Gegenwart von GM-CSF mit 41,1 beim 1,4-fachen der entsprechenden nicht-transduzierten Kontrollpopulationen (20,9) und in vollständig SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten (in GM-CSF-wachsenden) Kolonipopulationen bei ca. 110,3 (n = 2; Abbildung 13). In Gegenwart von G-CSF/EPO/SCF lagen diese Werte in transduzierten Populationen von m β c^{-/-}-Zellen beim 1,5-fachen mit 46,3 gegenüber 31,1 der entsprechenden nicht-transduzierten Kontroll-Population (n = 2, Abbildung 14).

3.3.4 *In-vitro*-Selektion transduzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen

Um das Potential der Selektion genetisch korrigierter Zellen durch Chemotherapie *in vitro* zu untersuchen, wurden transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen 10 μM BG und 0, 50 oder 100 $\mu\text{g/ml}$ TMZ ausgesetzt und dann in CFU-C-Assays mit entweder GM-CSF alleine oder G-CSF/EPO/SCF kultiviert. Mit ansteigenden TMZ-Konzentrationen sank die absolute Zahl der Kolonien für beide Zytokin-Kombinationen (Abbildung 15A): in Gegenwart von GM-CSF wuchsen nach Behandlung mit 50 $\mu\text{g/ml}$ TMZ nur noch $61 \pm 7\%$ und mit 100 $\mu\text{g/ml}$ TMZ $33 \pm 7\%$ der Ausgangskolonien (= Kolonien ohne BG/TMZ-Behandlung). In Gegenwart von G-CSF, EPO und SCF waren es noch $32 \pm 11\%$ Kolonien nach Gabe von 50 $\mu\text{g/ml}$ TMZ und $9 \pm 3\%$ nach Gabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ TMZ.

Die Anreicherung der transduzierten Zellen wurde indirekt ermittelt, indem der Quotient aus den Kolonien in G-CSF/EPO/SCF zu den Kolonien in GM-CSF berechnet wurde. Diese Werte zeigen den Anteil transduzierter Zellen der einzelnen Ansätze und somit die Effizienz der Selektion. So konnte in den Kolonien ein statistisch signifikanter prozentualer Anstieg von $11 \pm 4\%$ ohne Selektion auf $34 \pm 10\%$ ($p = 0,016$) mit 50 $\mu\text{g/ml}$ TMZ und $74 \pm 19\%$ ($p = 0,009$) mit 100 $\mu\text{g/ml}$ TMZ beobachtet werden (Abbildung 15B).

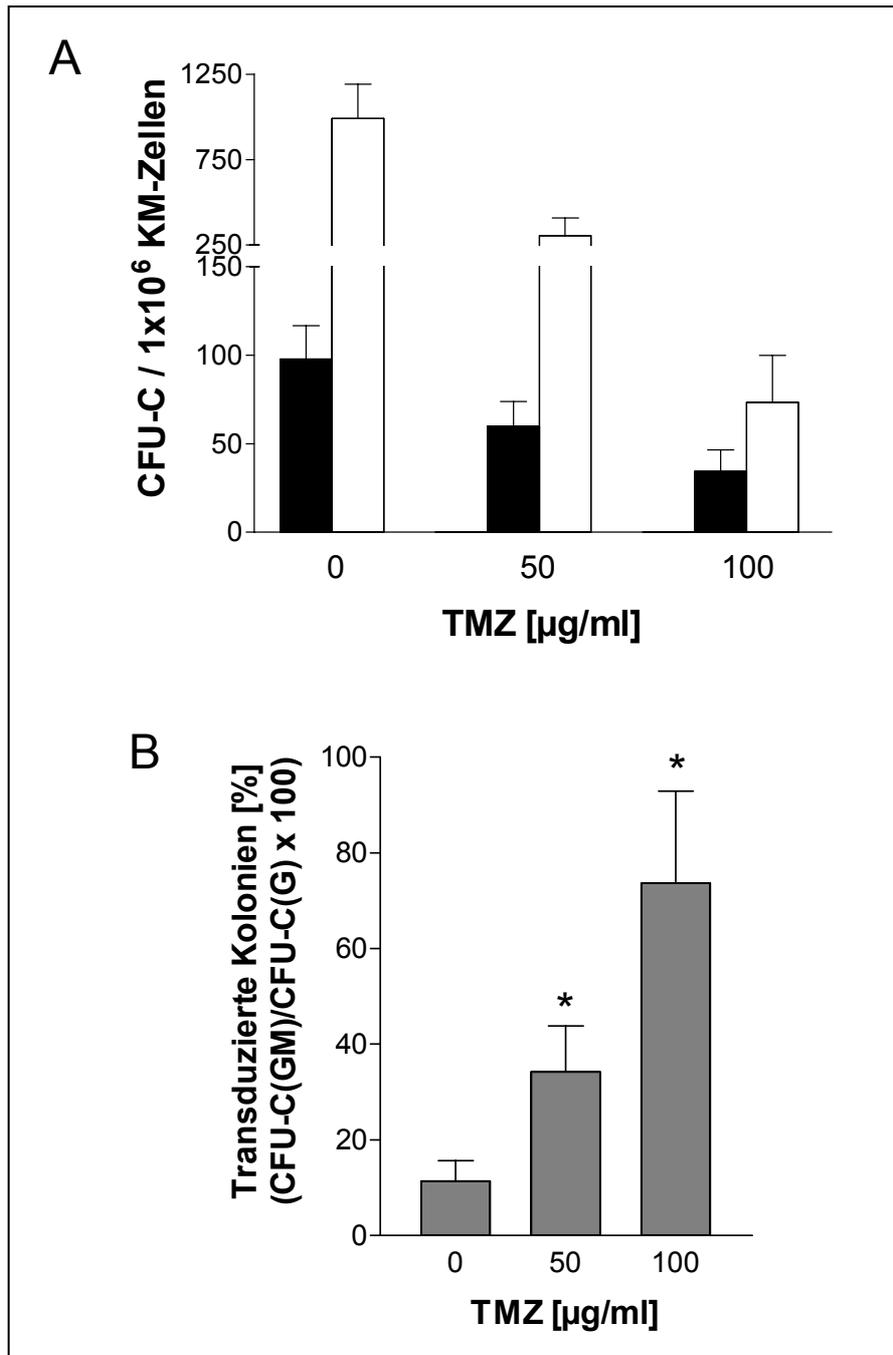


Abbildung 15: Koloniewachstum $m\beta c$ -transduzierter $m\beta c^{-/-}$ -Zellen nach *In-vitro*-Selektion.

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Experimenten. (A) Aufgetragen sind Koloniezahlen SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierter $m\beta c^{-/-}$ -Zellen, die in Gegenwart von 10 μ M BG und 0, 50 oder 100 μ g/ml TMZ und GM-CSF alleine (schwarze Balken) oder in G-CSF/EPO/SCF (weiße Balken) kultiviert wurden. (B) Abgebildet sind die prozentualen Anteile transduzierter Kolonien in Gegenwart von ansteigenden TMZ-Konzentrationen. Die Effizienz der Selektion wurde anhand des Quotienten aus CFU-C in GM-CSF (CFU-C(GM)) und CFU-C in G-CSF/EPO/SCF (CFU-C(G)) ermittelt (s. Text). * zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kulturbedingungen ohne TMZ ($p = 0,016$ und $p = 0,009$; Kruskal-Wallis-Test).

3.4 *In-vivo*-Untersuchungen zum m β c-Gentransfer in einem murinen β c-defizienten PAP-Modell

Um den Effekt des m β c-Gentransfers auf das hämatopoetische System von m β c^{-/-}-Mäusen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein etabliertes Knochenmarkstransplantations-/Gentransfer-Mausmodell verwendet [Rattmann et al., 2006], das in Abbildung 16 schematisch dargestellt ist. In diesem Modell wurden KM-Zellen von m β c^{-/-}- oder Wildtypmäusen entweder mit SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}- oder SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}- (Kontrolle) Überständen transduziert und in letal bestrahlte m β c^{-/-}- oder Wildtyp-Empfängermäuse transplantiert. Nach der hämatopoetischen Rekonstitution, erkennbar an der Wiederherstellung normaler Zellzahlen im peripheren Blut ca. 3 - 4 Wochen nach Transplantation, wurden dann MGMT^{P140K}-exprimierende Zellen durch wiederholte BG/TMZ-Administration selektiert. Am Ende der Experimente wurden die Auswirkungen sowohl auf das hämatopoetische System als auch auf die Lungen untersucht. Diese Experimente wurden zweimal durchgeführt und werden im Folgenden als Exp. 1 und Exp. 2 bezeichnet. Die Einzelheiten der beiden Experimente sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Design der beiden durchgeführten *In-vivo*-Versuche.

	Tiere		n	Vektoren*	ÜS‡	CTX o/m	Blut- entnahme	Einzel- kolonie- PCR	Semiquantitative Analyse der PAP
	Spender	Empfänger							
Exp.1	mβc ^{-/-}	mβc ^{-/-}	10	mβc/MGMT	unv	4/6	+	-	+
	WT	mβc ^{-/-}	7	EGFP/MGMT	unv	3/4	+	-	-
	-	mβc ^{-/-}	2	-	-	2/0	-	-	+
	WT	WT	3	EGFP/MGMT	unv	2/1	+	-	-
	-	WT	2	-	-	2/0	-	-	+
Exp.2	mβc ^{-/-}	mβc ^{-/-}	6	mβc/MGMT	unv	3/3	+	+	-
	mβc ^{-/-}	mβc ^{-/-}	7	mβc/MGMT	1:5	3/4	+	+	-
	mβc ^{-/-}	mβc ^{-/-}	5	EGFP/MGMT	1:2	2/3	+	+	-
	-	mβc ^{-/-}	3	-	-	3/0	+	+	-
	-	WT	3	-	-	3/0	+	+	-

* Die Vektoren sind hier mit Kurzbezeichnungen aufgeführt: mβc/MGMT entspricht dem SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K}-Vektor, EGFP/MGMT entspricht dem SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Vektor. ‡ Der eingesetzte Überstand wurde entweder unverdünnt (unv) oder mit Medium verdünnt (1:5 oder 1:2) für die Transduktion eingesetzt. WT: Wildtypmäuse, mβc^{-/-}: mβc^{-/-}-Mäuse, ÜS: Überstand, CTX: Chemotherapie, o/m: ohne/mit, +: wurde durchgeführt, -: wurde nicht durchgeführt.

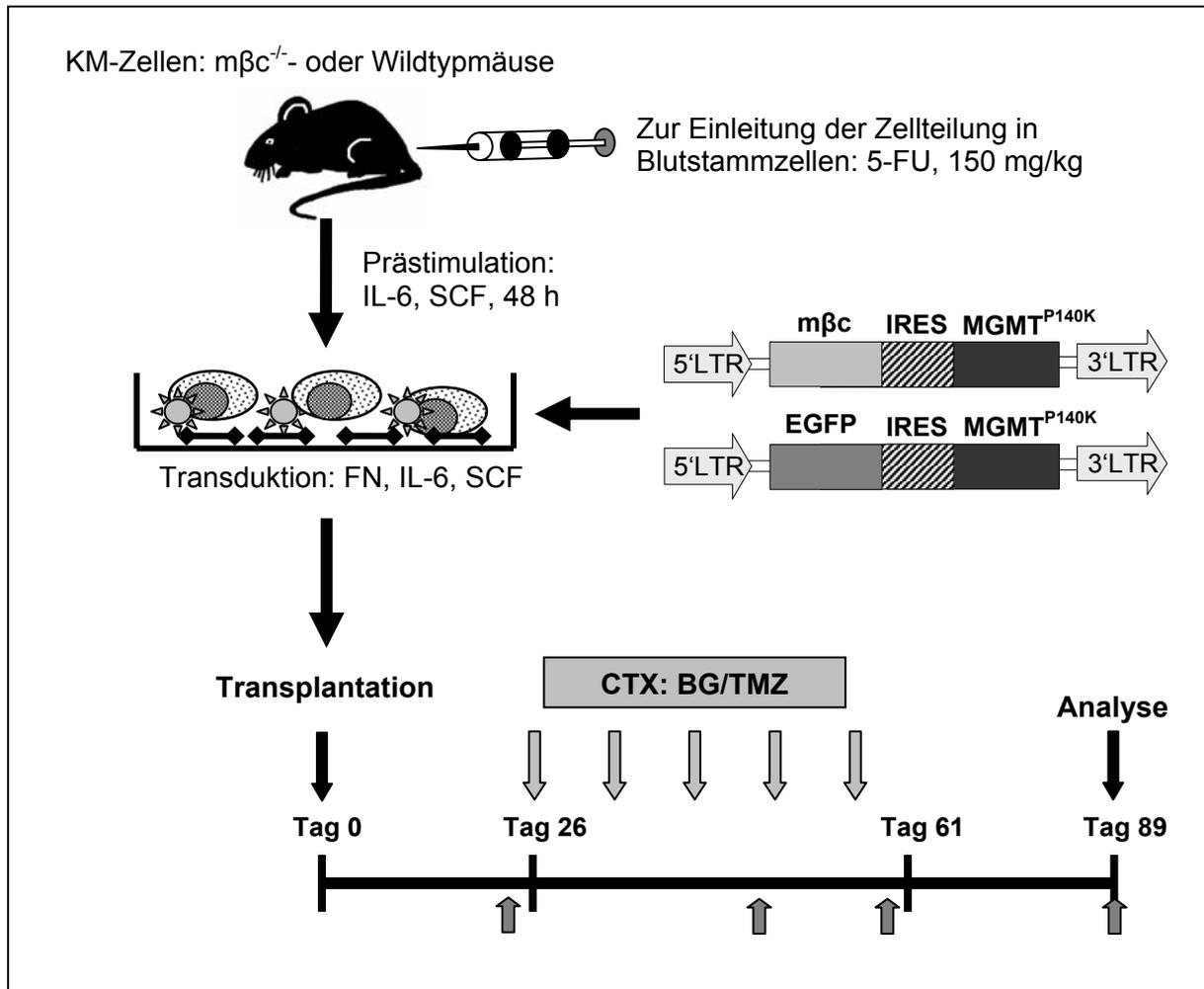


Abbildung 16: Experimentelles Design der *In-vivo*-Versuche.

Das Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten mβc^{-/-} oder Wildtypmäusen wurde mit IL-6 und SCF prästimuliert, mit den Virusvektoren SF91-mβc-IRES-MGMT^{P140K} und SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K} (Kontrolle) auf Fibronectin-Fragmenten (FN) transduziert und in letal bestrahlte Empfängermäuse i.v. über die Schwanzvene transplantiert. Nach hämatopoetischer Rekonstitution (Tag 24 - 26) wurde mit der Chemotherapie (CTX) begonnen, die aus insgesamt fünf Applikationen bestand, wobei jeweils 25 mg/kg BG gefolgt von 70 mg/kg TMZ i.p. injiziert wurden. Ein Teil der Tiere wurde als Kontrolle nicht mit CTX behandelt. 3 - 5 Wochen nach der letzten BG/TMZ-Behandlung wurden die Tiere analysiert. Die Blutwerte wurden vor der 1. und 4. sowie nach der letzten CTX und am Versuchsende bestimmt (↑).

3.4.1 Effekte auf das hämatopoetische System

3.4.1.1 Analysen der Zellzahlen im peripheren Blut

Um den Effekt der Chemotherapie auf die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen im peripheren Blut zu evaluieren wurde in beiden Experimenten regelmäßig peripheres Blut analysiert (Abbildung 16). Hierbei zeigten sich bei den bestrahlten, transplantierten Tieren die bereits in der Literatur beschriebenen klassischen Verläufe der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen [Jansen et al., 2002]: Die

behandelten SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}- und SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten Tiere zeigten während der Behandlungen einen leichten Rückgang der Leukozyten aber erholten sich wieder nach der letzten Zytostatika-Behandlung. Vergleichbare Beobachtungen wurden bei den Thrombozyten dieser Tiere gemacht, wobei hier bereits z.T. schon nach der 4. BG/TMZ-Behandlung wieder Normalwerte erreicht wurden. Nicht-transplantierte und transplantierte Mäuse ohne Chemotherapie zeigten erwartungsgemäß normale periphere Blutwerte während des gesamten Experiments (Daten nicht gezeigt).

Um die *In-vivo*-Selektion transduzierter Zellen durch die BG/TMZ-Applikationen zu evaluieren, wurde zusätzlich bei den Tieren, die SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Zellen erhielten, der Anteil EGFP-positiver Granulozyten und Lymphozyten im peripheren Blut bestimmt (Abbildung 17). Der Vergleich von chemotherapierten und nicht-therapierten Tieren zeigte eine deutliche Anreicherung transduzierter Zellen. So konnten transduzierte Granulozyten von $15 \pm 1\%$ vor Chemotherapie auf $95 \pm 1\%$ EGFP-positive Zellen nach Chemotherapie selektiert werden. Eine ähnliche Anreicherung wurde bei den Lymphozyten beobachtet, von $20 \pm 2\%$ vor auf $92 \pm 2\%$ EGFP-positive Zellen nach der fünfmaligen BG/TMZ-Applikation. Diese Anreicherung war auch 4 Wochen nach der letzten Chemotherapie stabil.

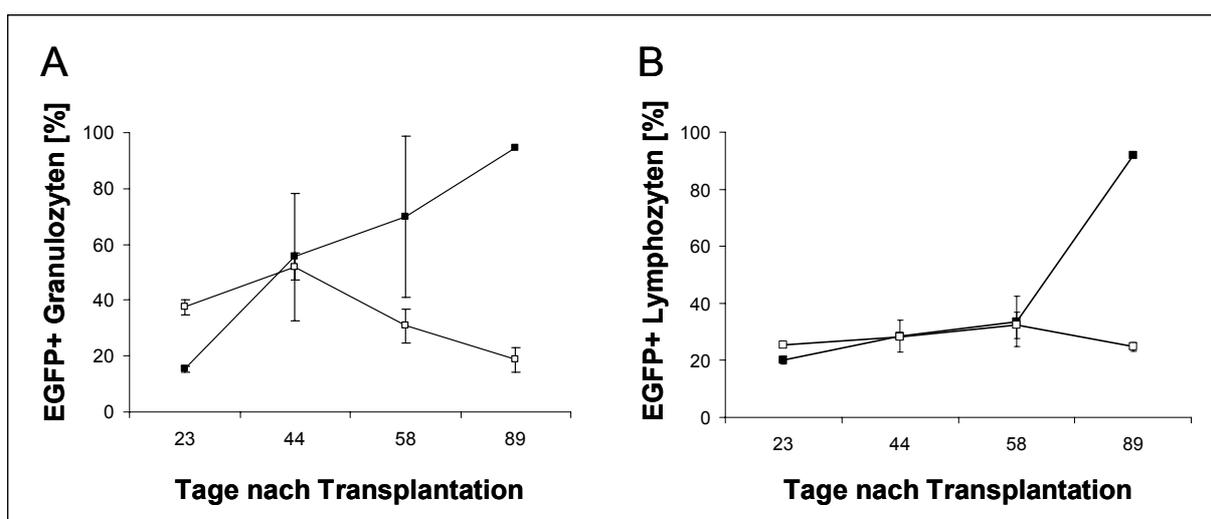


Abbildung 17: EGFP-positive Zellen im peripheren Blut.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Granulozyten (A) und Lymphozyten (B) im peripheren Blut der Versuchstiere vor der 1. (n = 3) und 4. (n = 3) sowie nach der letzten Chemotherapie (n = 3) und am Versuchsende (n = 3 bei nicht-therapierten Tieren; n = 2 bei therapierten Tieren). Repräsentativ sind die Daten aus Exp. 2 gezeigt.

3.4.1.2 Analysen der KM-Zellen

Die funktionelle Expression des $m\beta c$ -Gens in KM-Zellen wurde bereits in der *In-vitro*-Situation durch die Wiederherstellung des GM-CSF-abhängigen Koloniewachstums gezeigt. Um zu untersuchen, ob genetisch korrigierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen die Hämatopoese in $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen rekonstituieren, wurden am Ende der beiden *In-vivo*-Versuche KM-Zellen in CFU-C-Assays in Gegenwart von GM-CSF, G-CSF/EPO/SCF oder IL-3 kultiviert.

Die Daten der Kontrolltiere aus Exp. 1 und Exp. 2, die bei einzelnen Tieren erhoben wurden ($n =$ Mäuse), sind in Abbildung 18 dargestellt. In Exp. 1 bildeten KM-Zellen unmanipulierter Wildtypmäuse in Gegenwart von IL-3 429 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 2$) und in Gegenwart von GM-CSF 740 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 2$) (Abbildung 18A, links). Aus KM-Zellen von $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Wildtypzellen als Kontrolle transplantiert wurden, wuchsen ebenfalls in IL-3 und in GM-CSF Kolonien (73 und 93 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ohne Chemotherapie, $n = 2$; 37 und 68 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen mit Chemotherapie, $n = 2$). Im Vergleich von Chemotherapie-behandelten und nicht-behandelten Tieren konnte unter beiden Zytokin-Kombinationen eine geringgradige Reduktion der Kolonienzahlen nach Chemotherapie beobachtet werden (Abbildung 18A, Mitte und rechts). In einem weiteren Kontrollansatz wurden KM-Zellen von unmanipulierten $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen und von $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen transplantiert wurden, in Gegenwart von GM-CSF oder IL-3 (Exp. 1) sowie GM-CSF, IL-3 oder G-CSF/EPO/SCF (Exp. 2) kultiviert (Abbildung 18A, B). Erwartungsgemäß wurden keine Kolonien in Anwesenheit von GM-CSF beobachtet. Wenn KM-Zellen unmanipulierter $m\beta c^{-/-}$ -Mäuse in Anwesenheit von IL-3 ausgesät wurden, konnten 43 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 2$) beobachtet werden (Abbildung 18B, links), wahrscheinlich aufgrund der Präsenz der spezifischen β_{IL-3} -Kette, einer zusätzlichen β -Kette in murinen hämatopoetischen Zellen, die nur die IL-3-Signaltransduktion vermittelt und im humanen System nicht vorkommt. Die gleichen Beobachtungen wurden bei $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen gemacht, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen transplantiert wurden: Es konnten keine Kolonien in Gegenwart von GM-CSF beobachtet werden. Hingegen kam es zur Koloniebildung in Anwesenheit von IL-3, ungeachtet ob die Tiere einer Chemotherapie unterzogen wurden (47 ± 19 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen, $n = 4$) oder nicht (33 ± 8 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen, $n = 3$). Die geringe Erhöhung der Koloniezahl

mit Chemotherapie lag im Rahmen der Schwankungsbreite des Koloniewachstums, wie sie bereits in den *In-vitro*-Versuchen beobachtet wurde. In Gegenwart von GM-CSF zeigte sich nahezu kein Koloniewachstum (< 3 Kolonien).

In Exp. 2 wurde neben IL-3 und GM-CSF zusätzlich G-CSF/EPO/SCF als eine β c-unabhängige Zytokin-Kombination eingesetzt, um einen Vergleich mit den zuvor erhobenen *In-vitro*-Daten zu ermöglichen (Abbildung 18C). Hierbei wurden die Beobachtungen des Koloniewachstums unter GM-CSF und IL-3 aus Exp. 1 weitgehend bestätigt bei einer insgesamt geringeren Koloniezahl. In Gegenwart von G-CSF/EPO/SCF wurden 39 ± 8 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 3$) aus KM-Zellen unmanipulierter $m\beta c^{-/-}$ -Mäuse beobachtet. $M\beta c^{-/-}$ -Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Zellen transplantiert wurden, zeigten ohne Chemotherapie in Gegenwart von G-CSF/EPO/SCF 41 ± 18 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 3$) und 29 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 2$) mit BG/TMZ-Applikation. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass erwartungsgemäß in Gegenwart von GM-CSF keine Koloniebildung zu beobachten war. Hingegen wuchsen Kolonien aller Kontrolltiere in Anwesenheit von G-CSF/EPO/SCF sowie IL-3.

Genauso wurden KM-Zellen genetisch korrigierter Tiere, denen SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte KM-Zellen transplantiert wurden, und die entweder einer Chemotherapie unterzogen wurden oder nicht, in den bereits oben verwendeten drei Zytokin-Kombinationen in CFU-C-Assays kultiviert. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse dieser Assays von Exp. 1 und Exp. 2 dargestellt. In Exp. 1 wurden Koloniezahlen von 31 ± 5 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 4$) ohne BG/TMZ-Behandlung und 35 ± 8 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 6$) mit BG/TMZ-Behandlung in Gegenwart von IL-3 beobachtet, vergleichbar zu den Ergebnissen der Kontrollansätze mit unmanipulierten und Kontroll-transduzierten $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen (vgl. Abbildung 18B). Bei KM-Zellen von genetisch korrigierten Tieren in Gegenwart von GM-CSF zeigte sich zum einen ein reproduzierbares klonogenes Wachstum aufgrund der reparierten β c-Kette, was die *In-vitro*-Daten widerspiegelte. Dabei konnten 5 ± 3 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 5$) Kolonien beobachtet werden, wenn die Tiere keine BG/TMZ-Behandlung erhielten (Abbildung 19A). Mit Chemotherapie konnte eine deutliche Anreicherung der transduzierten Zellen beobachtet werden was sich in einer erhöhten Koloniezahl von 41 ± 11 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 6$) äußerte.

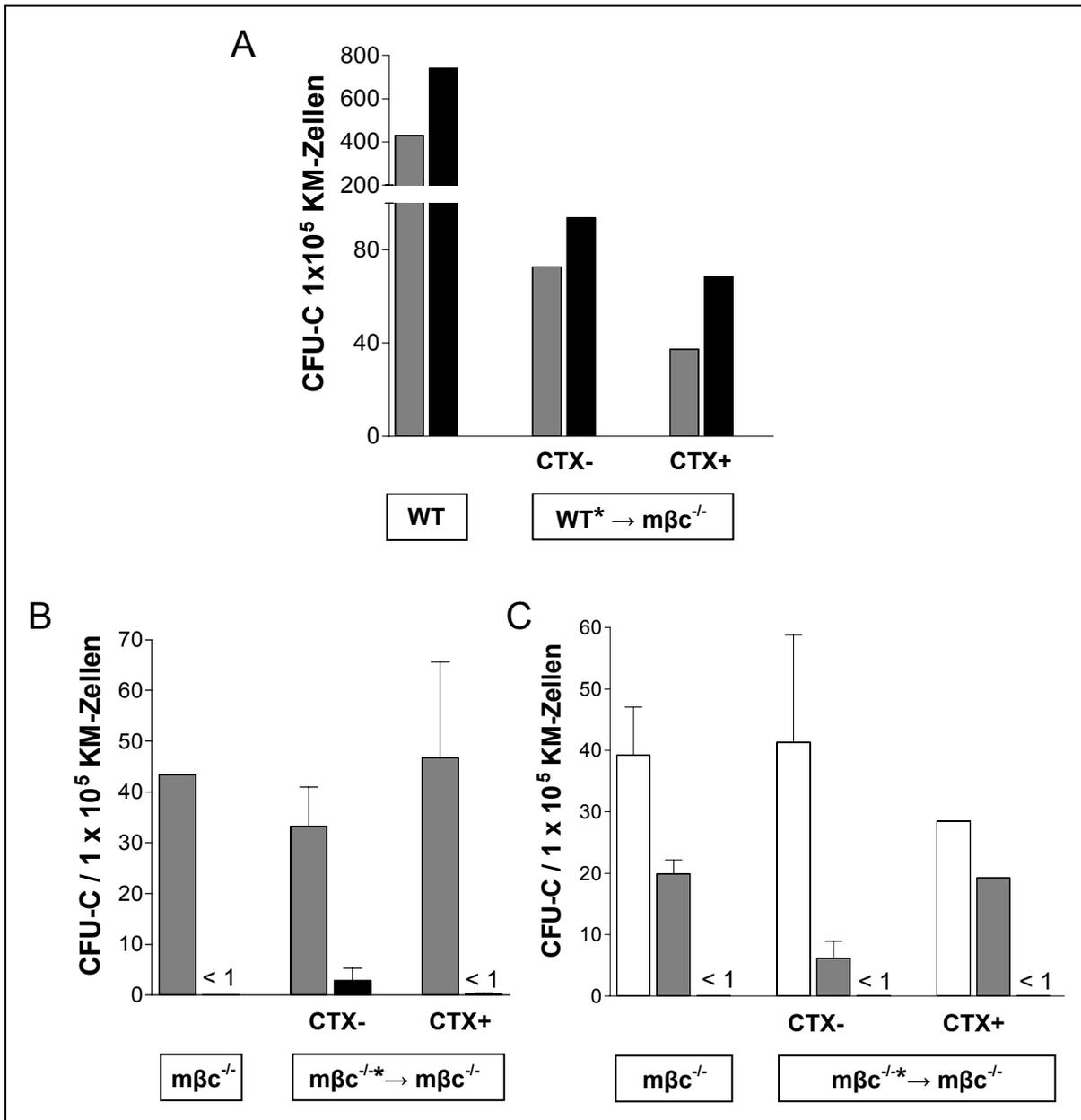


Abbildung 18: Kontrollversuche zum mβc-Gentransfer in einem murinen *In-vivo*-Modell.

Gezeigt sind die Koloniezahlen pro 1×10^5 KM-Zellen (Mittelwerte oder Mittelwerte \pm SEM), die entweder in Anwesenheit von IL-3 (graue Balken) oder GM-CSF (schwarze Balken) oder G-CSF/EPO/SCF (weiße Balken) wuchsen. (A) Koloniezahlen unmanipulierter Wildtypmäuse (WT) und von mβc^{-/-}-Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Wildtypzellen transplantiert wurden (WT* → mβc^{-/-}); n = 2. Die Daten sind aus Exp. 1 exemplarisch dargestellt. (B) Koloniezahlen aus Exp. 1 von unmanipulierten mβc^{-/-}-Mäusen (n = 2) und von mβc^{-/-}-Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte mβc^{-/-}-Zellen transplantiert wurden (mβc^{-/-*} → mβc^{-/-}), die entweder BG/TMZ behandelt wurden (CTX+; n = 4) oder nicht (CTX-; n = 3). (C) Koloniezahlen aus Exp. 2 von unmanipulierten mβc^{-/-}-Mäusen (n = 3) und mβc^{-/-}-Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte mβc^{-/-}-Zellen transplantiert wurden (mβc^{-/-*} → mβc^{-/-}), die entweder BG/TMZ behandelt wurden (CTX+; n = 2) oder nicht (CTX-; n = 3). * zeigt SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Zellen an

Diese Daten wurden in Exp. 2 bestätigt (Abbildung 19B). Erwartungsgemäß kam es auch hier unter IL-3 zu einer Koloniebildung von KM-Zellen genetisch korrigierter

Tiere. Zusätzlich wurden KM-Zellen dieser Tiere auch in G-CSF/EPO/SCF kultiviert, wobei 19 ± 12 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 3$) von nicht-chemotherapierten und 26 ± 3 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 3$) von chemotherapierten Tieren gezählt wurden. In Gegenwart von GM-CSF wurden 3 ± 2 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 3$) aus KM-Zellen nicht-chemotherapierter Tiere beobachtet. Auch hier konnte mit BG/TMZ-Applikation eine Anreicherung transduzierter Zellen in genetisch korrigierten Tieren erreicht werden, wobei 11 ± 1 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 3$) mit Chemotherapie beobachtet wurden. Zusätzlich wurde in Exp. 2 für die Transduktion der $m\beta c^{-/-}$ -Zellen ein 1:5-verdünnter retroviraler Überstand verwendet (Abbildung 19C). Auch hier zeigte sich reproduzierbar unter GM-CSF Koloniewachstum mit $1 \pm 0,3$ CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 3$) aus KM-Zellen nicht-chemotherapierter Tiere; wenn auch weniger Kolonien im Vergleich zu den Ansätzen gezählt wurden, in denen unverdünnter Überstand für die Transduktion eingesetzt wurde. Auch hier wurde durch BG/TMZ-Applikation eine Anreicherung transduzierter Zellen erreicht, so dass in den CFU-C-Assays 10 ± 2 CFU-C/ 1×10^5 KM-Zellen ($n = 4$) chemotherapierter Tiere gezählt wurden.

Diese Daten belegen somit, dass auch *in vivo* durch den $m\beta c$ -Gentransfer in $m\beta c^{-/-}$ -Zellen die GM-CSF-abhängige βc -Kette funktionell wieder hergestellt werden konnte. Desweiteren wurde eine Anreicherung transduzierter Zellen durch eine Chemotherapie mit BG/TMZ beobachtet.

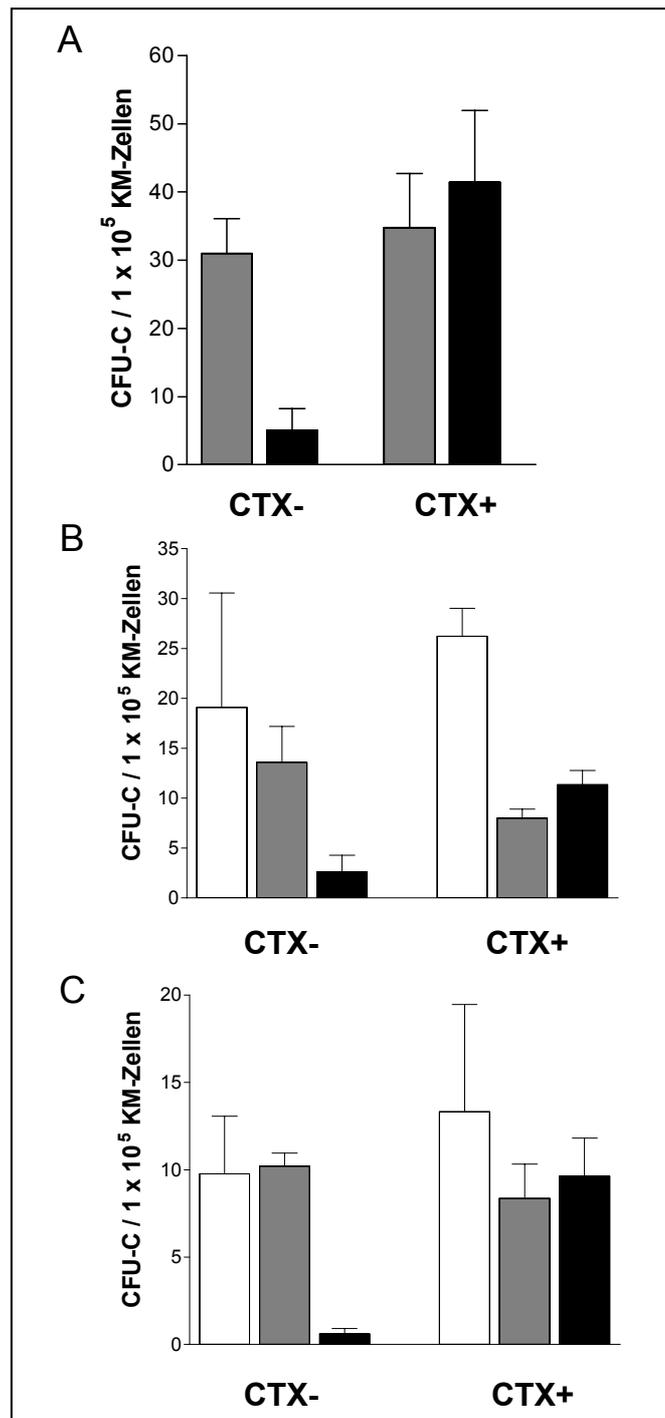


Abbildung 19: Effekt des $m\beta c$ -Gentransfers auf die Hämatopoese im murinen *In-vivo*-Modell.

Dargestellt sind die Kolonienzahlen pro 1×10^5 KM-Zellen (Mittelwerte \pm SEM), die entweder in Anwesenheit von IL-3 (graue Balken) oder GM-CSF (schwarze Balken) oder G-CSF/EPO/SCF (weiße Balken) gewachsen sind. (A) Kolonien aus KM-Zellen von $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen, denen SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen transplantiert wurden und die BG/TMZ erhielten (n = 6) oder nicht (n = 4 in IL-3; n = 5 in GM-CSF; Exp. 1). (B) Kolonien von KM-Zellen von $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen, denen SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen transplantiert wurden und die BG/TMZ erhielten oder nicht (n = 3; Exp. 2). (C) Kolonien von KM-Zellen von $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen, denen transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen injiziert wurden, die mit 1:5-verdünntem retroviralem Überstand transduziert wurden. Die Tiere wurden einer BG/TMZ-Behandlung unterzogen (n = 4) oder nicht (n = 3; Exp. 2).

3.4.1.3 Evaluierung der Gentransferraten

Da eine durchflusszytometrische Bestimmung der $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ - sowie der $\text{m}\beta\text{c}$ -Expression in den KM-Zellen dieser Tiere nicht möglich war, wurde die Anreicherung zunächst für die EGFP-Expression untersucht. Hierzu wurden von Exp. 1 und Exp. 2 ein Teil der KM-Zellen aus $\text{m}\beta\text{c}^{-/-}$ -Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES- $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ -transduzierte KM-Zellen injiziert wurden, für durchflusszytometrische Analysen eingesetzt (Abbildung 20). Die Frequenz transduzierter Zellen, die über die Expression des EGFP-Gens in den KM-Zellen ermittelt wurde, lag in Exp. 1 im Bereich von $31 \pm 11\%$ ($n = 3$) ohne und $80 \pm 4\%$ ($n = 3$) mit Zytostatika-Behandlung (Abbildung 20A). In Exp. 2 wurden diese Daten bestätigt. Hierbei zeigten sich $27 \pm 4\%$ ($n = 3$) EGFP-positive Zellen ohne und 79% EGFP-positive Zellen ($n = 2$) mit BG/TMZ-Behandlung.

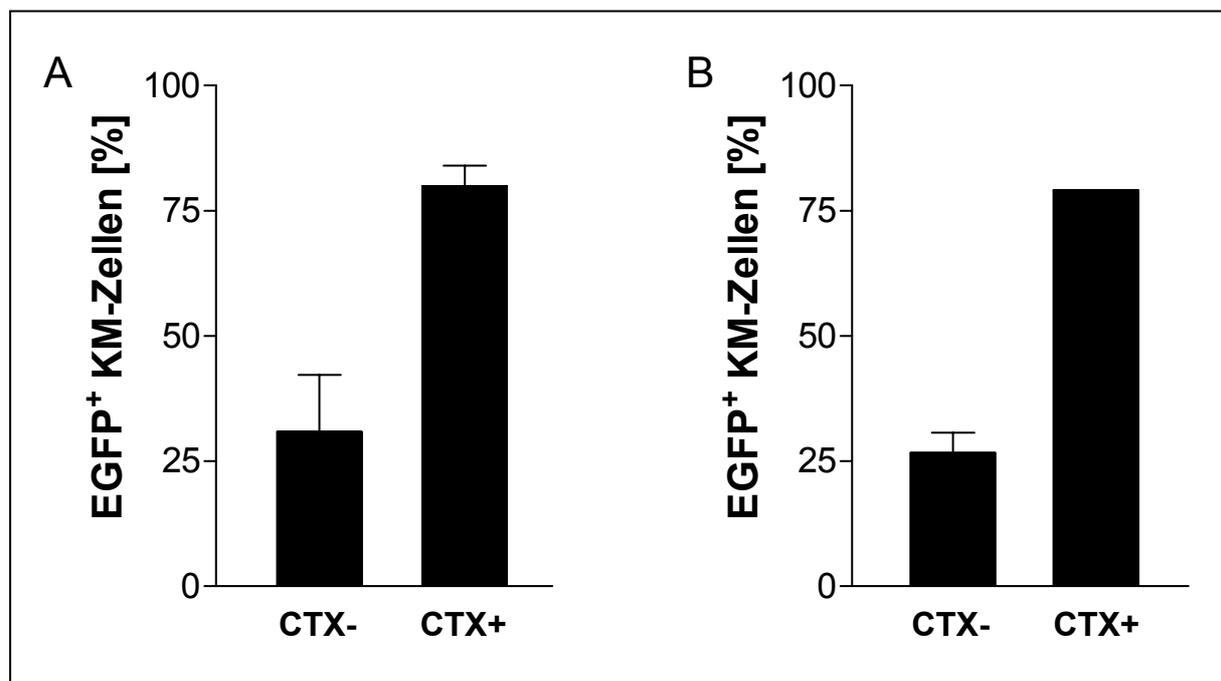


Abbildung 20: Bestimmung transduzierter KM-Zellen in $\text{m}\beta\text{c}^{-/-}$ -Mäusen durch Messung der EGFP-Expression.

Gezeigt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver KM-Zellen chemotherapierter (CTX+) und nicht-therapierter (CTX-) $\text{m}\beta\text{c}^{-/-}$ -Mäuse, denen SF91-EGFP-IRES- $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ -transduzierte Zellen transplantiert wurden (Mittelwerte, $n = 2$; Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$) in Exp.1 (A) und Exp. 2 (B).

Die initiale Gentransferrate, d.h. der Prozentsatz transduzierter Zellen in Mäusen ohne BG/TMZ-Applikation, wurde für den SF91- $\text{m}\beta\text{c}$ -IRES- $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ -Vektor in Exp. 1 anhand der Koloniebildung in Anwesenheit von IL-3 und GM-CSF in den CFU-C-Assays wie folgt abgeschätzt (Abbildung 21): Im Normalfall ist das Verhältnis von IL-

3-stimulierten zu GM-CSF-stimulierten Kolonien in unserem Modell 1:2. Dies zeigt sich sowohl für Wildtyp-KM-Zellen (Abbildung 21A, links) als auch für KM-Zellen von $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Wildtypzellen injiziert wurden (Abbildung 21A, rechts). Das gleiche Verhältnis ist ebenso bei den $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen zu beobachten, denen SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen und Chemotherapie verabreicht wurden (Abbildung 21B, rechts). Bei den letztgenannten Tieren ist davon auszugehen, dass es sich dabei um eine nahezu vollständig transduzierte Zellpopulation handelt (vgl. Expressionsmessungen vom EGFP-Vektor, Abbildung 20). Angesichts der Ergebnisse der Kontrolltiere (Abbildung 21A) würden deshalb die beobachteten 10 GM-CSF-induzierten Kolonien aus transduzierten KM-Zellen nicht-therapierter Tiere (Abbildung 21B, links) zu 5 IL-3-induzierten Kolonien korrespondieren, was ca. 13,5% (5/37) der gesamten IL-3-induzierten Kolonien entsprechen würde und somit in etwa die initiale Transduktionsrate für Exp. 1 widerspiegelt.

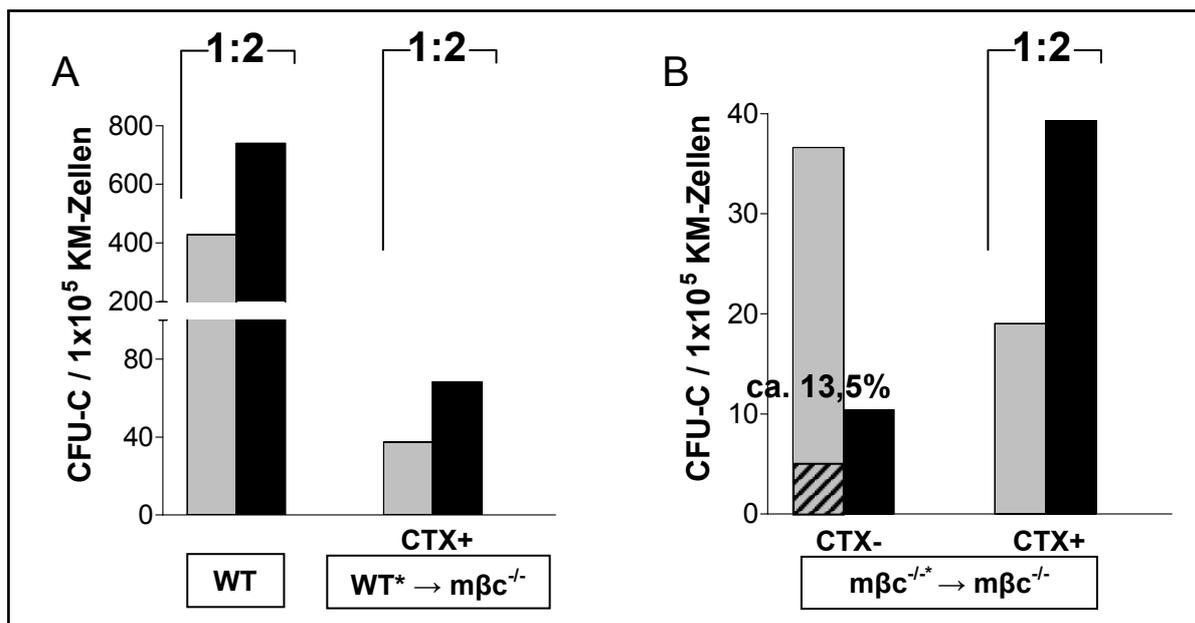


Abbildung 21: Abschätzung der Gentransferrate anhand der GM-CSF- und IL-3-stimulierten Kolonien genetisch korrigierter Tiere.

Gezeigt sind Koloniezahlen pro 1×10^5 KM-Zellen aus Exp. 1 ($n = 2$) von KM-Zellen von Wildtypmäusen (A, links) oder $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Wildtypzellen (A, rechts) oder SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen (B) transduziert wurden und entweder einer Chemotherapie unterzogen (CTX+) oder nicht behandelt (CTX-) wurden. Kolonien wuchsen in Gegenwart von IL-3 (graue Balken) oder GM-CSF (schwarze Balken). Erklärung der Kalkulationen im Text. WT^* : SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ KM-Zellen; $m\beta c^{-/-*}$: SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte KM-Zellen

In ähnlicher Weise wurde für Exp. 2 eine Gentransferrate von 15 - 20% ermittelt. Um diese Annahme genauer zu überprüfen wurden hier zusätzlich Einzelkolonien aus den CFU-C-Assays einer spezifischen, im Rahmen dieser Arbeit etablierten MGMT-PCR unterzogen. Als Kontrolle für die Qualität der DNA wurden in den gleichen Proben Sequenzen des beta-Aktin-Gens als „housekeeping gene“ amplifiziert. Die Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Insgesamt wurden 90 bzw. 50 Kolonien aus SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten m β c^{-/-}-Zellen chemotherapierter und nicht-therapierter Tiere analysiert die in Gegenwart von G-CSF/EPO/SCF kultiviert wurden. Die Transduktionsraten der Kolonien lagen im Bereich von 24 \pm 9% (n = 3) bei Mäusen, die keine BG/TMZ-Behandlung erhielten. Mit Chemotherapie erhöhte sich der Anteil transduzierter Zellen auf 87 \pm 7% (n = 3). Von den insgesamt 60 bzw. 20 Kolonien aus SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten m β c^{-/-}-Zellen chemotherapierter und nicht-therapierter Tiere die unter GM-CSF-Zugabe wuchsen, lagen die Transduktionsraten bei 85 \pm 7% (n = 3) bis 94% (n = 1). Diese Daten zeigen, dass die initiale Gentransferrate in Exp. 2, die sich anhand der Ergebnisse ohne BG/TMZ-Behandlung zeigt, mit 24% ungefähr doppelt so hoch war wie in Exp. 1 (ca. 13,5%).

Tabelle 3: Ergebnisse der Einzelkolonie-PCR.

	Southern Blot	
	G-CSF/EPO/SCF	GM-CSF
MGMT-m β c ^{-/-} CTX+*	87 \pm 7	85 \pm 7
MGMT-m β c ^{-/-} CTX-*	24 \pm 9	94 [†]

*Mittelwerte \pm SEM der Koloniezahlen von KM-Zellen von m β c^{-/-}-Mäusen, denen SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte Zellen transplantiert und die mit BG/TMZ behandelt (CTX+, n = 3 Mäuse) oder nicht behandelt (CTX-, n = 3 Mäuse) wurden. [†] zur Kontrolle wurden nur Kolonien einer Maus aufgearbeitet

3.4.2 Effekte auf die Lungenpathologie m β c-defizienter Mäuse

3.4.2.1 Analyse der Lungenpathologie

Der Effekt des m β c-Gentransfers auf die pulmonale Pathologie in diesen Mäusen wurde an Paraffin-eingebetteten und PAS-gefärbten Schnitten untersucht. Während unmanipulierte Wildtypmäuse eine normale Lungenarchitektur zeigten (Abbildung 22A), wiesen unmanipulierte m β c^{-/-}-Mäuse eine massive Akkumulation von PAS-positivem Proteinmaterial in den Alveolarräumen der Lunge (Abbildung 22B) sowie typische peribronchiovaskuläre Lymphozyteninfiltrate (Abbildung 22C) auf. Vergleichbar zu Lungen unmanipulierter m β c^{-/-}-Mäuse wurde auch in m β c^{-/-}-Mäusen, denen SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte KM-Zellen transplantiert wurden, Akkumulationen des PAS-positiven Materials beobachtet (Abbildung 22D). Die letztgenannte Beobachtung war dabei unabhängig davon, ob die Tiere eine BG/TMZ-Behandlung erhielten oder nicht.

12 Wochen nach Transplantation der m β c^{-/-}-Mäuse mit SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten KM-Zellen wurde jedoch eine deutliche Verbesserung der Lungenpathologie beobachtet (Abbildung 22E-H). Das PAS-positive Material in den Alveolarräumen war auf normale bis nahezu normale Mengen reduziert. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Tiere mit einer Chemotherapie behandelt wurden (Abbildung 22F-H) oder nicht (Abbildung 22E). Diese Ergebnisse waren erstaunlich, da mit einer relativ geringen initialen Transduktionsrate von abgeschätzten 13,5% (siehe Erklärung zu Abbildung 21) in Exp. 1, kalkuliert anhand der Koloniezahlen, trotzdem eine Korrektur der Lungenpathologie zu verzeichnen war. Es wurden nur wenige, vereinzelte Bereiche mit weniger als 2% der gesamten Alveolen mit Hinweis auf Proteinakkumulation beobachtet (Abbildung 22H). Diese Ergebnisse bestätigten sich in Exp. 2. Hier lagen die initialen Transduktionsraten mit knapp 24%, ermittelt durch Einzelkolonie-PCRs, doppelt so hoch wie in Exp. 1, so dass eine Korrektur der Lungenpathologie auch ohne Chemotherapie nach den Befunden aus Exp. 1 erwartet werden durfte.

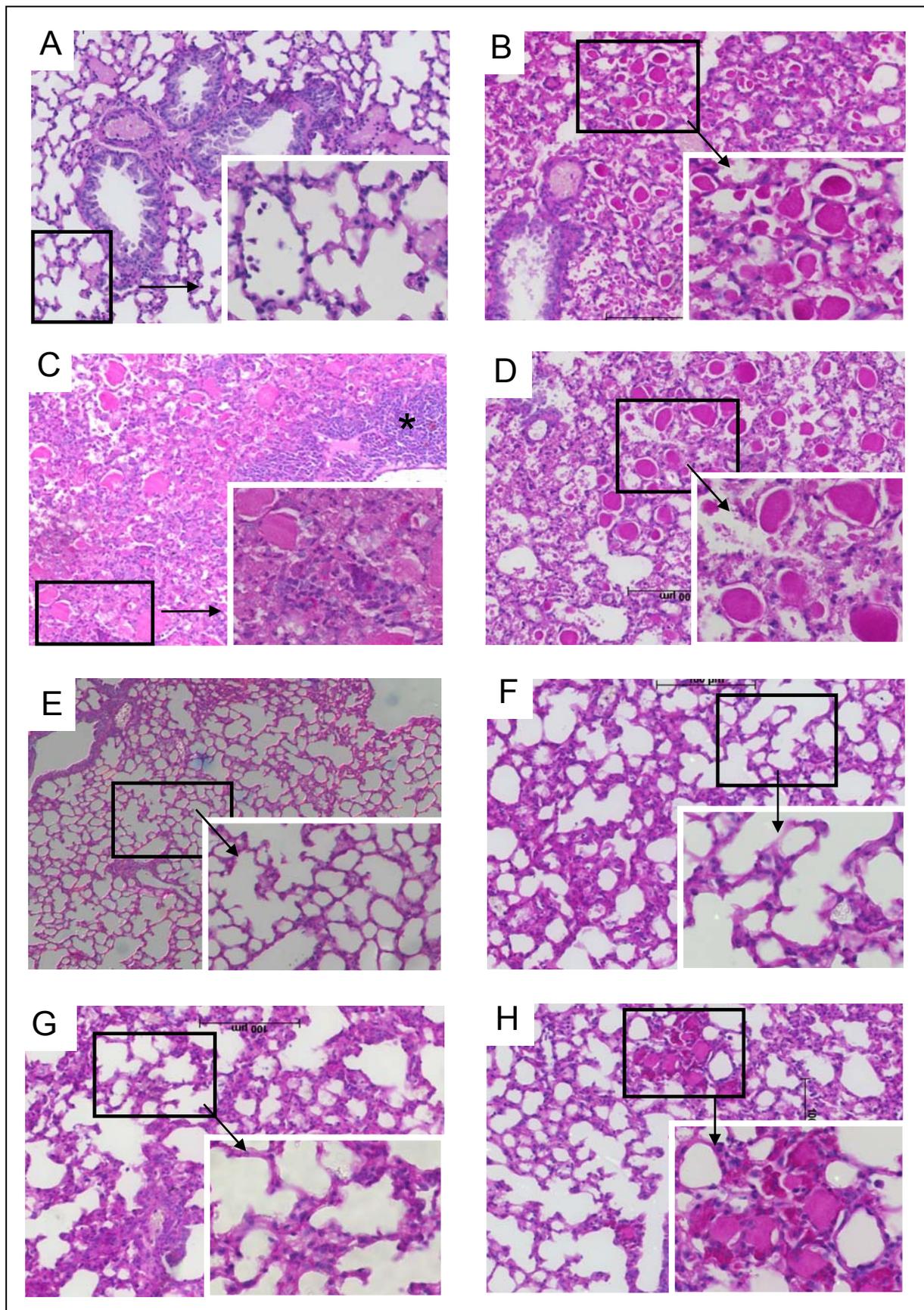


Abbildung 22: Wiederherstellung der Lungenstruktur nach Transplantation von m β c-transduzierten KM-Zellen.

Histologische Schnitte von Lungengewebe exemplarisch aus Exp. 1 (Original-Vergrößerungen 100x (große Abbildungen), 200x (kleine Abbildungen)). (A) Unmanipulierte gesunde Wildtypmaus. (B,C)

M β c^{-/-}-Maus, die Alveolarräume zeigen fast ausschließlich akkumuliertes PAS-positives Proteinmaterial sowie peribronchiolovaskuläre Lymphozyteninfiltrate (*). (D) M β c^{-/-}-Maus, der SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-(Kontroll)-transduzierte m β c^{-/-}-Zellen transplantiert wurden: Keine Verbesserung des Lungenbefundes. (E-G) M β c^{-/-}-Mäuse, denen SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte m β c^{-/-}-Zellen transplantiert wurden: Die Alveolarräume zeigen eine nahezu vollständige Reduktion des akkumulierten PAS-positiven Materials und eine Wiederherstellung der normalen Lungenstruktur, unabhängig davon, ob die Mäuse mit BG/TMZ behandelt wurden (F-H) oder nicht (E).

3.4.2.2 Semiquantitative Bestimmung des PAP-positiven Materials

Für eine Bestätigung der beobachteten Korrektur der Lungenpathologie dieser Tiere wurde zusätzlich eine semiquantitative Analyse der Ablagerungen in den Alveolen der Lungenpräparate aus Exp. 1 durchgeführt. Dazu wurde das PAS-positive Material in den Alveolen auf einer Skala von 0 bis 3 anhand des Prozentsatzes an betroffenen Alveolarräumen eingeteilt, wobei „0“ einer Proteinakkumulation von weniger als 2%, „1“ einer von 2 - 10%, „2“ einer von 10 - 50% und „3“ einer von 50 - 100% entsprach, und mindestens 1000 Alveoli pro Maus ausgezählt wurden (Tabelle 4). Genetisch korrigierte m β c^{-/-}-Mäuse zeigten nur noch vereinzelt oder gar kein PAS-positives Material mehr, unabhängig ob mit BG/TMZ behandelt wurde oder nicht, so dass diese Tiere auf der Skala zwischen 0 und 1 anzusiedeln waren. Diese Analyse bestätigt die bereits vorgestellten Resultate, so dass festzuhalten ist, dass, zumindest in den hier durchgeführten Experimenten, kein zusätzliches *In-vivo*-Selektionssystem durch Chemotherapie nötig war, um eine nahezu komplette Rückbildung des PAS-positiven Materials und somit eine Korrektur der Lungenpathologie bei m β c^{-/-}-Mäusen zu erreichen.

Tabelle 4: Semiquantitative Analyse der alveolaren Proteinakkumulation.

Spender	CTX	PAP-Grad*	n
Wildtyp	-	0 [†]	2
m β c ^{-/-}	-	3 [†]	2
m β c ^{-/-} (SF91-m β c-IRES-MGMT ^{P140K})	+	0,4 ± 0,2 [‡]	8
m β c ^{-/-} (SF91-m β c-IRES-MGMT ^{P140K})	-	0 ± 0 [‡]	4

* Semi-quantitative Bestimmung des PAS-positiven Materials in den Alveolen auf einer Skala von 0 - 3 anhand des Prozentsatzes an betroffenen Alveolarräumen (0: < 2%; 1: 2-10%; 2: 10-50%; 3: 50-100%; es wurden mindestens 1000 Alveoli pro Maus gezählt). CTX: Chemotherapie mit BG/TMZ. Gezeigt sind [†] Mittelwerte oder [‡] Mittelwerte ± SEM.

Die Daten der *In-vivo*-Experimente zeigten, dass der m β c-Gentransfer in m β c^{-/-}-KM-Zellen und anschließender Transplantation in m β c^{-/-}-Mäuse zu einer Korrektur der Lungenpathologie führte, wobei die zusätzliche Selektion mit BG/TMZ dabei nicht ausschlaggebend war.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeit einer Gentherapie der m β c-defizienten PAP im Mausmodell zu überprüfen, da der hämatopoetische Stammzell-Gentransfer für monogene Erkrankungen eine vielversprechende Behandlungsoption darstellt. Bei der PAP handelt es sich um eine solche monogene Erkrankung, bei der der genetische Defekt auf die Defizienz der gemeinsamen β c-Kette der Rezeptoren für GM-CSF, IL-3 und IL-5 zurückzuführen ist, die zu einer Fehlfunktion der Alveolarmakrophagen führt. Die PAP gehört zu den monogenen Erkrankungen, die keinen selektiven Vorteil transduzierter gegenüber nicht-transduzierten Stammzellen zeigen, da der β c-Defekt erst auf Ebene der Alveolarmakrophagen funktionell auftritt [Golde et al., 1976]. Daher wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein Selektionssystem zur *In-vivo*-Anreicherung transduzierter Zellen eingesetzt. Hierbei fiel die Wahl auf die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Mutante MGMT^{P140K}, für die eine erfolgreiche *In-vivo*-Selektion hämatopoetischer Stammzellen nach Verabreichung von geeigneten Chemotherapeutika wie Chloroethylnitrosoharnstoffen oder Temozolomid gut belegt ist [Allay et al., 1998; Brown et al., 2004; Jansen et al., 2002; Milsom et al., 2004; Persons et al., 2003; Ragg et al., 2000; Richard et al., 2004; Sawai et al., 2001; Sorrentino et al., 1992]. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der Gentransfer in hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen sowohl zu einer funktionellen Expression der m β c-Kette als auch zu einer funktionellen MGMT^{P140K}-Expression führt. Darauf aufbauend wurde in *In-vivo*-Versuchen der Effekt des m β c-Gentransfers sowohl auf die Hämatopoese als auch auf die Lungenstruktur von m β c^{-/-}-Mäusen evaluiert. Dabei zeigte sich, dass eine Korrektur der Lungenpathologie von m β c^{-/-}-Mäusen erreicht werden konnte, unabhängig davon, ob die Tiere einer Chemotherapie unterzogen wurden oder nicht.

4.1 Vektordesign

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit retroviralen SFFV/MESV-Hybridvektoren durchgeführt, die jeweils die cDNAs von zwei Genen beinhalteten, d.h. entweder die therapeutische m β c-cDNA in Kombination mit der cDNA des MGMT^{P140K}-Selektionsgens oder als Kontrolle die EGFP-cDNA zusammen mit der MGMT^{P140K}-cDNA. Die Ergebnisse zeigten, dass sich diese Vektoren für den

Gentransfer und die Genexpression im hämatopoetischen System prinzipiell eignen. Studien anderer Gruppen haben gezeigt, dass es für Vektoren, die mehr als ein Gen enthalten, von Vorteil ist, wenn die zusätzlichen Gene von der gleichen Expressionskassette exprimiert werden, da das zweite Gen bei Verwendung einer separaten Expressionskassette nicht unbedingt im gleichen Maße exprimiert wird [Apperley et al., 1991; Bowtell et al., 1988]. Dies kann einerseits durch eine Verbindung zwischen zwei Genen durch die 2A-Sequenz des Maul-und-Klauen-Seuche-Virus [De Felipe et al., 1999] verhindert werden, bei der eine proteolytische Koexpression durch eine Verknüpfung des Transgens und des Markergens vorliegt, wobei das primär translatierte Fusionsprotein anschließend durch die 2A-Protease autoproteolytisch gespalten wird. Andererseits kann durch die Verwendung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) eine sehr hohe Koexpression einer Vielzahl von Transgenen in hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen mit SFFV/MESV-Vektoren erzielt werden, wie frühere Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen zeigten [Baum et al., 1995; Flasshove et al., 2000; Hildinger et al., 1999; Jansen et al., 2001; Rattmann et al., 2006; Schiedlmeier et al., 2000]. So konnte auch im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung einer IRES die gleichzeitige funktionelle Expression der m β c- wie auch der MGMT^{P140K}-cDNA demonstriert werden.

Bei der Verwendung einer IRES wurde allerdings beschrieben, dass die kombinierten Gene nicht exakt im gleichen Verhältnis exprimiert werden. So wurde gezeigt, dass das Gen, welches hinter der IRES liegt, u.U. schwächer exprimiert wird [Flasshove et al., 2000], wobei das Ausmaß dieser Reduktion variabel und im Einzelfall nicht vorherzusagen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die 3'-Position der MGMT^{P140K} relativ zur IRES für eine *In-vitro*- und *In-vivo*-Selektion von genetisch korrigierten Zellen durch eine kombinierte BG/TMZ-Applikation ausreichend war. Dies bestätigt andere aktuelle Daten unserer Arbeitsgruppe, die vergleichbar effiziente Selektion von transduzierten hämatopoetischen Zellen durch eine BG/TMZ-Therapie nach MGMT^{P140K}-Expression von der 5'- oder 3'-Position relativ zur IRES demonstrieren (U.R. Sorg, Manuskript in Vorbereitung). Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen somit, dass die MGMT^{P140K}-Punktmutante eine *In-vivo*-Selektion von genetisch modifizierten hämatopoetischen Zellen im Kontext einer kombinierten BG/TMZ-Behandlung erlaubt.

4.2 Generierung hochtitriger Virusüberstände

Lange Jahre war es schwierig, in primären hämatopoetischen Zellen mit retroviralen Vektoren ausreichend hohe Transduktionseffizienzen zu erzielen. Die Gründe hierfür lagen u.a. in der geringen Teilungsaktivität der hämatopoetischen Stammzellen sowie der geringen Zahl an Oberflächenrezeptoren, an die die retroviralen Partikel mit ihren Hüllproteinen binden können. Durch verbesserte Transduktionsprotokolle, wie z.B. durch die Verwendung von Fibronectin, sowie die Optimierung der retroviralen Vektorkonstrukte, z.B. durch Pseudotypisierung der viralen Partikel zur Nutzung häufiger vorhandener Oberflächenrezeptoren auf den Zielzellen [Sandrin et al., 2003], konnten die Transduktionseffizienzen mittlerweile deutlich verbessert werden. Dennoch hängt die Effizienz weiterhin stark vom Titer der zur Transduktion benutzten Viruspräparation ab. Zur Produktion hochtitriger retroviraler Vektorpräparationen steht hier zwar eine große Anzahl von Methoden mit stabiler oder transienter Expression von Helferfunktionen zur Verfügung [Mulligan, 1993; Yang et al., 1999], jedoch können für individuelle Vektor-Konstrukte immer wieder Probleme bei der Erzeugung hochtitriger Viruspräparationen auftreten. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit für die Produktion hochinfektöser Titer ein neuartiges Verfahren unter Zuhilfenahme stabiler Produzentenzelllinien entwickelt [Rattmann et al., 2007]. Hierbei wurde die von G. Nolan (Stanford) eingeführte FNX-Verpackungszelllinie verwendet, die in der Regel zur transienten Virusproduktion eingesetzt wird [Kinsella and Nolan, 1996]. Diese Zelllinie basiert auf humanen 293T-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie, [Dubridge et al., 1987]), welche mit den retroviralen Genen *gag/pol*- und *eco-env* stabil transfiziert wurden. Diese Gene befinden sich auf zwei voneinander unabhängigen Plasmiden, wodurch die Bildung rekombinanter replikationskompetenter Viren durch homologe Rekombination erschwert wird [Markowitz et al., 1988]. Bei diesen Konstrukten wurden zudem die 5'-LTRs vollständig durch den CMV-Promotor (*eco-env*-Konstrukt) bzw. den RSV-Promotor (*gag/pol*-Konstrukt) ersetzt, um homologe Regionen und damit die Fähigkeit zur Replikation zwischen den verwendeten Konstrukten bzw. dem retroviralen Vektor zu verringern. Es wären also mindestens drei Rekombinationsereignisse notwendig, um replikationskompetente Viren entstehen zu lassen. Da dies sehr unwahrscheinlich ist gilt diese Verpackungszelllinie als besonders sicher.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Technologie erlaubt die reproduzierbare Herstellung hochtitriger retroviraler Präparationen mit vertretbarem Zeit- und Materialaufwand. Dabei wurden zunächst stabile FNX-eco-basierte polyklonale Produzentenzelllinien hergestellt, mit denen virushaltige Überstände mit Titern von 5 bzw. 50×10^2 IE/ml für die SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}- bzw. SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}-Vektoren erzeugt werden konnten. Die Titer wurden anschließend durch eine Zytostatika-Selektion der Produzentenzellen mit BG und TMZ auf 2×10^6 IE/ml erhöht, was eine Steigerung des Titers um das 4000-fache (SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}) bzw. das 400-fache (SF91-EGFP-IRES-MGMT^{P140K}) bedeutet. Mit diesen Titern war es möglich, primäre hämatopoetische Zellen mit einer Effizienz von 15 - 30 % zu transduzieren. Eine weitere Erhöhung der Titer wäre möglich, indem diese polyklonalen Produzentenzellen kloniert und somit noch höhertitrigere monoklonale Klone produziert würden wie es bereits Studien gezeigt haben [Green and Rasko, 2002; Sheridan et al., 2000]. Die hier erzielten Titer waren jedoch ausreichend, um die funktionelle Genexpression der β c-Kette wieder herzustellen, so dass eine weitere Klonierung der Produzentenzellen nicht nötig war.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Erzeugung hochtitriger Viruspräparationen mit ekotropem Wirtsspektrum beschrieben. Die hier entwickelte neuartige Technologie sollte sich jedoch unter Verwendung von FNX-ampho-, FNX-GALV- oder FNX-RD114-Verpackungszellen auch für die Produktion von amphotropen, GALV- oder RD114-pseudotypisierten Retroviren, die humane Zellen infizieren können, eignen. Stabile Zelllinien stellen vor allem im Hinblick auf eine wiederholte Nutzung desselben Vektorkonstruktes eine zuverlässige, kostengünstige und schnelle Methode dar, um reproduzierbar auch größere Mengen von Präparationen mit hohen Virustitern zu gewinnen. Darüber hinaus hat diese Methode den Vorteil, dass nicht nach jeder Viruspräparation der Überstand neu titriert werden muss, wie Langzeituntersuchungen zur Stabilität der generierten Titer belegen [Rattmann et al., 2007]. Die Zeitdauer bis zur Herstellung einer hochtitrigen stabilen polyklonalen Produzentenzelllinie in dieser Arbeit betrug 4 Wochen. Zwar wird bei der Virusherstellung mit Hilfe der transienten Transfektion mit ca. 1 Woche deutlich weniger Zeit benötigt, das Verfahren hat jedoch den großen Nachteil, dass die Höhe der Titer bei unterschiedlichen Transfektionen stark schwanken können. Daher ist es in der Regel erforderlich, für jede einzelne Virusproduktion eine Titration der

virushaltigen Überstände durchzuführen, was wiederum nochmals bis zu einer Woche Zeit in Anspruch nimmt.

Die Selektion von stabilen Produzentenzellen für die Produktion hochtitriger retroviraler Überstände ist möglich bei Vektoren, die ein selektierbares Markergen enthalten. In früheren Studien wurde hierzu bereits eine Vielzahl anderer Resistenzgene eingesetzt wie z.B. das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, welches eine Resistenz gegenüber dem Neomycin-Analogon G418 vermittelt und damit eine pharmakologische Selektion ermöglicht [Southern and Berg, 1982]. Dabei kann die Selektierbarkeit dieser Markergene auf unterschiedlichen Wirkungsmechanismen beruhen. So können transduzierte Zellen z.B. durchflusszytometrisch bei Markierung mit einem fluoreszierenden Farbstoff wie EGFP, EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) oder ECFP (enhanced cyano fluorescent protein) selektiert werden. Alternativ können zur durchflusszytometrischen Selektion modifizierte (nichtfunktionelle) Formen von Zelloberflächenproteinen wie Spleißvarianten des CD34-Oberflächenmarkers [Fehse et al., 2000] oder die verkürzte Version des NGF- (Nerve growth factor-) Rezeptors [Valtieri et al., 1994] eingesetzt werden, die auf normalen Zellen nicht vorkommen und sich durch spezifische fluoreszenzgekoppelte Antikörper im Durchflusszytometer leicht nachweisen lassen. Mit solchen Methoden können auch im großen Maßstab hochtitrige Produzentenkclone im 96-Lochplatten-Format hergestellt werden [Green and Rasko, 2002]. Die Daten der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass auch Zytostatika-Resistenzgene wie z.B. die MGMT^{P140K}-Mutante in Kombination mit einer kombinierten BG/TMZ-Behandlung, ein großes Potential für die Selektion hochtitriger Produzentenzelllinien besitzen.

4.3 Effekt des m β c-Gentransfers auf die Hämatopoese

In humanen und murinen hämatopoetischen Zellen bildet die gemeinsame β -Rezeptorkette zusammen mit den spezifischen α -Rezeptorketten, welche jeweils die Zytokine GM-CSF, IL-3 oder IL-5 binden, einen Komplex der zu einer Signaltransduktion führt, die das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Zelle beeinflusst [De Groot et al., 1998; Martinez-Moczygemba and Huston, 2003]. Nishinakamura et al. und Robb et al. generierten unabhängig voneinander

$m\beta c^{-/-}$ -Mäuse [Nishinakamura et al., 1995; Robb et al., 1995], bei denen jedoch unerwarteterweise nur geringe Veränderungen der normalen Hämatopoese beobachtet wurden [Nishinakamura et al., 1996a]. Die hämatopoetischen Zellen der $m\beta c^{-/-}$ -Mäuse waren zwar unfähig, *in vivo* in Anwesenheit von GM-CSF oder IL-5 Kolonien in CFU-C-Assays zu bilden, reagierten aber auf IL-3 sowie einer βc -unabhängigen Zytokin-Kombination aus SCF, IL-6 und EPO mit normalem Koloniewachstum [Nishinakamura et al., 1995]. Obwohl eine Vielzahl von Effekten nach exogener Applikation von GM-CSF, IL-3 oder IL-5 auf humane und murine hämatopoetische Zellen *in vitro* wie auch *in vivo* beschrieben wurde, wie z.B. ein letal verlaufendes myeloproliferatives Syndrom nach GM-CSF- oder IL-3-Überexpression, Stammzellmobilisierung nach GM-CSF-Gabe oder eine Eosinophilie nach IL-5-Überexpression [Baldwin, 1992; Huffman Reed et al., 1997; Martinez-Moczygema and Huston, 2003; Metcalf et al., 1986; Morris et al., 1990; Sanderson, 1992], konnte in $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen angesichts des Defektes dieser Signaltransduktionswege als einzige Abnormität eine Reduktion der Eosinophilenzahlen im peripheren Blut und im Knochenmark beobachtet werden. Diese Reduktion der Eosinophilen beruht wahrscheinlich auf der fehlenden IL-5-Funktion [Nishinakamura et al., 1995; Robb et al., 1995]. Das Fehlen von IL-3-Entzug-bedingten Abnormitäten in den $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen kann durch die spezifische β_{IL3} -Signaltransduktionskette erklärt werden [Hara and Miyajima, 1992], die im murinen, nicht aber im humanen System vorkommt. Diese spezifische Kette ist eine zweite β -Untereinheit, die eine 91%ige Homologie auf Aminosäureebene zur βc -Kette aufweist [Gorman et al., 1992] und die einen Komplex mit der IL-3- α -Kette und dem murinen IL-3 bilden kann, aber nicht mit den α -Ketten der murinen GM-CSF- und IL-5-Rezeptoren [Itoh et al., 1990].

Diese Studien lassen darauf schließen, dass GM-CSF, trotz der Bedeutung, die es für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen *in vitro* hat und seiner weitreichenden Effekte auf die Hämatopoese, wenn es exogen verabreicht oder *in vivo* überexprimiert wird [Brown et al., 2004; Burdach et al., 1998; Christopherson et al., 2006; Wadhwa et al., 2003], keine kritische Rolle in der normalen Hämatopoese spielt und dass hier andere Wachstumsfaktoren die GM-CSF-Funktion kompensieren können [Dranoff et al., 1994; Stanley et al., 1994]. Diese Substitution ist vielleicht nicht vollständig, da kürzlich geringfügige, aber distinkte Maturationsdefekte entlang der myeloiden

Differenzierung in GM-CSF-defizienten Mäusen sowie PAP-Patienten beschrieben wurden, sowie Neutrophile in diesen Mäusen/Patienten nachgewiesen wurden, die eine Verminderung der Phagozytose-, Adhäsions-, H₂O₂-Produktion- und Staphylococcus-Abtötungsfähigkeit zeigten (Bruce C. Trapnell, Cincinnati Childrens Hospital Medical Center, pers. Mitteilung).

Die Wiederherstellung des GM-CSF-abhängigen Koloniewachstums von hämatopoetischen $m\beta c^{-/-}$ -Vorläuferzellen wurde nach Transduktion dieser Zellen zunächst *in vitro* sowie nach hämatopoetischen Stammzell-Gentransfer in einem murinen *In-vivo*-Modell der $m\beta c$ -defizienten PAP gezeigt. Um den erfolgreichen Gentransfer im *In-vivo*-Modell zu demonstrieren, wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit mit den transduzierten $m\beta c^{-/-}$ -KM-Zellen nach Versuchsende ein *Ex-vivo*-Assay durchgeführt. Dazu wurden die transduzierten $m\beta c^{-/-}$ -Zellen und nicht-transduzierte Kontrollzellen in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert und hierbei eine signifikante Koloniebildung der transduzierten $m\beta c^{-/-}$ -Zellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigten deutlich die funktionelle Expression der $m\beta c$ -cDNA in hämatopoetischen $m\beta c^{-/-}$ -Zellen nach retroviralem Gentransfer. Als Kontrollen dienten bei diesen Arbeiten das Koloniewachstum in Anwesenheit von G-CSF, EPO und SCF, aber auch in Anwesenheit von IL-3. Das Koloniewachstum in Anwesenheit von IL-3 in $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen wurde bereits 1995 von anderen Gruppen beschrieben [Nishinakamura et al., 1995; Robb et al., 1995] und lässt sich durch die Präsenz der β_{IL-3} -Kette erklären. Außerdem reproduzierten die Daten der vorliegenden Arbeit die Beobachtungen von Nishinakamura et al., die zeigten, dass unter Zugabe von βc -unabhängigen Zytokinen wie z.B. EPO allein oder SCF, IL-6 und EPO vergleichbare Koloniezahlen von KM-Zellen aus $m\beta c^{-/-}$ - oder Wildtypmäusen beobachtet werden konnten [Nishinakamura et al., 1995].

Bei der Untersuchung der *In-vitro*-GM-CSF-Sensitivität im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich ein vergleichbares Sensitivitätsprofil für SF91- $m\beta c$ -IRES-MGMT^{P140K}-transduzierte $m\beta c^{-/-}$ -Zellen bzw. transduzierte und nicht-transduzierte Wildtypzellen. Dabei wurde auch in transduzierten Wildtypzellen weder ein Anstieg in der Koloniebildung in Gegenwart von GM-CSF noch ein Anstieg in der GM-CSF-Sensitivität im Vergleich zu nicht-transduzierten Wildtypzellen beobachtet. Diesen Daten könnten möglicherweise eine größere Bedeutung im Rahmen der

Sicherheitsdebatte bei einer zukünftigen therapeutischen Anwendung des β c-Gentransfers bei Patienten mit β c-defizienter PAP zukommen, da sie andeuten, dass zum einen eine ausreichende Gendosis in den genetisch reparierten β c^{-/-}-Zellen erreicht werden kann, zum anderen aber auch, dass eine erhöhte Gendosis von β c wahrscheinlich kein entscheidendes Problem für hämatopoetische Zellen darstellt. Diese Beobachtungen werden durch die murinen *In-vivo*-Daten erhärtet, die zeigten, dass alle Mäuse keine offensichtlichen hämatologischen Abnormitäten nach m β c-Gentransfer aufzeigten.

4.4 Korrektur der PAP durch den m β c-Gentransfer *in vivo*

Viel beeindruckender als die Auswirkungen auf die Hämatopoese war der Effekt der genetischen Korrektur des m β c-Defekts in den Lungen der behandelten Tiere. Hier bewirkte der m β c-Gentransfer in hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen eine fast komplette Korrektur der pulmonalen Pathologie innerhalb von 12 Wochen nach Transplantation von SF91-m β c-IRES-MGMT^{P140K}-transduzierten KM-Zellen. In m β c^{-/-}-Mäusen mit genetischer Korrektur des hämatopoetischen Systems wurden nur noch kleine Reste von Surfactant-Protein-Ablagerungen in den Alveolarräumen sowie eine merkliche Reduktion der peribronchiovaskulären Lymphozyteninfiltrate in den Lungen beobachtet. Diese Korrektur des Lungen-Phänotyps war unabhängig von der *In-vivo*-Selektion transduzierter Zellen mit BG/TMZ, eine Beobachtung die vor allem angesichts der relativ geringen Gentransfereffizienz mit nur 15 - 30% der Gesamthämatopoese in diesen Experimenten bemerkenswert ist. Wenn dies in Bezug auf die tatsächlich genetisch korrigierten Zellen, die initial transplantiert wurden, umgerechnet wird, bedeutet dies, dass ca. 0,6 - 1,2 x 10⁶ Zellen in den beiden durchgeführten *In-vivo*-Versuchen ausreichten, um eine nahezu komplette Korrektur der Lungenpathologie zu erreichen. Diese Ergebnisse korrelieren weitgehend mit Daten von Nishinakamura et al. und Cooke et al. [Cooke et al., 1997; Nishinakamura et al., 1996b], die nach Transplantation von 1 x 10⁶ Wildtyp-KM-Zellen in m β c^{-/-}-Mäuse nach 6 Monaten eine Korrektur der Lungenpathologie demonstrierten, die sich sowohl in einer Reduktion der PAS-positiven Protein-Ablagerungen als auch in der Reduktion der peribronchiovaskulären Lymphozyteninfiltrate äußerte. Nishinakamura et al. [Nishinakamura et al., 1996b]

beschrieben hier nach 8 Wochen noch geringe multifokale Akkumulationen von mononukleären Zellen um die Bronchiolen und Blutgefäße in einigen Bereichen, aber kein intraalveoläres Material und 12 Wochen nach Transplantation eine nahezu normale Lungenhistologie. Cooke et al. [Cooke et al., 1997] konnten bei der Analyse 6 Monate nach Transplantation ähnliche Beobachtungen machen. Hier war ein vollständiger Rückgang der PAS-positiven Protein-Ablagerungen zu beobachten. Allerdings waren weiterhin signifikante zelluläre Infiltrate zu beobachten. Zusätzlich zu dem histologischen Nachweis des Proteinmaterials in den Lungen beobachteten Scott et al. bei den Untersuchungen der Bronchio-Alveolaren-Lavage (BAL) in $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen eine erhöhte Zahl von Lymphozyten, Neutrophilen und Makrophagen. Große, „foamy“-förmige Zellen in der BAL konnten dabei als Alveolarmakrophagen identifiziert werden, wobei funktionelle Analysen die Fähigkeit dieser Zellen zur Phagozytose belegten, aber eine Reduktion der zellulären Adhäsion aufzeigten [Scott et al., 1998]. Ebenso beschrieben Trapnell et al., dass trotz funktionsfähiger Phagozytose keine Degradation des akkumulierten Surfactant-Proteins in $m\beta c^{-/-}$ -Mäusen mehr vollzogen werden kann [Trapnell and Whitsett, 2002]. Cooke et al. beobachteten 6 Monate nach Transplantation von Wildtyp-KM-Zellen in $m\beta c^{-/-}$ -Mäuse einen Rückgang der Zellularität auf Normalwerte in der BAL [Cooke et al., 1997]. Hingegen demonstrierten Studien in GM-CSF-defizienten PAP-Mäusen, dass sich die Lungenstruktur bereits nach 5 Wochen nach Adenovirus-vermittelter GM-CSF-Gabe normalisierte [Zsengeller et al., 1998]. Somit legen die Daten der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit der bisherigen Literatur nahe, dass sich die PAP-Symptomatik nach Korrektur der defekten GM-CSF-Signaltransduktion in einem relativ kurzen Zeitraum weitgehend bzw. vollständig rückbilden kann.

4.5 Selektionen mit Chemotherapie-Resistenzgenen

Bei monogenen Erkrankungen mit einer Manifestation des Gendefekts in ausdifferenzierten Zellen ist zu erwarten, dass der Transfer des korrigierenden Gens allein noch keinen Selektionsvorteil bedeutet und so der Prozentsatz korrigierter Zellen im hämatopoetischen Kompartiment von dem Prozentsatz der initial transduzierten Stammzellen abhängig ist. Eine Reihe von Studien hat sich daher mit dem gleichzeitigen Transfer von Resistenzgenen im Kontext von

Chemotherapiebehandlungen als zusätzlichen Selektionsmarker beschäftigt. Das erste Resistenzgen, das in hämatopoetische Zellen transferiert wurde, war eine mutante Form des DHFR-Gens [Williams et al., 1987], das ein Schlüsselenzym im Folatstoffwechsel kodiert und die Reduktion von Dihydrofolat zum metabolisch aktiven Tetrahydrofolat katalysiert [Chu et al., 2001]. Weitere in hämatopoetische Stammzellen transferierte Resistenzgene sind das MDR-1-Gen [Abonour et al., 2000; Schiedlmeier et al., 2002] sowie das Gen für die Cytidineaminase [Momparker et al., 1996], die Aldehyddehydrogenase [Takebe et al., 2002] oder die Glutathion-S-Transferase [Matsunaga et al., 2000], von denen bislang jedoch nur für das MDR-1-Gen eine Selektion transduzierter humaner Zellen auf der Ebene des Stammzell-Kompartiments beschrieben ist [Abonour et al., 2000].

Ein aufgrund seiner guten Selektierbarkeit besonders intensiv untersuchtes Resistenzgen ist die in der vorliegenden Arbeit verwendete O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) bzw. deren O⁶-Benzylguanin-(BG)-resistente Punktmutante MGMT^{P140K} [Jansen et al., 2002; Moritz et al., 1995; Neff et al., 2005]. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Expression der MGMT^{P140K}-transduzierten Zellen eine Resistenz gegenüber O⁶-alkylierenden wie chloroethylierenden Substanzen, wie z.B. TMZ oder BCNU, verleiht und dies unter kombinierter BG/TMZ-Applikation in einer Anreicherung transduzierter Zellen *in vitro* und *in vivo* resultiert [Jansen et al., 2002; Pollok et al., 2003; Ragg et al., 2000; Sawai et al., 2001]. In neueren Studien wurde diese Eigenschaft der MGMT^{P140K} ausgenutzt und sie als zusätzlicher Selektionsmarker zusammen mit therapeutischen Genen koexprimiert. Persons et al. verwendeten dieses Selektionssystem in einem murinen Modell der β -Thalassämie [Persons et al., 2003]. Diese erbliche Erkrankung äußert sich in einer funktionellen Beeinträchtigung der roten Blutzellen bedingt durch eine Defizienz der γ -Globin-Expression und ist durch eine schwere Anämie charakterisiert. In ihrem β -Thalassämie-Modell transduzierten Persons et al. zunächst Wildtyp-KM-Zellen retroviral mit einem MGMT^{P140K}-Konstrukt, vermischten diese mit β -Thalassämie-KM-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen mit jeweils einem Überschuss an β -thalassämischen Zellen und transplantierten diese Zellmischungen in lethal bestrahlte Wildtypmäuse, um thalassämische Mäuse zu erhalten. Sechs Wochen nach Transplantation wurden die Tiere anämisch und im peripheren Blut waren die für die β -Thalassämie charakteristischen roten Blutzellen zu beobachten. Sechs von

10 Tieren, die dann einer Behandlung mit BG/TMZ unterzogen wurden, zeigten eine *In-vivo*-Selektion der transduzierten Wildtypzellen sowie einen Anstieg der Hämoglobin-Konzentration, was auf einer Substitution der pathologischen β -thalassämischen roten Blutzellen durch funktionell intakte rote Blutzellen aus transduzierten Wildtypzellen beruhte. Hingegen zeigte nur eins von 5 Tieren ohne BG/TMZ-Behandlung rote Blutzellen des Spenders. Einundzwanzig Wochen nach der Transplantation konnten noch bei vier der 10 BG/TMZ-behandelten Tiere ein stabiler Anteil MGMT^{P140K}-transduzierter Zellen sowie eine andauernde hämatologische Korrektur nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden β -Thalassämie-Mäusen human- γ -Globin/MGMT^{P140K}-transduzierte Wildtyp-KM-Zellen transplantiert (Transduktionsrate ca. 1%), wobei fünf von sieben BG/TMZ-behandelten Mäusen einen markanten Anstieg von humanem γ -Globin zeigten (ca. 80%), während bei nicht-behandelten Tieren kein humanes γ -Globin nachzuweisen war. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2004 zeigte die *In-vivo*-Selektion durch BG/BCNU in einem murinen Modell der Erythropoetischen Protoporphyrin (EPP), eines erblichen Defekts des Eisenchelatase-Gens (Ferrochelatase, FECH), der durch die Akkumulation von toxischem Protoporphyrin in der Leber und dem Knochenmark charakterisiert ist und in einer schweren Haut-Photosensitivität resultiert [Richard et al., 2004]. Bei EPP-Mäusen, denen FECH/MGMT^{G156A}-transduzierte Zellen (70% Gentransferrate mit 2 - 5 Kopien pro Zelle) transplantiert wurden und die anschließend eine Behandlung mit BG/BCNU durchliefen, konnte der Rückgang des Porphyrins in den roten Blutzellen und somit die Korrektur des pathologischen Phänotyps beobachtet werden. Diese Beobachtungen konnten ebenso in sekundär-transplantierten Tieren nach Chemotherapie gemacht werden. Diese Studien unterstützen die Hypothese, dass sich eine Koexpression von MGMT-Mutanten gut für die Selektion retroviral transduzierter hämatopoetischer Zellen eignet, wenn der Defekt der Krankheit nur in differenzierten hämatopoetischen Zellen manifestiert ist.

In Analogie zu den vorgenannten Studien konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Selektion mit Hilfe der MGMT^{P140K}-Punktmutante zu einer effektiven Anreicherung der transduzierten Zellen *in vitro* und *in vivo* führte. Allerdings hatte dies in unserem Modell keinen Einfluss auf die Korrektur der Lungenpathologie der $m\beta c^{-/-}$ -Mäuse. Der Grund dafür könnte in den wesentlich höheren initialen Transduktionsraten mit ca. 13,5% in Exp.1 und 24 - 35% in Exp. 2

liegen, wobei bei Persons et al. initial nur ca. 1% der transplantierten Zellen transduziert waren. Es gilt natürlich im Hinblick auf mögliche klinische Studien Vor- und Nachteile hoher bzw. niedriger Gentransferraten abzuwägen: Eine höhere Gentransferrate, hoch genug, um den Gendefekt zu beheben und damit den Patienten zu heilen, geht einher mit dem Risiko, eine höhere Kopienzahl des Provirus pro Zelle zu erreichen und damit ein höheres Risiko einer Insertionsmutagenese zu haben [Baum et al., 2006a; Kustikova et al., 2003]. Dem gegenüber steht die Verwendung eines Selektionssystems, das eine geringe Gentransferrate erlaubt, so dass nur eine Kopie pro Zelle vorliegt. Hierbei liegt das Risiko darin, dass Zytostatika mögliche toxische Effekte auf den Organismus zur Folge haben könnten. Hierbei ist natürlich ebenso zu beachten, dass eine mögliche im Maus-Modell auftretende Toxizität, nicht unbedingt die Situation im humanen System reflektiert. Sowohl Phase I- als auch Phase II-Studien haben die sichere Administration alkylierender Substanzen wie Carmustin (BCNU) und BG in Krebspatienten demonstriert [Gerson, 2002; Quinn et al., 2002]. Die erwartete hämatopoetische Toxizität wurde zwar beobachtet, die Behandlung wurde aber insgesamt gut toleriert. Ebenso zeigten mehrere Studien die sichere orale Applikation von TMZ, und Phase I-Studien zur Evaluierung einer kombinierten Gabe von TMZ und BG sind bereits angelaufen [Hammond et al., 1999; Yung et al., 2000]. Aber natürlich gilt es auch hier, zunächst das Risiko einer TMZ-Gabe bei Patienten mit nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen zu prüfen sowie mögliche Langzeiteffekte zu evaluieren.

4.6 Ausblick und weitere Sicherheitserwägungen

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, dass der m β c-Gentransfer in hämatopoetische Zellen m β c-defizienter Mäuse eine Rekonstitution der β c-Signaltransduktionskette *in vitro* und *in vivo* sowie auch eine Reduktion des akkumulierten PAS-positiven Proteinmaterials und der peribronchiolären Lymphozyteninfiltrate in den Alveolarräumen therapeutierter m β c^{-/-}-Mäuse bewirkte. Dieser Befund kann gewissermaßen als ein „proof of principle“ für eine m β c-spezifische Gentherapie angesehen werden. In weiterführenden Experimenten soll nun geklärt werden (a) in welchem Zeitraum sich die Korrektur der Lungenpathologie

abspielt, (b) wie viele Zellen mindestens notwendig sind, um den Gendefekt zu korrigieren, (c) welche Gentransferraten und somit Expressionshöhen transduzierte KM-Zellen mindestens aufweisen müssen, um den Phänotyp der β c-PAP der Mäuse zu verändern und (d) ob eine einmalige Selektion zu einer langfristigen stabilen Anreicherung korrigierter Zellen führt. Sicherlich gilt es zudem, dieses Modell an eine klinische Applikation anzupassen, und natürlich sind vor dem klinischen Einsatz noch eine Reihe weiterführender Untersuchungen bezüglich der Sicherheit und der Effizienz dieser Behandlung und der zu verwendenden Vektoren notwendig.

Wie bei allen anderen Behandlungsmodalitäten spielt, wie bereits erwähnt, natürlich auch bei retroviralen Gentransfersystemen die Frage nach der Sicherheit eine besondere Rolle. So wurden im Fall der französischen SCID-X1-Gentherapie-Studie, in der die gemeinsame IL-2-Rezeptor- γ -Kette retroviral in primäre hämatopoetische Zellen eingebracht wurde, bei drei der 10 Patienten Insertionsmutagenese-bedingte Leukämien beobachtet [Hacein-Bey-Abina et al., 2003]; Hacein-Bey-Abina, mündliche Präsentation 2005, Kongress der Europäischen Gesellschaft für Gentherapie, Prag]. In diesem Zusammenhang stellt die IL-2-Rezeptor- γ -Kette selbst als ein mögliches Onkogen [McCormack and Rabbits, 2004; Woods et al., 2006] einen weiteren potentiell ursächlichen oder zur Leukämogenese beitragenden Faktor dar, auch wenn in diesem Zusammenhang noch viele Fragen offen sind [Baum et al., 2006a; Von Kalle et al., 2004]. Daher muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden, ob auch durch den Gentransfer der gemeinsamen β c-Kette der GM-CSF-/IL-3-/IL-5-Rezeptorfamilie ähnliche maligne Veränderungen der Hämatopoese entstehen können. Ebenso stellt die Auswahl des Vektorkonstruktes einen wesentlichen Sicherheitsaspekt im Rahmen des klinischen Gentransfers dar. Hierbei befassen sich zurzeit eine Vielzahl von Studien mit der Optimierung retro- und lentiviraler Vektoren, um den klinischen Einsatz sicherer zu gestalten [Baum et al., 2006a; Baum et al., 2006b; Kraunus et al., 2004; Nienhuis et al., 2006]. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der klinischen Umsetzung des hier vorgestellten Konzepts ist die dafür notwendige Gabe von Zytostatika zur Selektion. DNA-reaktive Alkylationen wie das TMZ induzieren nicht nur die hochtoxischen O⁶-Guanin-Addukte, sondern auch häufig und in höherem Ausmaß andere Alkylierungsprodukte. In Zellen, die zwar vor einer akuten O⁶-Alkylguanin-vermittelten Toxizität durch eine hohe MGMT-Aktivität geschützt sind und somit höhere Dosen dieser Medikamente tolerieren, führt jedoch

die erhöhte Dosierung zu einem Anstieg der anderen, nicht-MGMT-reparablen DNA-Läsionen [Beranek, 1990]. Diese Aspekte gilt es bei Weiterentwicklung in Richtung auf klinische die Anwendung ebenfalls zu berücksichtigen.

Sicherlich ist die Beantwortung vieler dieser Fragen nicht einfach und stellt eine Herausforderung für die Entwicklung sicherer klinischer Protokolle dar. Andererseits werden diese Aspekte jedoch von einer ganzen Reihe von Arbeitsgruppen derzeit angegangen und erfolgreiche Gentherapie-Studien zur SCID-X1, ADA-SCID, sowie der Chronischen Granulomatose belegen eindeutig das erhebliche therapeutische Potential der Blutstammzell-Gentherapie. Vor diesem Hintergrund erscheint der β c-Gentransfer in hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen mittelfristig durchaus eine realistische Behandlungsoption zu sein, um Kinder, die an der zurzeit gewöhnlich letal verlaufenden β c-defizienten PAP leiden, zu behandeln.

5 Zusammenfassung

Die β c-defiziente Pulmonale Alveolarproteinose (β c-PAP), die durch das Fehlen der gemeinsamen β -Kette (β c) der IL-3-/IL-5-/GM-CSF-Rezeptoren charakterisiert ist, stellt eine monogene Erkrankung dar, die durch eine funktionelle Insuffizienz der pulmonalen Alveolarmakrophagen bedingt ist. Hämatopoetische Stammzell-Gentherapie könnte die defekte β c-Rezeptorkette in den Alveolarmakrophagen korrigieren und eine kurative Behandlungsoption darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es, in einem murinen $m\beta$ c-„knock out“-Modell den Effekt des $m\beta$ c-Gentransfers *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Dazu wurde im ersten Schritt ein retroviraler Vektor konstruiert, der die cDNA der murinen- β c ($m\beta$ c)-Kette in Kombination mit der cDNA einer Punktmutante des Chemotherapie-Resistenzgens O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT^{P140K}) als selektierbaren Marker exprimiert. Für eine effiziente Transduktion hämatopoetischer Zellen war es dann notwendig, hochtitrige Viruspräparationen zu generieren. Dazu wurde eine neue stabile ekotrope Verpackungszelllinie hergestellt, die es ermöglichte, Viruspräparationen mit infektiösen Titern von bis zu 2×10^6 IE/ml zu produzieren. Mit diesen Viruspräparationen ließ sich eine Gentransfereffizienz von 13 - 35% in primären hämatopoetischen Zellen $m\beta$ c-defizienter Mäuse erreichen.

In vitro konnte durch den retroviralen Gentransfer der $m\beta$ c-cDNA in hämatopoetische Vorläuferzellen von $m\beta$ c^{-/-}-Mäusen eine Wiederherstellung der GM-CSF-Antwort erreicht werden, wie sich durch eine Koloniebildung von korrigierten KM-Zellen in Gegenwart von GM-CSF nachweisen ließ. Die GM-CSF-Sensitivität derartig „reparierter“ $m\beta$ c^{-/-}-Zellen entsprach der von KM-Zellen aus Wildtypmäusen. In Wildtyp-KM-Zellen wurde zumindest in den Experimenten der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der GM-CSF-Sensitivität nach zusätzlicher transgener $m\beta$ c-Expression beobachtet. Zudem konnte *in vitro* eine funktionelle MGMT^{P140K}-Expression nach Gentransfer durch eine erhöhte Resistenz transduzierter Vorläuferzellen in klonogenen Assays gegenüber einer kombinierten O⁶-Benzylguanin/Temozolomid (BG/TMZ) Behandlung beobachtet, sowie eine signifikante Anreicherung genetisch korrigierter $m\beta$ c^{-/-}-Zellen nach BG/TMZ-Exposition gezeigt werden.

In der Folge konnte in unserem murinen β c-PAP-Mausmodell auch *in vivo* die Wiederherstellung der GM-CSF-Sensitivität der hämatopoetischen Vorläuferzellen

nachgewiesen werden. Vor allem aber wurde zum ersten Mal gezeigt, dass durch den m β c-Gentransfer eine Rückbildung der pulmonalen Erkrankung erreicht werden kann. Die Alveolarräume der genetisch korrigierten m β c^{-/-}-Mäuse wiesen eine nahezu vollständige Reduktion des akkumulierten PAS-positiven Proteinmaterials sowie der erkrankungstypischen peribronchioalveolären Lymphozyteninfiltrate auf. Eine zusätzliche BG/TMZ-Behandlung führte zu einer effektiven *In-vivo*-Anreicherung transduzierter Zellen in den korrigierten m β c^{-/-}-Mäusen, war jedoch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zur Behebung der pulmonalen Erkrankung nicht erforderlich.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die genetische wie funktionelle Korrektur des Defekts in m β c^{-/-}-Zellen *in vitro* wie auch *in vivo* möglich ist, und die MGMT^{P140K}-Expression bei Bedarf die Anreicherung genetisch korrigierter Zellen zulässt. Damit ist ein wichtiger erster Schritt in Richtung einer potentiellen klinischen Anwendung des retroviralen β c-Gentransfers als mögliche Behandlungsmethode der β c-PAP getan.

6 Literatur

- Abonour R, Williams DA, Einhorn L, Hall KM, Chen J, Coffman J, Traycoff CM, Bank A, Kato I, Ward M, Williams SD, Hromas R, Robertson MJ, Smith FO, Woo D, Mills B, Srouf EF, Cornetta K. (2000). Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med*; **6**: 652-8.
- Adam MA, Ramesh N, Miller AD, Osborne WR. (1991). Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus 5' nontranslated regions. *J Virol*; **65**: 4985-90.
- Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*; **121**: 295-306.
- Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*; **296**: 2410-3.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*; **404**: 193-7.
- Allay JA, Persons DA, Galipeau J, Riberdy JM, Ashmun RA, Blakley RL, Sorrentino BP. (1998). In vivo selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat Med*; **4**: 1136-43.
- Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. (1986). Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood*; **67**: 842-5.
- Apperley JF, Luskey BD, Williams DA. (1991). Retroviral gene transfer of human adenosine deaminase in murine hematopoietic cells: effect of selectable marker sequences on long-term expression. *Blood*; **78**: 310-7.
- Arai T, Hamano E, Inoue Y, Ryushi T, Nukiwa T, Sakatani M, Nakata K. (2004). Serum neutralizing capacity of GM-CSF reflects disease severity in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with inhaled GM-CSF. *Respir Med*; **98**: 1227-30.
- Aran JM, Gottesman MM, Pastan I. (1994). Drug-selected coexpression of human glucocerebrosidase and P-glycoprotein using a bicistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **91**: 3176-80.
- Baldwin GC. (1992). The biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effects on hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Dev Biol*; **151**: 352-67.
- Bardenheuer W, Lehmborg K, Rattmann I, Brueckner A, Schneider A, Sorg UR, Seeber S, Moritz T, Flasshove M. (2005). Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*; **19**: 2281-8.

- Baum C, Hegewisch-Becker S, Eckert HG, Stocking C, Ostertag W. (1995). Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol*; **69**: 7541-7.
- Baum C, von Kalle C, Staal FJ, Li Z, Fehse B, Schmidt M, Weerkamp F, Karlsson S, Wagemaker G, Williams DA. (2004). Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther*; **9**: 5-13.
- Baum C, Kustikova O, Modlich U, Li Z, Fehse B. (2006a). Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*; **17**: 253-63.
- Baum C, Schambach A, Bohne J, Galla M. (2006b). Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther*; **13**: 1050-63.
- Becker S, Wasser S, Hauses M, Hossle JP, Ott MG, Dinauer MC, Ganser A, Hoelzer D, Seger R, Grez M. (1998). Correction of respiratory burst activity in X-linked chronic granulomatous cells to therapeutically relevant levels after gene transfer into bone marrow CD34+ cells. *Hum Gene Ther*; **9**: 1561-70.
- Beranek DT. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res*; **231**: 11-30.
- Berclaz PY, Shibata Y, Whitsett JA, Trapnell BC. (2002a). GM-CSF, via PU.1, regulates alveolar macrophage Fc γ R-mediated phagocytosis and the IL-18/IFN- γ -mediated molecular connection between innate and adaptive immunity in the lung. *Blood*; **100**: 4193-200.
- Berclaz PY, Zsengeller Z, Shibata Y, Otake K, Strasbaugh S, Whitsett JA, Trapnell BC. (2002b). Endocytic internalization of adenovirus, nonspecific phagocytosis, and cytoskeletal organization are coordinately regulated in alveolar macrophages by GM-CSF and PU.1. *J Immunol*; **169**: 6332-42.
- Bonfield TL, Russell D, Burgess S, Malur A, Kavuru MS, Thomassen MJ. (2002). Autoantibodies against granulocyte macrophage colony-stimulating factor are diagnostic for pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; **27**: 481-6.
- Bonfield TL, Raychaudhuri B, Malur A, Abraham S, Trapnell BC, Kavuru MS, Thomassen MJ. (2003). PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; **285**: L1132-6.
- Bowtell DD, Cory S, Johnson GR, Gonda TJ. (1988). Comparison of expression in hemopoietic cells by retroviral vectors carrying two genes. *J Virol*; **62**: 2464-73.
- Brown AL, Peters M, D'Andrea RJ, Gonda TJ. (2004). Constitutive mutants of the GM-CSF receptor reveal multiple pathways leading to myeloid cell survival, proliferation, and granulocyte-macrophage differentiation. *Blood*; **103**: 507-16.
- Budak-Alpdogan T, Alpdogan O, Banerjee D, Wang E, Moore MA, Bertino JR. (2004). Methotrexate and cytarabine inhibit progression of human lymphoma in NOD/SCID mice carrying a mutant dihydrofolate reductase and cytidine deaminase fusion gene. *Mol Ther*; **10**: 574-84.
- Burdach S, Nishinakamura R, Dirksen U, Murray R. (1998). The physiologic role of interleukin-3, interleukin-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and the beta c receptor system. *Curr Opin Hematol*; **5**: 177-80.

- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bouso P, Deist FL, Fischer A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*; **288**: 669-72.
- Christopherson KW, 2nd, Uralil SE, Porecha NK, Zabriskie RC, Kidd SM, Ramin SM. (2006). G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34+CD38- human cord blood hematopoietic cells. *Exp Hematol*; **34**: 1060-8.
- Chu E, Mota AC, Fogarasi MC. (2001). Pharmacology of cancer chemotherapy: Antimetabolites. In: Devita, Vtj, Hellman, S, Rosenberg, Sa (eds). *Cancer*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, pp 388-414.
- Coffin JM. 1996. Retroviridae, the viruses and their replication. Lippincott-Raven. Philadelphia.
- Cooke KR, Nishinakamura R, Martin TR, Kobzik L, Brewer J, Whitsett JA, Bungard D, Murray R, Ferrara JL. (1997). Persistence of pulmonary pathology and abnormal lung function in IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor-deficient mice despite correction of alveolar proteinosis after BMT. *Bone Marrow Transplant*; **20**: 657-62.
- Cordonnier C, Fleury-Feith J, Escudier E, Atassi K, Bernaudin JF. (1994). Secondary alveolar proteinosis is a reversible cause of respiratory failure in leukemic patients. *Am J Respir Crit Care Med*; **149**: 788-94.
- Danos O. (1991). Construction of retroviral packaging cell lines. In: Collins, M (ed). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 8. The Humana Press Inc.: Clifton, NJ.
- Davis BM, Roth JC, Liu L, Xu-Welliver M, Pegg AE, Gerson SL. (1999). Characterization of the P140K, PVP(138-140)MLK, and G156A O6-methylguanine-DNA methyltransferase mutants: implications for drug resistance gene therapy. *Hum Gene Ther*; **10**: 2769-78.
- Davis BM, Koc ON, Gerson SL. (2000). Limiting numbers of G156A O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-transduced marrow progenitors repopulate nonmyeloablated mice after drug selection. *Blood*; **95**: 3078-84.
- de Felipe P, Martin V, Cortes ML, Ryan M, Izquierdo M. (1999). Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy. *Gene Ther*; **6**: 198-208.
- De Felipe P, Izquierdo M. (2000). Tricistronic and tetracistronic retroviral vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther*; **11**: 1921-31.
- de Groot RP, Coffey PJ, Koenderman L. (1998). Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal*; **10**: 619-28.
- Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, Hattenhorst U, Noguee L, Murray R, Burdach S. (1997). Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *J Clin Invest*; **100**: 2211-7.
- Dirksen U, Hattenhorst U, Schneider P, Schrotten H, Gobel U, Bocking A, Muller KM, Murray R, Burdach S. (1998). Defective expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 receptor common beta chain in children with acute myeloid leukemia associated with respiratory failure. *Blood*; **92**: 1097-103.

- Donnelly DS, Zeltermann D, Sharkis S, Krause DS. (1999). Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations. *Exp Hematol*; **27**: 788-96.
- Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA, et al. (1994). Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*; **264**: 713-6.
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*; **7**: 379-87.
- Eckert HG, Stockschrader M, Just U, Hegewisch-Becker S, Grez M, Uhde A, Zander A, Ostertag W, Baum C. (1996). High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors. *Blood*; **88**: 3407-15.
- Fehse B, Richters A, Putimtseva-Scharf K, Klump H, Li Z, Ostertag W, Zander AR, Baum C. (2000). CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol Ther*; **1**: 448-56.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*; **75**: 2417-26.
- Flasshove M, Bardenheuer W, Schneider A, Hirsch G, Bach P, Bury C, Moritz T, Seeber S, Opalka B. (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**: 391-9.
- Flasshove M, Moritz T, Bardenheuer W, Seeber S. (2003). Hematoprotection by transfer of drug-resistance genes. *Acta Haematol*; **110**: 93-106.
- Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, Brouns G, Schmidt M, Von Kalle C, Barington T, Jakobsen MA, Christensen HO, Al Ghoniaim A, White HN, Smith JL, Levinsky RJ, Ali RR, Kinnon C, Thrasher AJ. (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet*; **364**: 2181-7.
- Gerson SL, Phillips W, Kastan M, Dumenco LL, Donovan C. (1996). Human CD34+ hematopoietic progenitors have low, cytokine-unresponsive O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O6-benzylguanine plus BCNU. *Blood*; **88**: 1649-55.
- Gerson SL. (2002). Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol*; **20**: 2388-99.
- Golde DW, Territo M, Finley TN, Cline MJ. (1976). Defective lung macrophages in pulmonary alveolar proteinosis. *Ann Intern Med*; **85**: 304-9.
- Gorman DM, Itoh N, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Miyajima A. (1992). Chromosomal localization and organization of the murine genes encoding the beta subunits (AIC2A and AIC2B) of the interleukin 3, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 5 receptors. *J Biol Chem*; **267**: 15842-8.

- Green BJ, Rasko JE. (2002). Rapid screening for high-titer retroviral packaging cell lines using an in situ fluorescence assay. *Hum Gene Ther*, **13**: 1005-13.
- Green D, Dighe P, Ali NO, Katele GV. (1980). Pulmonary alveolar proteinosis complicating chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, **46**: 1763-6.
- Grignani F, Kinsella T, Mencarelli A, Valtieri M, Riganelli D, Lanfrancone L, Peschle C, Nolan GP, Pelicci PG. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res*; **58**: 14-9.
- Gunji Y, Suda T. 1995. Characterization and Enrichment of Human Hematopoietic Stem Cells. Marcel Dekker, Inc.1995.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*; **302**: 415-9.
- Halene S, Kohn DB. (2000). Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest. *Hum Gene Ther*, **11**: 1259-67.
- Hammond LA, Eckardt JR, Baker SD, Eckhardt SG, Dugan M, Forral K, Reidenberg P, Statkevich P, Weiss GR, Rinaldi DA, Von Hoff DD, Rowinsky EK. (1999). Phase I and pharmacokinetic study of temozolomide on a daily-for-5-days schedule in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol*; **17**: 2604-13.
- Hamvas A, Cole FS, deMello DE, Moxley M, Whitsett JA, Colten HR, Nogee LM. (1994). Surfactant protein B deficiency: antenatal diagnosis and prospective treatment with surfactant replacement. *J Pediatr*, **125**: 356-61.
- Hamvas A, Nogee LM, Mallory GB, Jr., Spray TL, Huddleston CB, August A, Dehner LP, deMello DE, Moxley M, Nelson R, Cole FS, Colten HR. (1997). Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *J Pediatr*, **130**: 231-9.
- Hara T, Miyajima A. (1992). Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin-3 (IL-3). *Embo J*; **11**: 1875-84.
- Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T, Miyajima A. (1990). Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **87**: 9655-9.
- Higuchi R. (1989). Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: H.A.Erich (ed). *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press: New York, pp 31-38.
- Hildebrand FL, Jr., Rosenow EC, 3rd, Habermann TM, Tazelaar HD. (1990). Pulmonary complications of leukemia. *Chest*; **98**: 1233-9.
- Hildinger M, Abel KL, Ostertag W, Baum C. (1999). Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol*; **73**: 4083-9.

- Huffman JA, Hull WM, Dranoff G, Mulligan RC, Whitsett JA. (1996). Pulmonary epithelial cell expression of GM-CSF corrects the alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *J Clin Invest*; **97**: 649-55.
- Huffman Reed JA, Rice WR, Zsengeller ZK, Wert SE, Dranoff G, Whitsett JA. (1997). GM-CSF enhances lung growth and causes alveolar type II epithelial cell hyperplasia in transgenic mice. *Am J Physiol*; **273**: L715-25.
- Ito T, Sato M, Okubo T, Ono I, Akabane J. (1999). Infantile pulmonary alveolar proteinosis with interstitial pneumonia: bilateral simultaneous lung lavage utilizing extracorporeal membrane oxygenation and steroid therapy. *Tohoku J Exp Med*; **187**: 279-83.
- Itoh N, Yonehara S, Schreurs J, Gorman DM, Maruyama K, Ishii A, Yahara I, Arai K, Miyajima A. (1990). Cloning of an interleukin-3 receptor gene: a member of a distinct receptor gene family. *Science*; **247**: 324-7.
- Jansen M, Bardenheuer W, Sorg UR, Seeber S, Flasshove M, Moritz T. (2001). Protection of hematopoietic cells from O(6)-alkylation damage by O(6)-methylguanine DNA methyltransferase gene transfer: studies with different O(6)-alkylating agents and retroviral backbones. *Eur J Haematol*; **67**: 2-13.
- Jansen M, Sorg UR, Ragg S, Flasshove M, Seeber S, Williams DA, Moritz T. (2002). Hematoprotection and enrichment of transduced cells in vivo after gene transfer of MGMT(P140K) into hematopoietic stem cells. *Cancer Gene Ther*; **9**: 737-46.
- Keller CA, Frost A, Cagle PT, Abraham JL. (1995). Pulmonary alveolar proteinosis in a painter with elevated pulmonary concentrations of titanium. *Chest*; **108**: 277-80.
- Kiem HP, Andrews RG, Morris J, Peterson L, Heyward S, Allen JM, Rasko JE, Potter J, Miller AD. (1998). Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood*; **92**: 1878-86.
- Kinsella TM, Nolan GP. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther*; **7**: 1405-13.
- Kitamura T, Hayashida K, Sakamaki K, Yokota T, Arai K, Miyajima A. (1991). Reconstitution of functional receptors for human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): evidence that the protein encoded by the AIC2B cDNA is a subunit of the murine GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **88**: 5082-6.
- Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, Uchida, Kanegasaki S, Yamada Y, Nakata K. (1999). Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*; **190**: 875-80.
- Klement V, McAllister RM. (1972). Syncytial cytopathic effect in KB cells of a C-type RNA virus isolated from human rhabdomyosarcoma. *Virology*; **50**: 305-8.
- Kobune M, Xu Y, Baum C, Kelley MR, Williams DA. (2001). Retrovirus-mediated expression of the base excision repair proteins, formamidopyrimidine DNA glycosylase or human oxoguanine DNA glycosylase, protects hematopoietic cells from N,N',N"-triethylenethiophosphoramidate (thioTEPA)-induced toxicity in vitro and in vivo. *Cancer Res*; **61**: 5116-25.

- Koc ON, Reese JS, Szekely EM, Gerson SL. (1999). Human long-term culture initiating cells are sensitive to benzyguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and protected after mutant (G156A) methylguanine methyltransferase gene transfer. *Cancer Gene Ther*, **6**: 340-8.
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, **91**: 661-72.
- Kraunus J, Schaumann DH, Meyer J, Modlich U, Fehse B, Brandenburg G, von Laer D, Klump H, Schambach A, Bohne J, Baum C. (2004). Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing. *Gene Ther*, **11**: 1568-78.
- Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS. (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, **84**: 691-701.
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, **87**: 1-13.
- Kustikova OS, Wahlers A, Kuhlcke K, Stahle B, Zander AR, Baum C, Fehse B. (2003). Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood*.
- Leib DA, Olivo PD. (1993). Gene delivery to neurons: is herpes simplex virus the right tool for the job? *Bioessays*, **15**: 547-54.
- Lin Z, deMello DE, Wallot M, Floros J. (1998). An SP-B gene mutation responsible for SP-B deficiency in fatal congenital alveolar proteinosis: evidence for a mutation hotspot in exon 4. *Mol Genet Metab*, **64**: 25-35.
- Magli MC, Iscove NN, Odartchenko N. (1982). Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. *Nature*, **295**: 527-9.
- Malik P, Krall WJ, Yu XJ, Zhou C, Kohn DB. (1995). Retroviral-mediated gene expression in human myelomonocytic cells: a comparison of hematopoietic cell promoters to viral promoters. *Blood*, **86**: 2993-3005.
- Markowitz D, Goff S, Bank A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol*, **62**: 1120-4.
- Martinez-Moczygemba M, Huston DP. (2003). Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol*, **112**: 653-65; quiz 666.
- Matsunaga T, Sakamaki S, Kuga T, Kuroda H, Kusakabe T, Akiyama T, Konuma Y, Hirayama Y, Kobune M, Kato J, Sasaki K, Kogawa K, Koyama R, Niitsu Y. (2000). GST-pi gene-transduced hematopoietic progenitor cell transplantation overcomes the bone marrow toxicity of cyclophosphamide in mice. *Hum Gene Ther*, **11**: 1671-81.
- McCormack MP, Gonda TJ. (1999). Myeloproliferative disorder and leukaemia in mice induced by different classes of constitutive mutants of the human IL-3/IL-5/GM-CSF receptor common beta subunit. *Oncogene*, **18**: 7190-9.
- McCormack MP, Rabbitts TH. (2004). Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, **350**: 913-22.

- Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Vadas MA, Lopez AF, Williamson DJ, Wong GG, Clark SC, Wang EA. (1986). Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*; **67**: 37-45.
- Miller AD. (1990). Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther*; **1**: 5-14.
- Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol*; **65**: 2220-4.
- Miller AD. 1997. Development and applications of retroviral vectors. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Milsom MD, Woolford LB, Margison GP, Humphries RK, Fairbairn LJ. (2004). Enhanced in vivo selection of bone marrow cells by retroviral-mediated coexpression of mutant O6-methylguanine-DNA-methyltransferase and HOXB4. *Mol Ther*; **10**: 862-73.
- Momparler RL, Eliopoulos N, Bovenzi V, Letourneau S, Greenbaum M, Cournoyer D. (1996). Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther*; **3**: 331-8.
- Morita S, Kojima T, Kitamura T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther*; **7**: 1063-6.
- Moritz T, Mackay W, Glassner BJ, Williams DA, Samson L. (1995). Retrovirus-mediated expression of a DNA repair protein in bone marrow protects hematopoietic cells from nitrosourea-induced toxicity in vitro and in vivo. *Cancer Res*; **55**: 2608-14.
- Moritz T, Dutt P, Xiao X, Carstanjen D, Vik T, Hanenberg H, Williams DA. (1996). Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood*; **88**: 855-62.
- Moritz T, Williams DA. (1998). Methods for Gene Transfer: Genetic Manipulation of Hematopoietic Stem Cells, pp 79-88.
- Moritz T, Williams DA. (2001). Marrow protection - transduction of hematopoietic cells with drug resistance genes. *Cytotherapy*; **3**: 67-84.
- Morris CF, Young IG, Hapel AJ. (1990). Molecular and cellular biology of interleukin-3. *Immunol Ser*; **49**: 177-214.
- Mulligan RC. (1993). The basic science of gene therapy. *Science*; **260**: 926-32.
- Neff T, Peterson LJ, Morris JC, Thompson J, Zhang X, Horn PA, Thomasson BM, Kiem HP. (2004). Efficient gene transfer to hematopoietic repopulating cells using concentrated RD114-pseudotype vectors produced by human packaging cells. *Mol Ther*; **9**: 157-9.
- Neff T, Beard BC, Peterson LJ, Anandakumar P, Thompson J, Kiem HP. (2005). Polyclonal chemoprotection against temozolomide in a large-animal model of drug resistance gene therapy. *Blood*; **105**: 997-1002.
- Nelson-Rees WA, Klement V, Peterson WD, Jr., Weaver JF. (1973). Comparative study of two RD 114 virus-indicator cell lines, KC and KB. *J Natl Cancer Inst*; **50**: 1129-35.

- Nienhuis AW, Dunbar CE, Sorrentino BP. (2006). Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther*, **13**: 1031-49.
- Niman HL, Stephenson JR, Gardner MB, Roy-Burman P. (1977). RD-114 and feline leukaemia virus genome expression in natural lymphomas of domestic cats. *Nature*; **266**: 357-60.
- Nishinakamura R, Nakayama N, Hirabayashi Y, Inoue T, Aud D, McNeil T, Azuma S, Yoshida S, Toyoda Y, Arai K. (1995). Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity*, **2**: 211-22.
- Nishinakamura R, Miyajima A, Mee PJ, Tybulewicz VL, Murray R. (1996a). Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions. *Blood*; **88**: 2458-64.
- Nishinakamura R, Wiler R, Dirksen U, Morikawa Y, Arai K, Miyajima A, Burdach S, Murray R. (1996b). The pulmonary alveolar proteinosis in granulocyte macrophage colony-stimulating factor/interleukins 3/5 beta c receptor-deficient mice is reversed by bone marrow transplantation. *J Exp Med*; **183**: 2657-62.
- Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR. (1994). A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest*; **93**: 1860-3.
- Ochs HD, Thrasher AJ. (2006). The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*; **117**: 725-38; quiz 739.
- Ott MG, Grez M, Stein S, Siler U, Koehl U, Kuehlcke K, Schmidt M, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Hassan M, von Kalle C, Trasher A, Seger R, Hoelzer D. (2005). Long-Term Follow-Up of Patients Treated by Gene Therapy for X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *ASH Annual Meeting Abstracts*; **106**: 194-.
- Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kuehlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Luthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*; **12**: 401-9.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90**: 8392-6.
- Pegg AE. (1990). Properties of mammalian O6-alkylguanine-DNA transferases. *Mutat Res*; **233**: 165-75.
- Persons DA, Allay ER, Sawai N, Hargrove PW, Brent TP, Hanawa H, Nienhuis AW, Sorrentino BP. (2003). Successful treatment of murine beta-thalassemia using in vivo selection of genetically modified, drug-resistant hematopoietic stem cells. *Blood*; **102**: 506-13.
- Phelps DS, Rose RM. (1991). Increased recovery of surfactant protein A in AIDS-related pneumonia. *Am Rev Respir Dis*; **143**: 1072-5.
- Pollok KE, Hartwell JR, Braber A, Cooper RJ, Jansen M, Ragg S, Bailey BJ, Erickson LC, Kreklau EL, Williams DA. (2003). In vivo selection of human hematopoietic cells in a

- xenograft model using combined pharmacologic and genetic manipulations. *Hum Gene Ther*, **14**: 1703-14.
- Price A, Manson D, Cutz E, Dell S. (2006). Pulmonary alveolar proteinosis associated with anti-GM-CSF antibodies in a child: successful treatment with inhaled GM-CSF. *Pediatr Pulmonol*; **41**: 367-70.
- Quinn JA, Pluda J, Dolan ME, Delaney S, Kaplan R, Rich JN, Friedman AH, Reardon DA, Sampson JH, Colvin OM, Haglund MM, Pegg AE, Moschel RC, McLendon RE, Provenzale JM, Gururangan S, Tourt-Uhlig S, Herndon JE, 2nd, Bigner DD, Friedman HS. (2002). Phase II trial of carmustine plus O(6)-benzylguanine for patients with nitrosourea-resistant recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol*; **20**: 2277-83.
- Ragg S, Xu-Welliver M, Bailey J, D'Souza M, Cooper R, Chandra S, Seshadri R, Pegg AE, Williams DA. (2000). Direct reversal of DNA damage by mutant methyltransferase protein protects mice against dose-intensified chemotherapy and leads to in vivo selection of hematopoietic stem cells. *Cancer Res*; **60**: 5187-95.
- Ramirez J. (1971). Alveolar proteinosis: importance of pulmonary lavage. *Am Rev Respir Dis*; **103**: 666-78.
- Rasko JE, Battini JL, Gottschalk RJ, Mazo I, Miller AD. (1999). The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**: 2129-34.
- Rattmann I, Kleff V, Sorg UR, Bardenheuer W, Brueckner A, Hilger RA, Opalka B, Seeber S, Flasshove M, Moritz T. (2006). Gene transfer of cytidine deaminase protects myelopoiesis from cytidine analogs in an in vivo murine transplant model. *Blood*.
- Rattmann I, Kleff V, Feldmann A, Ludwig C, Sorg UR, Opalka B, Moritz T, Flasshove M. (2007). Reliable generation of stable high titer producer cell lines for gene therapy. *Intervirology*; **50**: 197-203.
- Reed JA, Ikegami M, Cianciolo ER, Lu W, Cho PS, Hull W, Jobe AH, Whitsett JA. (1999). Aerosolized GM-CSF ameliorates pulmonary alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol*; **276**: L556-63.
- Reese JS, Davis BM, Liu L, Gerson SL. (1999). Simultaneous protection of G156A methylguanine DNA methyltransferase gene-transduced hematopoietic progenitors and sensitization of tumor cells using O6-benzylguanine and temozolomide. *Clin Cancer Res*; **5**: 163-9.
- Richard E, Robert E, Cario-Andre M, Ged C, Geronimi F, Gerson SL, de Verneuil H, Moreau-Gaudry F. (2004). Hematopoietic stem cell gene therapy of murine protoporphyria by methylguanine-DNA-methyltransferase-mediated in vivo drug selection. *Gene Ther*; **11**: 1638-47.
- Robb L, Drinkwater CC, Metcalf D, Li R, Kontgen F, Nicola NA, Begley CG. (1995). Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **92**: 9565-9.
- Rosen SH, Castleman B, Liebow AA. (1958). Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med*; **258**: 1123-42.

- Ruben FL, Talamo TS. (1986). Secondary pulmonary alveolar proteinosis occurring in two patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Med*; **80**: 1187-90.
- Sanderson CJ. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*; **79**: 3101-9.
- Sandrin V, Russell SJ, Cosset FL. (2003). Targeting retroviral and lentiviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol*; **281**: 137-78.
- Sawai N, Zhou S, Vanin EF, Houghton P, Brent TP, Sorrentino BP. (2001). Protection and in vivo selection of hematopoietic stem cells using temozolomide, O6-benzylguanine, and an alkyltransferase-expressing retroviral vector. *Mol Ther*; **3**: 78-87.
- Schiedlmeier B, Kuhlcke K, Eckert HG, Baum C, Zeller WJ, Fruehauf S. (2000). Quantitative assessment of retroviral transfer of the human multidrug resistance 1 gene to human mobilized peripheral blood progenitor cells engrafted in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Blood*; **95**: 1237-48.
- Schiedlmeier B, Schilz AJ, Kuhlcke K, Laufs S, Baum C, Zeller WJ, Eckert HG, Fruehauf S. (2002). Multidrug resistance 1 gene transfer can confer chemoprotection to human peripheral blood progenitor cells engrafted in immunodeficient mice. *Hum Gene Ther*; **13**: 233-42.
- Scott CL, Hughes DA, Cary D, Nicola NA, Begley CG, Robb L. (1998). Functional analysis of mature hematopoietic cells from mice lacking the betac chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood*; **92**: 4119-27.
- Scott CL, Begley CG. (1999). The beta common chain (beta c) of the granulocyte macrophage-colony stimulating factor, interleukin-3 and interleukin-5 receptors. *Int J Biochem Cell Biol*; **31**: 1011-5.
- Seymour JF, Presneill JJ. (2002). Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med*; **166**: 215-35.
- Sheridan PL, Bodner M, Lynn A, Phuong TK, DePolo NJ, de la Vega DJ, Jr., O'Dea J, Nguyen K, McCormack JE, Driver DA, Townsend K, Ibanez CE, Sajjadi NC, Greengard JS, Moore MD, Respass J, Chang SM, Dubensky TW, Jr., Jolly DJ, Sauter SL. (2000). Generation of retroviral packaging and producer cell lines for large-scale vector production and clinical application: improved safety and high titer. *Mol Ther*; **2**: 262-75.
- Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. (2001). GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*; **15**: 557-67.
- Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, Kingsman AJ. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*; **23**: 628-33.
- Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, Gottesman M, Pastan I, Cline A, Nienhuis AW. (1992). Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science*; **257**: 99-103.
- Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*; **98**: 503-17.

- Southern PJ, Berg P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet*; **1**: 327-41.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*; **241**: 58-62.
- Spiro TP, Gerson SL, Liu L, Majka S, Haaga J, Hoppel CL, Ingalls ST, Pluda JM, Willson JK. (1999). O6-benzylguanine: a clinical trial establishing the biochemical modulatory dose in tumor tissue for alkyltransferase-directed DNA repair. *Cancer Res*; **59**: 2402-10.
- Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, Maher DW, Cebon J, Sinickas V, Dunn AR. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **91**: 5592-6.
- Takebe N, Xu LC, MacKenzie KL, Bertino JR, Moore MA. (2002). Methotrexate selection of long-term culture initiating cells following transduction of CD34(+) cells with a retrovirus containing a mutated human dihydrofolate reductase gene. *Cancer Gene Ther*; **9**: 308-20.
- Tazawa R, Hamano E, Arai T, Ohta H, Ishimoto O, Uchida K, Watanabe M, Saito J, Takeshita M, Hirabayashi Y, Ishige I, Eishi Y, Hagiwara K, Ebina M, Inoue Y, Nakata K, Nukiwa T. (2005). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*; **171**: 1142-9.
- Till JE, McCulloch EA. (1972). The 'f-factor' of the spleen-colony assay for hemopoietic stem cells. *Ser Haematol*; **5**: 15-21.
- Trapnell BC, Whitsett JA. (2002). Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol*; **64**: 775-802.
- Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K. (2003). Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med*; **349**: 2527-39.
- Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM. (1996). Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med*; **2**: 545-50.
- Tsushima K, Koyama S, Saitou H, Takematsu H, Ichiyoshi T, Kubo K. (1999). Pulmonary alveolar proteinosis in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Respiration*; **66**: 173-5.
- Uchida K, Nakata K, Trapnell BC, Terakawa T, Hamano E, Mikami A, Matsushita I, Seymour JF, Oh-Eda M, Ishige I, Eishi Y, Kitamura T, Yamada Y, Hanaoka K, Keicho N. (2004). High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood*; **103**: 1089-98.
- Valtieri M, Schiro R, Chelucci C, Masella B, Testa U, Casella I, Montesoro E, Mariani G, Hassan HJ, Peschle C. (1994). Efficient transfer of selectable and membrane reporter genes in hematopoietic progenitor and stem cells purified from human peripheral blood. *Cancer Res*; **54**: 4398-404.

- von Kalle C, Fehse B, Layh-Schmitt G, Schmidt M, Kelly P, Baum C. (2004). Stem cell clonality and genotoxicity in hematopoietic cells: gene activation side effects should be avoidable. *Semin Hematol*; **41**: 303-18.
- Wadhwa M, Mellstedt H, Small E, Thorpe R. (2003). Immunogenicity of GM-CSF products in cancer patients following immunostimulatory therapy with GM-CSF. *Dev Biol (Basel)*; **112**: 61-7.
- Wang H, Kavanaugh MP, North RA, Kabat D. (1991). Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature*; **352**: 729-31.
- Williams DA, Hsieh K, DeSilva A, Mulligan RC. (1987). Protection of bone marrow transplant recipients from lethal doses of methotrexate by the generation of methotrexate-resistant bone marrow. *J Exp Med*; **166**: 210-8.
- Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma IM. (2006). Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature*; **440**: 1123.
- Wu X, Holschen J, Kennedy SC, Ponder KP. (1996). Retroviral vector sequences may interact with some internal promoters and influence expression. *Hum Gene Ther*; **7**: 159-71.
- Wylam ME, Ten R, Prakash UB, Nadrous HF, Clawson ML, Anderson PM. (2006). Aerosol granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J*; **27**: 585-93.
- Xu-Welliver M, Kanugula S, Pegg AE. (1998). Isolation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutants highly resistant to inactivation by O6-benzylguanine. *Cancer Res*; **58**: 1936-45.
- Yang S, Delgado R, King SR, Woffendin C, Barker CS, Yang ZY, Xu L, Nolan GP, Nabel GJ. (1999). Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum Gene Ther*; **10**: 123-32.
- Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA. (2000). A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer*; **83**: 588-93.
- Zsengeller ZK, Reed JA, Bachurski CJ, LeVine AM, Forry-Schaudies S, Hirsch R, Whitsett JA. (1998). Adenovirus-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor improves lung pathology of pulmonary alveolar proteinosis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Hum Gene Ther*; **9**: 2101-9.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind in der nachfolgenden Publikation veröffentlicht worden:

Rattmann I, **Kleff V**, Feldmann A, Ludwig C, Sorg U, Opalka B, Moritz T, Flasshove M. (2007). Reliable Generation of High Titer Stable Producer Cell Lines for Gene Therapy. *Intervirology*.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Moritz für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Arbeit, für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung im „Labor für experimentelle Hämatologie und Gentherapie“ der Inneren Klinik (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Opalka für seine zahlreichen Anregungen, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu bewerten.

Frau Dr. U. R. Sorg danke ich für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten, für ihre konstruktiven Vorschläge und dem praktischen Erfahrungsaustausch.

Ich danke Frau PD Dr. U. Dirksen und Herrn Dr. C. Bury für die Bereitstellung der m β c-cDNA und den m β c-defizienten Mäusen.

Bei Dr. D. A. Williams möchte ich mich für die Gelegenheit bedanken, im „Department of Experimental Hematology“ des Cincinnati Childrens Hospital Medical Centers, Cincinnati (Ohio, USA) meine fachlichen Kenntnisse zu vertiefen. In diesem Zusammenhang danke ich auch der Heinrich-Hertz-Stiftung für das Stipendium, das diesen Aufenthalt ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn M. Möllmann, Frau A. Feldmann, Herrn C. Ludwig, Herrn Dr. P. Ebeling, Frau B. Hülsmann, Frau U. Jünemann, Herrn W. Stellberg und Frau Dr. I. Rattmann für ihre tatkräftige Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die außerordentlich gute Zusammenarbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Moritz und Arbeitsgruppe Opalka bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Geduld und liebevolle Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kleff
Vorname	Veronika
Geburtsdatum/-ort	07.12.1975, Essen
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982 - 1986	Theodor-Heuss-Grundschule in Essen-Bergerhausen
1986 - 1995	Viktoriaschule, städt. Gymnasium für Jungen und Mädchen in Essen-Huttrop
06/1995	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1995	Aufnahme des Diplomstudienganges Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
03/1998 - 03/1999	Vordiplom in Biologie, Chemie und Physik
11/2001 - 11/2002	Diplomandin und studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Spezielle Zoologie in der Arbeitsgruppe „Entwicklungsphysiologie der Tiere“ unter Leitung von Prof. Dr. D. K. Hofmann Während der Diplomarbeit Aufenthalte am Anatomischen Institut Abteilung Anatomie II der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg zur methodischen Arbeit in der Molekularbiologie
11/2002	Abschluss als Diplom-Biologin <u>Diplomarbeit:</u> „Zur Rolle von Thymosin beta in der Vertebratenentwicklung“
seit 03/2003	Doktorandin am Universitätsklinikum Essen, Innere Klinik - Tumorforschung, Labor von Prof. Dr. T. Moritz <i>Einschließlich:</i> Forschungsperiode am Cincinnati Children's Hospital Medical Center, USA, Prof. Dr. David A. Williams, Division of Experimental Hematology 03 - 08/2005

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Korrektur der β c-defizienten Pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) durch hämatopoetischen Stammzell-Gentransfer in einem β c-defizienten Mausmodell" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Kleff befürworte.

Essen, den

Prof. Dr. B. Opalka

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Veronika Kleff

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

Veronika Kleff