

**Molekulares Monitoring genmodifizierter Zellen
von zwei Patienten mit chronischer Granulomatose
nach Behandlung mit Gentherapie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften



vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Stephan Schultze-Straßer
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2010
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz
Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Wels

Datum der Disputation:

„Du musst nur langsam genug gehen, um immer in der Sonne zu bleiben.“

Antoine de Saint Exupéry

Der kleine Prinz

*Für meine Eltern
Rüdiger und Sylviane*

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Zusammenfassung	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Hämatopoese	1
1.1.1 Immunsystem.....	3
1.1.2 Immundefekte	5
1.2 Chronische Granulomatose	8
1.2.1 Ursachen und Formen	8
1.2.2 NADPH-Oxidase-Komplex.....	9
1.2.3 Herkömmliche Behandlung.....	11
1.3 Gentherapie.....	14
1.3.1 Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten	14
1.3.2 Systeme für den Gentransfer	16
1.3.3 Retrovirale Vektoren	18
1.3.3.1 Retroviraler Replikationsmechanismus	18
1.3.3.2 Retrovirale Vektoren in der Gentherapie.....	21
1.3.4 Klinische Gentherapiestudien für monogene Erbkrankheiten	23
1.3.5 Frankfurter Gentherapiestudie zur Behandlung von X-CGD	28
1.3.5.1 Vorgeschichte der Patienten	28
1.3.5.2 Beobachtungen nach Gentherapiebehandlung.....	29
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	33

2. Material und Methoden	35
2.1 Material	35
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.2 Zellkulturreagenzien, Medien und Zusätze.....	36
2.1.2.1 Zytokine.....	37
2.1.2.2 Antikörper (FACS).....	37
2.1.3 Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten.....	37
2.1.4 Bakterienstämme.....	38
2.1.5 Software.....	39
2.1.6 Oligonukleotide.....	40
2.1.6.1 Primer für RT-PCR.....	40
2.1.6.2 Primer für qPCR.....	41
2.1.6.3 Primer für qRT-PCR.....	41
2.1.6.4 Primer für Bisulfit-PCR.....	42
2.1.6.5 Primer für lokusspezifische Bisulfit-PCR.....	43
2.1.6.6 Primer für Kolonie-PCR.....	44
2.1.6.7 Primer für Sequenzierungen von pCR2.1-TOPO.....	44
2.1.7 Plasmide.....	44
2.1.7.1 Klonierungsvektor.....	44
2.1.7.2 Plasmid für Subklonierungen.....	44
2.1.7.3 γ -retrovirale Helferplasmide.....	45
2.1.7.4 γ -retrovirale Plasmide.....	46
2.1.7.5 Lentivirale Plasmide.....	47
2.1.8 Ausgangsmaterial von X-CGD-Patienten.....	47

2.2 Molekularbiologische Methoden	48
2.2.1 Arbeiten mit <i>E. Coli</i>	48
2.2.1.1 Transformation kompetenter Bakterien	48
2.2.2 DNA Isolierung.....	48
2.2.2.1 Plasmid-Minipräparation.....	48
2.2.2.2 Plasmid-Midi/Maxipräparation	49
2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA mit dem DNeasy Tissue Kit	49
2.2.2.4 Isolierung genomischer DNA mit Proteinase K	50
2.2.3 Arbeiten mit DNA	50
2.2.3.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	50
2.2.3.2 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	51
2.2.3.3 Restriktion von Plasmid-DNA	51
2.2.3.4 Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	51
2.2.3.5 Ethanol Fällung von DNA	52
2.2.3.6 TOPO-TA-Cloning Kit.....	52
2.2.3.7 Sequenzierung von DNA Fragmenten	53
2.2.3.8 Bisulfit-Konvertierung von DNA.....	53
2.2.4 RNA Isolierung.....	55
2.2.4.1 Trizol.....	55
2.2.4.2 RNAqueous-Micro Kit.....	55
2.2.5 Arbeiten mit RNA	56
2.2.5.1 DNase Verdau von RNA	56
2.2.5.2 cDNA Synthese mit dem Retroscript Kit.....	56
2.2.5.3 cDNA Synthese mit RNA-Amplifikation	56

2.2.6 Polymerase Ketten Reaktion	57
2.2.6.1 RT-PCR.....	58
2.2.6.2 pPCR/RT-qPCR	58
2.2.6.3 Bisulfit-PCR.....	61
2.2.6.4 Kolonie-PCR	61
2.2.7 Klonierungsstrategien für zwei γ -retrovirale Vektoren.....	62
2.3 Zellbiologische Methoden	63
2.3.1 Arbeiten mit Zellen.....	63
2.3.1.1 Zellzahlbestimmung	63
2.3.1.2 Kryokonservierung von Zellen.....	63
2.3.1.3 Auftauen von Zellen	63
2.3.2 Arbeiten mit Zelllinien	63
2.3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	63
2.3.2.2 Kultivierung humaner 293T-Verpackungszellen.....	64
2.3.2.3 Kultivierung muriner P19-Zellen	64
2.3.3 Produktion γ -retroviraler Partikel.....	64
2.3.3.1 Virustiterbestimmung und Transduktion von P19-Zellen.....	66
2.3.4 Arbeiten mit primären Patientenmaterial	67
2.3.4.1 Pancoll Aufreinigung peripherer Blutzellen von X-CGD-Patienten.....	67
2.3.4.2 Pancoll Aufreinigung von Knochenmarkzellen von X-CGD-Patienten	67
2.3.4.3 Kolonie-Assay auf Methylzellulose.....	68
2.3.4.4 Kolonie-Assay auf Collagen	68
2.3.4.5 NBT-Färbung hämatopoetischer Kolonien.....	68
2.3.4.6 Aza-D/TSA-Behandlung primärer Patientenzellen	69

2.3.5 FACS Messung.....	69
2.3.5.1 FACS Sortierung	70
2.4 Bioinformatische Methoden	70
2.4.1 <i>In silico</i> Analysen von DNA- und RNA-Sequenzen.....	70
2.4.2 CpG-Inseln und Primer-Design für Bisulfit-Sequenzierungen.....	71
2.4.3 Auswertung und graphische Darstellung von Bisulfit-Sequenzierungen	71
3. Ergebnisse.....	73
3.1 Expansion genmodifizierter Zellen in einer X-CGD-Gentherapiestudie	73
3.1.1 Expressionsanalysen am <i>Mds1-Evi1</i> -Genlokus.....	75
3.1.1.1 Aktivierung des <i>Mds1-Evi1</i> -Genlokus in Patientenzellen	76
3.1.2 Expressionsanalysen am <i>Prdm16</i> -Genlokus	80
3.2 Rekonstitution der Superoxidproduktion in X-CGD-Patientenzellen	81
3.2.1 Monitoring der Proteinfunktion von GP91 ^{phox}	81
3.2.2 Semiquantitative Analyse der mRNA-Expression von GP91 ^{phox}	82
3.2.3 Qualitative Analyse der mRNA-Expression von GP91 ^{phox}	84
3.2.4 Quantitative Analyse der mRNA-Expression von GP91 ^{phox}	86
3.3 Analyse der SFFV Promotor-CpG-Methylierung	87
3.3.1 CpG-Methylierung in peripheren Blutzellen von Patient 1 und Patient 2	88
3.3.2 CpG-Methylierung in hämatopoetischen Kolonien von Patient 2.....	90
3.3.3 CpG-Methylierung des dominanten <i>Mds1</i> -Klons (F02) von Patient 2.....	92
3.3.4 Lokusspezifische CpG-Methylierungsanalysen bei Patient 2	94
3.3.5 CpG-Methylierung des dominanten <i>Mds1</i> -Klons (G11) von Patient 1	97
3.3.6 Lokusspezifische CpG-Methylierungsanalyse bei Patient 1	99
3.4 <i>In vitro</i> Behandlung von X-CGD-Patientenzellen mit Aza-D/TSA.....	101
3.4.1 Kultivierung primärer X-CGD Knochenmarkzellen.....	102

3.4.2 <i>In vitro</i> Behandlung mit Aza-D/TSA	103
3.4.3 Analyse der CpG-Demethylierung	104
3.4.4 Analyse der Superoxidproduktion	106
3.5 Bestimmung der Anfälligkeit viraler Vektoren gegenüber <i>Silencing</i>	107
3.5.1 <i>In silico</i> Analyse optimierter γ -retroviraler Vektoren auf CpG-Inseln.....	107
3.5.2 <i>Silencing</i> -Assay mit γ -retroviralen Vektoren	109
3.5.3 CpG-Methylierung in murinen hämatopoetischen Kolonien	113
3.5.4 <i>In silico</i> Analyse optimierter lentiviraler Vektoren auf CpG-Inseln	116
3.5.5 <i>Silencing</i> -Assay mit lentiviralen Vektoren	117
4. Diskussion	121
4.1 Reduzierte Superoxidproduktion durch epigenetisches <i>Silencing</i>	121
4.2 Insertionsmutagenese und klonale Dominanz	127
4.3 Ausblick	136
III. Literaturverzeichnis	139
IV. Abkürzungsverzeichnis.....	155
V. Publikation.....	159
VI. Kongressbeiträge	159
VII. Danksagung	161
VIII. Eidesstattliche Erklärung.....	163
IX. Lebenslauf	165

II. Zusammenfassung

Die X-chromosomal gebundene chronische Granulomatose (X-CGD) ist eine seltene Erbkrankheit, bei der die NADPH-Oxidase der Phagozyten nicht funktionell ist. Der Grund hierfür liegt meist in Mutationen in der GP91^{phox} Untereinheit der Phagozyten-Oxidase. Hierdurch treten lebensbedrohliche Bakterien- und Pilzinfektionen bei Patienten auf, was neben einer geringen Lebensqualität zu einer erheblich verkürzten Lebenserwartung führt. Eine Stammzelltransplantation eines gesunden Spenders ist bislang der einzige heilende Therapieansatz. Für X-CGD-Patienten, die keinen passenden Spender zur Verfügung haben, stellt die genetische Modifikation autologer hämatopoetischer Stammzellen eine alternative Form der Therapie dar. Im Jahr 2004 wurden daher in einer präklinischen Phase I/II Studie in Frankfurt zwei X-CGD-Patienten gentherapeutisch behandelt. Hierbei wurden CD34⁺ Stammzellen *ex vivo* mit einem γ -retroviralen Vektor transduziert, der eine LTR-getriebene Expressionskassette für GP91^{phox} trägt. Nach einer nicht-myeloablativen Konditionierung wurden die genetisch modifizierten Zellen der Patienten retransplantiert.

Beide behandelten Patienten zeigten schon kurz nach Therapiebeginn eine deutliche Verminderung der Infektionsanfälligkeit und somit eine stark verbesserte Lebensqualität. Auf zellulärer Ebene konnte ein gutes Engraftment der modifizierten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark beobachtet werden. In funktionellen Tests konnte die Bildung superoxidproduzierender Phagozyten für die Immunabwehr gezeigt werden. Das molekulare Monitoring beider Patienten hat jedoch über die Zeit eine Verringerung der Enzymaktivität in den Phagozyten (Superoxidproduktion) gezeigt, obwohl der Anteil genetisch modifizierter Zellen nicht geringer wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch quantitative RT-PCR-Analysen proviraler mRNA-Transkripte, eine Korrelation zwischen dem Verlust der Enzymaktivität und reduzierter Transgenexpression gezeigt werden. Durch DNA-Analysen peripherer Blutproben beider Patienten konnte eine verstärkte Methylierung an der Promotor-CpG-Insel, welche die Transgenexpression reguliert, als Ursache identifiziert werden. Weiterführende klonale Untersuchungen genmodifizierter Kolonien aus dem Knochenmark der Patienten offenbarten einen direkten Zusammenhang zwischen der Abwesenheit von Transkription bzw. Superoxidbildung und der Methylierung dieser CpG-Insel im proviralen Promotorbereich. Somit konnte zum ersten Mal ein epigenetisches *Silencing* bei Patienten nach einer Behandlung mit Gentherapie nachgewiesen werden.

In weiteren Versuchen konnte die vollständig ausgebildete, spezifische Methylierung des SFFV-Promotors in transduzierten Knochenmarkzellen eines Patienten durch *in vitro* Behandlung mit einem Methyltransferase-Inhibitor (Aza-D) in Kombination mit einem Histondeacetylase-Inhibitor (TSA) bis zu 30% reduziert werden. Dieser Teilerfolg zeigt, dass eine klinisch relevante Reaktivierung der Transgenexpression, durch Umkehrung des *Silencings* am SFFV-Promotor, prinzipiell möglich ist.

Das Phänomen der Abschaltung der Genexpression des γ -retroviralen Vektors in der Frankfurter Gentherapiestudie, hat ein Testsystem zur Evaluierung zukünftiger Gentherapie-Vektoren erfordert. Durch Monitoring proviraler Parameter (Kopien, Transgenexpression, Proteinexpression und Promotor-CpG-Methylierung), in der murinen embryonalen Stammzelllinie P19 konnte in dieser Arbeit ein prädiktiver *Silencing*-Assay erfolgreich etabliert werden. Mit Hilfe dieses Systems wurden vielversprechende *Silencing*-resistente Vektoren mit dem UCOE (*Ubiquitous Chromatin Opening Element*) identifiziert. Hierdurch wurden wichtige Grundlagen geschaffen, um zukünftige virale Vektorsysteme in Bezug auf ihre Langzeitexpression testen zu können. Zusätzlich zu der Inaktivierung der transduzierten Expressionskassette konnte in beiden Patienten ein klonales Auswachsen von Subklonen beobachtet werden, das letztendlich zu einem myelodisplastischen Syndrom bei beiden Patienten führte. Der virale Enhancer war im Gegensatz zum viralen Promotor niemals methyliert, wodurch seine transaktivierenden Eigenschaften unbeeinflusst blieben. Diese enhancervermittelte Aktivierung proliferationsfördernder Gene (*Mds1-Evi1*-Genlokus) konnte durch RT-PCR-Analysen zunächst in Mischpopulationen aus peripherem Blut der Patienten nachgewiesen werden. Weiterführende klonale Analysen in Knochenmarkzellen zeigten den direkten Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivierung des *Mds1-Evi1*-Genlokus und den proviralen Insertionen. Somit konnte die Ursache für die therapie-assoziierte, klonale Dominanz in beiden X-CGD-Patienten aufgeklärt werden.

In der Frankfurter Gentherapiestudie wurde erstmals ein klinischer Erfolg für X-CGD-Patienten erzielt. Durch intensives molekulares Monitoring konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckt werden, dass der eingesetzte γ -retrovirale Vektor über das Phänomen der Insertionsmutagenese hinaus, auch in Bezug auf die epigenetische Abschaltung der Transkription (*Silencing*), für zukünftige Studien modifiziert werden muss. Sicherheitsverbesserte Vektoren mit einer Resistenz gegenüber *Silencing* in murinen embryonalen Stammzellen konnten in dieser Arbeit charakterisiert werden. Mit diesen Genfähren könnte der angestrebte Langzeittherapieerfolg in Zukunft möglich werden.

1. Einleitung

1.1 Hämatopoese

Das Blut erfüllt lebenswichtige Transport- und Regulationsfunktionen im menschlichen Organismus. Es besteht aus den Blutzellen und dem Blutplasma. Das Blut ist eines der Organe welches am stärksten regeneriert wird. Täglich werden etwa 2×10^{11} Erythrozyten und 10^{10} Leukozyten im adulten Organismus aus Stamm- bzw. Vorläuferzellen neu gebildet (Hämatopoese). Reife Blutzellen haben eine begrenzte Lebensdauer von wenigen Tagen (z.B. Granulozyten), bzw. mehreren Monaten (z.B. Erythrozyten) mit bis zu einigen Jahren (z.B. Thrombozyten und T-Gedächtnis Zellen) [1, 2]. Die Aufrechterhaltung der konstanten Anzahl an Blutzellen wird Homöostase genannt.

Alle differenzierten hämatopoetischen Zellen entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ). Diese haben die Eigenschaft sich selbst zu erneuern und zusätzlich entweder in die lymphoiden oder in die myeloischen Zelltypen differenzieren zu können. Dies ist das grundlegende Prinzip einer echten HSZ. Man unterscheidet zwischen unreifen LT-HSZ (long-term HSZ) mit lebenslangem Selbsterneuerungspotential und reiferen ST-HSZ (short-term HSZ) mit begrenztem Selbsterneuerungspotential. Beide haben ihre biologische Nische im Knochenmark. Diese Stammzellen können sich im Verlauf der Hämatopoese in Richtung sogenannter multipotenter Vorläufer (MPP- *multipotent progenitor*) bzw. in lymphoid geprägter multipotenter Vorläufer (LMPP- *lymphoid multipotent progenitor*) entwickeln. Im Zuge der weiteren Differenzierung entstehen aus den lymphoiden Vorläufer-Zellen (CMP- *common lymphoid progenitor*), die T-Zellen, die NK-Zellen, die B-Zellen und z.T. auch die dendritischen Zellen. Aus den myeloischen Vorläufer-Zellen (CMP- *common myeloid progenitor*) entstehen Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten, Granulozyten (eosinophile, neutrophile und basophile), Mastzellen, z.T. dendritische Zellen sowie Erythrozyten und Blutplättchen (siehe Abb. 1.1) [3]. Diese terminal differenzierten Blutzellen übernehmen lebenswichtige Aufgaben wie den O_2 - bzw. CO_2 -Transport, Abwehrreaktionen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems und ebenso die Regeneration von verletztem Gewebe.

In der Regel tragen die verschiedenen Zelltypen definierte Oberflächenmarker. Diese sind für einige Zellen in Abb. 1.1 für die adulte murine Hämatopoese wiedergegeben. Im humanen Blutsystem können Stammzellen mit Hilfe des CD34-Oberflächenmarkers identifiziert werden. Dieser Oberflächenmarker definiert neben Stamm- bzw. Vorläufer-

zellen eine relativ breite Zellpopulation. Dennoch wird dieser Marker in der klinischen Anwendung bei Stammzelltransplantationen (SZT) seit über 15 Jahren erfolgreich eingesetzt [4]. Echte Stammzellen sind sehr selten, da sie mit einer Frequenz von etwa einer in 1×10^5 Zellen im Knochenmark vorkommen und sich schätzungsweise nur einmal alle 14 Tage teilen [3]. Für eine weitere Eingrenzung langzeit repopulierender

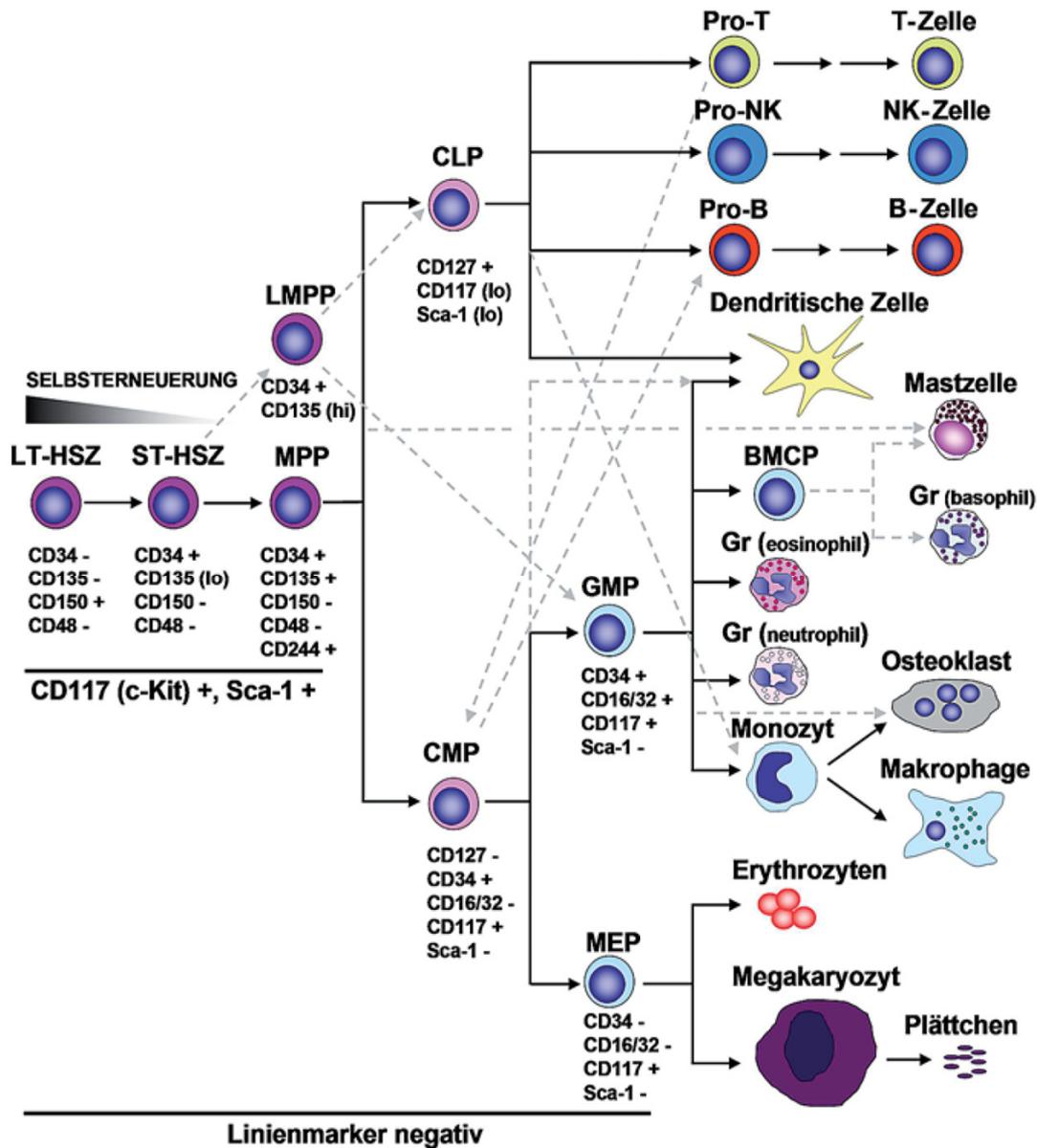


Abb. 1.1 Schema der murinen Hämatopoese. Entwicklungsprozess von unreifen hämatopoetischen Stammzellen (LT-HSZ) zu terminal differenzierten lymphoiden und myeloischen Zelltypen. Zusätzliche alternative Entwicklungswege werden aktuell in der Literatur diskutiert (grau gestrichelte Pfeile). Prominente Oberflächenmarker des adulten murinen Systems sind z.T. angegeben. Weitere Erklärungen im Text [3].

Stammzellen sind darüber hinaus weitere Marker wie CD38 und CD133 bekannt. Echte LT-HSZ treten etwa mit einer Frequenz von einer aus 70-100 Zellen in der CD34+/CD38-/CD133+ Zellpopulation auf [5, 6]. Jedoch werden diese Marker aktuell noch nicht routinemäßig in der Klinik eingesetzt.

1.1.1 Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe, einen Organismus vor einer großen Anzahl verschiedener infektiöser Mikroben (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) zu schützen. Bei unkontrollierter Vermehrung könnten diese Krankheiten bis hin zum Tode des Wirtes verursachen. Bei den Wirbeltieren unterscheidet man zwischen dem angeborenen und dem adaptiven (erworbenen) Immunsystem (siehe Abb. 1.2).

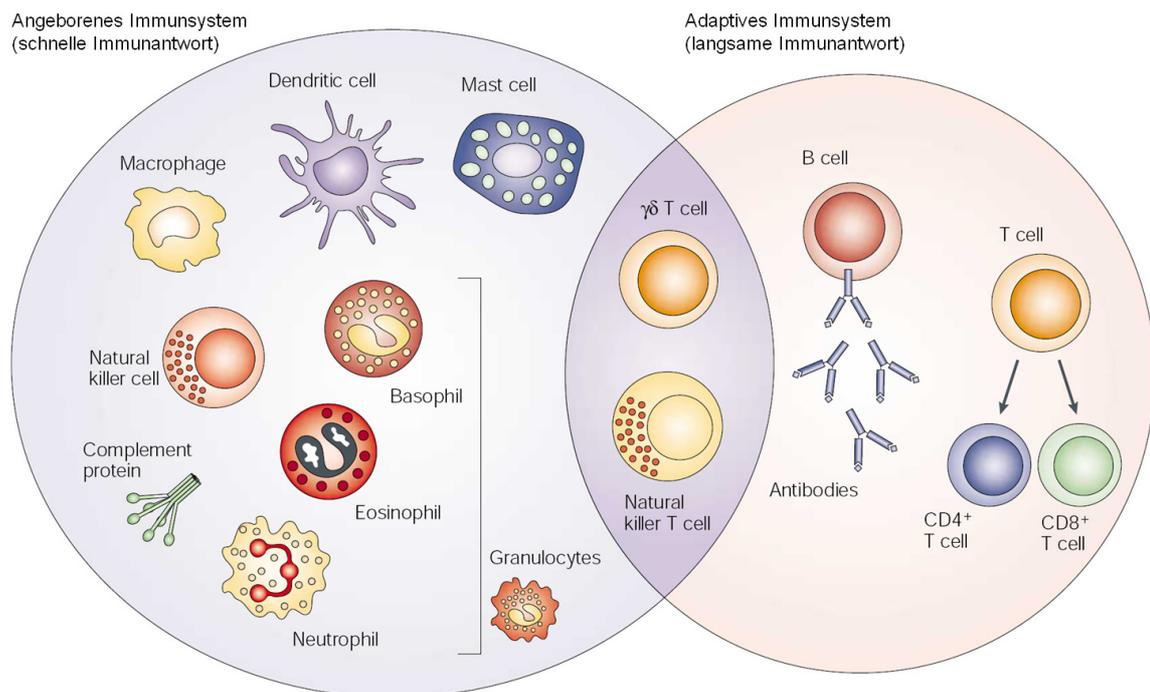


Abb. 1.2 Angeborenes und adaptives Immunsystem. Bei den Wirbeltieren unterscheidet man zwischen dem angeborenen und dem adaptiven (erworbenen) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem besteht aus Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen, Granulozyten (basophile, eosinophile und neutrophile) und ebenso aus löslichen Faktoren wie dem Komplement-System. Das adaptive Immunsystem besteht aus B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. Natürlichen Killerzellen und $\gamma\delta$ T-Zellen befinden sich zwischen beiden Abwehrsystemen. Weitere Erklärungen im Text (modifiziert nach [7]).

Das **angeborene Immunsystem** bildet die erste schnelle und unspezifische Abwehrreaktion auf Infektionen. Die Informationen für die Erkennung von selbst und nicht selbst erfolgt hier durch festgelegte, vererbte Gene. Das angeborene Immunsystem besteht aus zahlreichen verschiedenen Zelltypen sowie aus löslichen Faktoren. Diese sind mit ihrer Funktion nachfolgend kurz beschrieben. Makrophagen sind sog. Riesenfresszellen, die aus Monozyten heranreifen. Sie patrouillieren im Gewebe und phagozytieren dort eingedrungene Erreger. Diese werden nach Abtötung in einzelne Peptide (Epitope) zerlegt und auf der Zelloberfläche auf sog. MHC-II Oberflächen-Molekülen den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert. Dendritische Zellen haben die Aufgabe Mikroben zu endozytieren und durch Antigenpräsentation an der Oberfläche letztlich T-Lymphozyten zu aktivieren. Durch Zytokinausschüttung werden diese T-Lymphozyten angelockt und zur spezifischen Immunabwehr angeregt. Mastzellen spielen eine wichtige Rolle bei Allergien. Sie haben Histamine in Vesikeln (Granula) gespeichert, die sie bei Kontakt mit einem Allergen durch Exozytose freisetzen können und so heftige lokale Immunreaktionen auslösen. Natürliche Killerzellen besitzen keinen antigenspezifischen Rezeptor auf ihrer Oberfläche, vielmehr erkennen sie z.B. mit Viren befallene Zellen durch den Mangel an MHC-I Komplex-Präsentation auf deren Oberfläche (*missing-self*). Dieser MHC-I Komplex identifiziert körpereigene Zellen in der Regel als gesunde Zellen [8]. Granulozyten machen einen Großteil der weißen Blutkörperchen aus. Sie können Parasiten oder Eindringlinge phagozytieren und mit verschiedenen Mechanismen wie z.B. durch Superoxidproduktion beim respiratorischen *Burst* abtöten (siehe 1.2.2). Das Komplement-System besteht aus Plasmaproteinen, welche Mikroorganismen erkennen und binden können (opsonisieren). Phagozyten können Krankheitserreger in der Folge als fremd erkennen und abtöten [9].

Das **adaptive Immunsystem** stellt einen langsameren, jedoch hochspezifischen Abwehrmechanismus mit der Fähigkeit der Gedächtnisbildung dar. Die hohe Spezifität basiert auf dem Prinzip der somatischen Neuordnung von Genen, welche für Antigen spezifische Rezeptoren der B-Lymphozyten und T-Lymphozyten kodieren. Durch Bindung eines passenden Rezeptors mit seinem Antigen wird die B- bzw. T-Zelle aktiviert und reagiert anschließend mit sehr starker Zellteilung (klonale Selektion). Die B-Lymphozyten vermitteln die sog. humorale Immunität durch Produktion spezifischer Antikörper (Immunglobuline) gegen Mikroorganismen. Durch Markierung einer Mikrobe mit einem Antikörper können Zellen der angeborenen Immunantwort diese Eindringlinge erkennen und abtöten (z.B. Phagozyten). Die T-Lymphozyten vermitteln die sog. zelluläre Immunität durch Abtötung von Zellen, die mit Viren oder Bakterien befallen

sind. Diese Immunabwehr erfolgt durch Lyse der infizierten Zellen. Man unterscheidet zwischen zwei Klassen von T-Zellen. Die CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) besitzen auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren, mit denen sie spezifisch an MHC-II Komplexe von antigenpräsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen) binden können und in der Folge aktiviert werden. Hierdurch kommt es zur Sezernierung von Zytokinen, die wiederum Effektor-Zellen wie B-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen für die Bekämpfung einer Infektion aktivieren und somit die Immunantwort verstärken. Die zweite Klasse besteht aus den CD8⁺ T-Zellen (zytotoxische T-Lymphozyten), welche eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Zerstörung von viral infizierten Zellen, von Tumor-Zellen, aber auch von Parasiten darstellen. CD8⁺ T-Zellen werden nach Bindung an einem MHC-I Komplex mit Fremdpeptiden in Richtung Differenzierung zu Effektor-Zellen aktiviert. Ebenso spielen CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Herunterregulation der Immunreaktion nach einer Infektion [7].

1.1.2 Immundefekte

Immundefekte sind die Folge einer gestörten oder fehlenden Immunfunktion. Primäre Immundefekte werden durch vererbte Mutationen in Genen verursacht, welche für die Produktion, die Funktion oder das Überleben von Immunzellen notwendig sind. Dagegen resultieren sekundäre Immundefekte durch äußere Faktoren wie Drogen, Strahlung oder Infektionen. Im Folgenden ist eine kurze Übersicht von ausgesuchten primären Immundefekten angeführt.

Die schwere kombinierte Immunschwächekrankheit (*severe combined immunodeficiency* - SCID) wird durch Mutationen in Genen hervorgerufen, die für die Entwicklung der lymphoiden Zellen benötigt werden. Sie tritt mit einer Frequenz von etwa in 1:75.000 bei Neugeborenen auf und ist in der Regel ohne Behandlung zwischen 6 bis 12 Monaten nach der Geburt aufgrund von Infektionen tödlich [10]. Zahlreiche Mutationen in unterschiedlichen Bereichen der T-Zell-Entwicklung, von der lymphatischen Vorläuferzelle bis hin zu den reifen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind bekannt (siehe Abb. 1.3). Im Folgenden sind zwei prominente Beispiele herausgegriffen.

SCID-X1 wird durch Mutationen in dem Gen für die γ -Kette des Zytokin Rezeptors (γ C) auf dem X-Chromosomen verursacht [11]. Die γ -Kette ist Teil des Rezeptors für verschiedene Zytokine (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21). Daher ist bei SCID-X1-Patienten die Entwicklung lymphoider Vorläuferzellen zu reifen T- und NK-Zellen gestört.

Zusätzlich haben sie einen funktionellen Defekt in den B-Lymphozyten. Dies führt zu schwerwiegendsten Störung der zellvermittelten Immunität [12]. Die einzige Heilungschance besteht in der SZT von einem gesunden Spender oder in der Genkorrektur mit Hilfe einer Gentherapie [13].

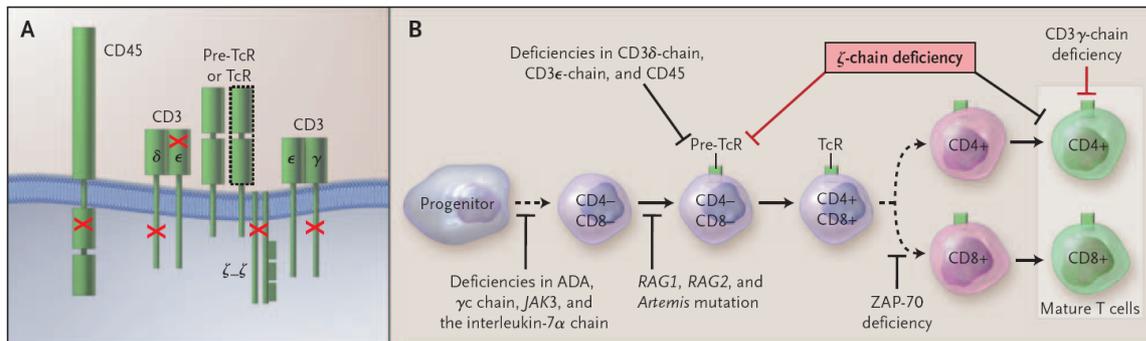


Abb. 1.3 Mutationen bei SCID. A) Betroffene Bereiche der T-Zell Rezeptoren bei SCID. **B)** Mutationen in der γ C-Kette, den JAK3-Kinasen, der Interleukin-7 α Kette oder in der Adenosindeaminase (ADA-Defizienz) führen zum Differenzierungsblock der lymphoiden Progenitor-Zellen. Mutationen in *Rag1*, *Rag2* oder *Artemis* verhindern die Entwicklung der CD4-/CD8- T-Lymphozyten. Bei der Defizienz der CD3 δ -Kette, der CD3 ϵ -Kette, der ζ -Kette oder von CD45 ist die Neuordnung (*Rearrangement*) des T-Zellrezeptors gestört. Mutationen in ZAP-70 verhindert die Ausbildung von CD8+ T-Zellen. Fehler in der ζ -Kette oder in der CD3 γ -Kette blockieren außerdem die Reifung von CD4+ T-Zellen. (SCID) *Severe Combined Immunodeficiency*; (JAK3) Janus Kinase 3; (*Rag1* und 2) Rekombinierungs-Aktivierungs-Gene; (CD) *Cluster of Differentiation*; (ZAP-70) *Zeta-chain-associated protein kinase 70*; [10].

Eine Mutation in dem Gen für die Adenosindesaminase (ADA) führt zu ADA-SCID. Durch Akkumulation toxischer Purin-Metabolite kommt es zur Beeinträchtigung der T-, B- und NK-Zellentwicklung und Funktion. Die Folge sind schwerwiegende wiederkehrende und lebensbedrohliche Infektionen. Da eine allogene SZT bei ADA-SCID Patienten mit einer höheren Mortalitätsrate als bei anderen Formen von SCID verbunden ist, werden ADA-SCID Patienten häufig mit einer Enzymersatz-Therapie in Form von pegyliertem Rinder ADA (PEG-ADA) behandelt. Die resultierende metabolische Korrektur führt zu einer klinischen Verbesserung, ist jedoch bei einer lebenslangen Behandlung sehr kostspielig [14]. Eine Genkorrektur mit Hilfe einer Gentherapie ist auch bei diesem Immundefekt eine heilende Therapieoption.

Eine weitere Immunschwächekrankheit ist das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS). Es wird durch Mutationen im *Was*-Gen auf dem X-Chromosom verursacht. Störungen der

Signalverarbeitung und der Organisation des Zytoskeletts führen zu breiten klinischen Erscheinungsformen bei den Patienten. Im schlimmsten Fall treten Thrombozytopenien, Immundefizienz, Hautausschläge bis hin zur erhöhten Anfälligkeit zur Tumorbildung und Autoimmunerkrankung auf [15]. Auch hier besteht die einzige Heilungschance in der allogenen SZT oder in der Genkorrektur mit einer Gentherapie [16, 17].

Ebenso führen Defekte bei der Leukozyten-Adhäsion zur Immundefizienz. Bei der Leukozyten-Adhäsionsdefizienz (LAD) besteht ein Defekt in einer der drei Phasen für die Bindung von Leukozyten an die Endothelzellen der Blutgefäßwand bei der Migration zu einem Infektionsort. Man unterscheidet entsprechend zwischen Typ I - III. Defekte vom Typ LAD-I werden durch Mutationen im Gen für das β_2 -Integrin verursacht. Dies führt zu einem Defekt beim Klebe-Prozess (*sticking*) der Leukozyten. Der LAD-II Typ beruht auf Mutationen im Fucose-Transporter und resultiert in einem fehlerhaften *rolling*-Prozess. LAD-III ist durch Defekte bei der Aktivierungsphase charakterisiert und wird durch Mutationen in den β -Integrinen (1, 2 und 3) oder dem Kindlin 3 hervorgerufen [18]. Die Folge sind schwerwiegende bakterielle Infektionen und eine Störungen in der Wundheilung [19]. Heilungschancen bestehen nur durch ein allogene SZT oder eine Gentherapie [20].

Ein Beispiel für eine primäre Immunschwäche-Erkrankung des myeloiden Blutsystems ist die Chronische Granulomatose. Phagozytierende Leukozyten dieser Patientengruppe können aufgrund eines Defektes in der Superoxidbildung (respiratorischer *Burst*) aufgenommene Eindringlinge wie Pilze oder Bakterien nicht abtöten. Dies führt zu lebensbedrohlichen wiederkehrenden Infektionen mit einer Sterblichkeitsrate von etwa 5% pro Jahr [21]. Die molekularen Ursachen und die Behandlung dieser Krankheit sind im nachfolgenden Abschnitt (siehe 1.2) näher beschrieben.

1.2 Chronische Granulomatose

1.2.1 Ursachen und Formen

Die Chronische Granulomatose (CGD) ist ein angeborener Immundefekt. Dieser wird durch Mutationen in einem der fünf Gene für die Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes hervorgerufen. Dieser Komplex ist für die Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezien (ROS) in Phagozyten verantwortlich (siehe Abb. 1.4 und Abb. 1.5). Mit Hilfe von Sauerstoffradikalen (O_2^-) können Immunzellen (z.B. Makrophagen, Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten) pathogene Eindringlinge wie Bakterien und Pilze abtöten. Durch Mutationen in den Genen, die für die Untereinheiten der NADPH-Oxidase kodieren, kommt es zu einem Funktionsverlust dieses Enzymkomplexes. In der Folge können Katalase positive Mikroben nicht mehr abgetötet werden und somit schwerwiegende, lebensbedrohliche Infektionen entstehen [22]. Die häufigsten klinischen Erscheinungsformen sind Infektionen in der Lunge und den Lymphknoten, sowie der Knochen, aber auch Bronchitis, Gastroenteritis, Leberabszesse und Granulome [21, 23]. Häufig breiten sich die Infektionen im Körper unkontrolliert aus und beschädigen so Gewebe und Organe [24]. Dies führt neben einer Beeinträchtigung der Lebensqualität zu einer erheblich verkürzten Lebenserwartung mit einer Sterberate von etwa 5% aller CGD-Patienten pro Jahr [25]. Die Häufigkeit dieser seltenen Immunschwächekrankheit wurde in einer amerikanischen Studie auf 1/200.000 bis 1/250.000 der Neugeborenen von 1980 bis 1989 bestimmt [22]. Tatsächlich könnte die Inzidenz aufgrund nicht diagnostizierter milderer Fälle jedoch noch darüber liegen [21].

Die schwerste und häufigste (65-70 %) Form aller CDG Erkrankungen ist die rezessive X-chromosomal gebundene Form der Chronischen Granulomatose (X-CGD) [25, 26]. Hier ist das *Cybb*-Gen für die GP91^{phox}-Untereinheit (NOX2) der NADPH-Oxidase auf Chr. X21.1 defekt. Durch Koppelung an das Geschlechtschromosom sind hier fast ausschließlich Männer von der Krankheit betroffen. Heterozygote weibliche Träger zeigen in der Regel keinen CGD-Phänotyp. Durch die zufällige Inaktivierung eines X-chromosomalen Allels findet eine sogenannte Dosierungskompensation statt, die zu einer reduzierten Teilaktivität bei weiblichen Trägern führt [27]. Erstaunlicherweise können jedoch schon etwa 10% Restaktivität durch das zweite Allel ein symptomfreies Leben ermöglichen [28, 29].

Den anderen 30-35 % aller CGD Erkrankungen liegen autosomal-rezessive Mutationen zu Grunde und betreffen somit gleichermaßen weibliche und männliche Individuen. Etwa

25 % dieser Fälle beruhen auf Mutationen in dem *Ncf1*-Gen ($p47^{\text{phox}}$) auf Chr. 7q1.23 und jeweils etwa 5 % haben ihren Ursprung in Mutationen in *Ncf2* ($p67^{\text{phox}}$) auf Chr. 1q25 oder in *Cyba* ($p22^{\text{phox}}$) auf Chr. 16q24 [25]. Der erste Fall von Mutationen in dem *Ncf4*-Gen ($p40^{\text{phox}}$) auf Chr. 22q13 wurde im Jahr 2009 bei einem Jugendlichen mit granulomatöser Colitis festgestellt [30]

1.2.2 NADPH-Oxidase-Komplex

Die Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (NADPH) -Oxidase ist ein Multiprotein-Komplex. Dieser besteht aus der membranständigen Flavocytochrom_{b558}-Untereinheit (große Untereinheit GP91^{phox} und kleine Untereinheit p22^{phox}) und den zytosolischen Komponenten p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} sowie dem G-Protein Rac. Dieser Komplex assembliert an der Membran von Phagozyten nach externen Stimuli und wird hierdurch aktiviert (Abb. 1.4). Diese Stimuli können z.B. opsonisiertes Zymosan (ZOP) aus der Zellwand der Hefe, inflammatorische Signale, Bakterien oder Pilze sein. Die Assemblierung und Aktivierung der NADPH-Oxidase wird zum einen durch Ca^{2+} -Influx gesteuert, was zu einer PKC α (Ca^{2+} -abhängige Protein Kinase C) -abhängigen Phosphorylierung von cPLA₂ (cytosolic phospholipase A₂) führt. AA (arachidonic acid) reguliert

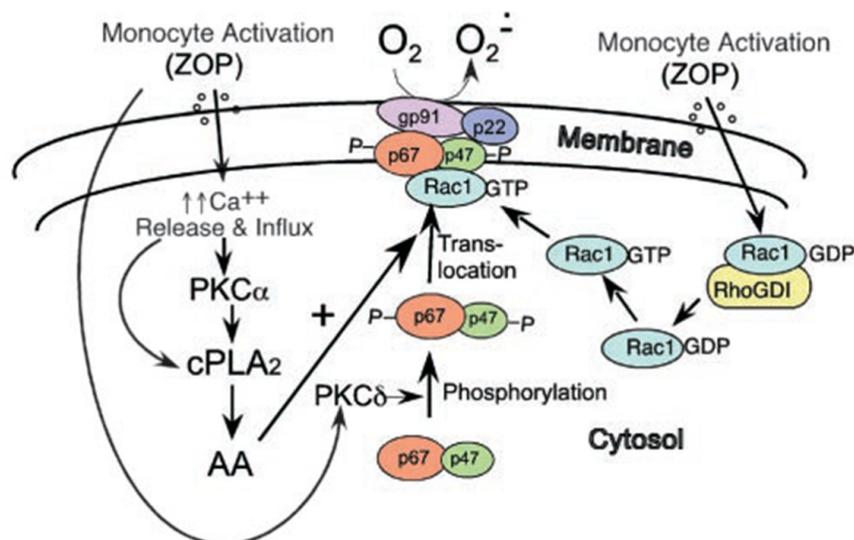


Abb. 1.4 Regulation der Superoxid-Anionen-Produktion durch die NADPH-Oxidase in Monozyten und Makrophagen. Erklärung im Text. Modifiziert nach [31].

die Translokation von $p47^{\text{phox}}$ und $p67^{\text{phox}}$ an die Zellmembran. Die Translokation wird in einem Zusammenspiel mit der PKC δ durch Phosphorylierung von $p47^{\text{phox}}$ und $p67^{\text{phox}}$ ermöglicht. Parallel wird die vollständige Assemblierung und Aktivierung der NADPH-Oxidase an der Zellmembran durch Rac-Isoformen katalysiert. Diese G-Proteine kommen als Isoform RAC1 vor allem in Monozyten und als RAC2 vor allem in Neutrophilen vor. Durch den extrazellulären Stimulus dissoziiert RAC-GDP von seinem Inhibitor rhoGDI und kann nach Phosphorylierung zu RAC-GTP an die Zellmembran translozieren und so Teil des aktiven NADPH-Oxidase-Komplexes werden [31]. Durch Lokalisierung der Untereinheiten in verschiedenen Kompartimenten und die strenge Regulierung der NADPH-Oxidase-Aktivität ist das umgebende Gewebe vor unkontrollierter Schädigung durch reaktiven Sauerstoff geschützt. In ruhenden Phagozyten sind nur etwa 15% des Flavocytochrom $_{b558}$ -Komplexes in der Plasmamembran lokalisiert und etwa 85% in Vesikeln und Granuli vorhanden (Abb. 1.5) [32, 33]. Die Untereinheiten $p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ und Rac liegen im Zytosol vor und führen erst durch Assemblierung zu der aktiven Form des NADPH-Oxidase-Komplexes.

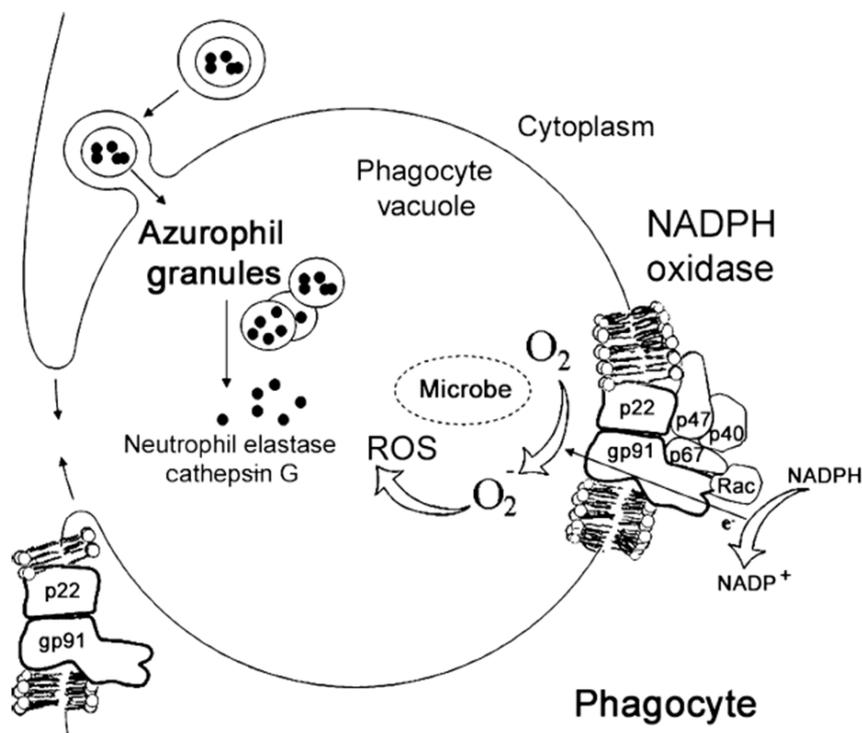
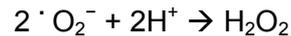


Abb. 1.5 Abtötung von Mikroben durch Phagozyten mittels Superoxidproduktion (ROS) der NADPH-Oxidase. Erklärung im Text [21]

Der GP91^{phox}-vermittelte Elektronentransport von NADPH auf den Sauerstoff führt zu Superoxidanionen und wird „respiratorischer *Burst*“ genannt, da dieser Mechanismus Sauerstoff verbraucht [34]:



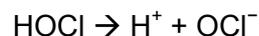
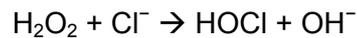
Durch das Enzym SOD (Superoxiddismutase) können Superoxidanionen in Gegenwart von Wasserstoffionen zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden:



Mit Hilfe von H₂O₂ können phagozytierte Bakterien abgetötet werden, mit der Ausnahme von Katalase-positiven Organismen, welche das Wasserstoffperoxid unschädlich machen können:



Neutrophile Zellen (nicht jedoch Makrophagen) können Mikroben auch mit Hilfe der MPO (Myeloperoxidase) abtöten. Hier entsteht das toxische Hypochlorid-Ion:



Die Abschaltung der transienten NADPH-Oxidase-Aktivität wird vermutlich durch Hyperphosphorylierung von p47^{phox} und Hydrolyse von RacGTP zu RacGDP gesteuert, wodurch der Membran-Komplex disassembliert [35].

1.2.3 Herkömmliche Behandlung

Die wichtigste Maßnahme zur Bekämpfung von Infektionen bei CGD-Patienten ist die Vorbeugung vor Infektionen. Da der Kontakt mit Krankheitserregern im Alltag eines CGD-Patienten jedoch nicht vollständig vermieden werden kann, werden sie in der Regel ein Leben lang vorbeugend mit aggressiven Antibiotika und Antimycotika behandelt (siehe Tab. 1).

Die geläufigsten Antibiotika sind lipophile Comatrixole (Trimethoprim, Sulfamethoxazole) [36, 37], welche nach Anreicherung in Granulozyten phagozytierte Gram-negative Bakterien sowie Staphylokokken abtöten können [38]. Der Erfolg dieser Behandlung konnte in retrospektiven Langzeitstudien durch Minderung von Infektionen, chirurgischen Eingriffen und Krankenhausaufenthalten gezeigt werden [39, 40].

Zur Bekämpfung von Pilzinfektionen werden häufig lipophile Itraconazole eingesetzt, die von neutrophilen Zellen aufgenommen werden und dort wirken können [41]. Nach präventiver Gabe in klinischen Studien konnten *Aspergillus*-Infektionen in CGD-Patienten signifikant reduziert werden [36, 42]. Der große Nachteil der lebenslangen Antibiotika und Antimycotika-Gabe sind jedoch Resistenzentwicklungen bei den Mikroben.

Modality	Indication	Duration	Drug	Paediatric dosage
Antibiotic prophylaxis	Bacterial infections	Lifelong	Trimethoprim-sulfamethoxazole	6 + 30 mg/kg/d
	Fungal infections	Lifelong	Itraconazole	5 mg/kg/d*
Empiric antibiotic treatment	Gram ⁺ infections	Until pathogen ident.	Teicoplanin	10 mg/kg/d
	Gram ⁻ infections	Until pathogen ident.	Ciprofloxacin	15 mg/kg/d
	Fungal infections	Until pathogen ident.	Voriconazole	14 mg/kg/d
Interferon γ prophylaxis	Recurrent infections	Lifelong	γ -Interferon	3 \times 50 μ g/m ² /week (s.c.)
White cell transfusions	Severe refractory infections	Until recovery or antibody formation	G-CSF stimulated leucocytes	10 μ g/kg (s.c.) 12 h before leukapheresis
Antiinflammatory treatment	Obstructing granuloma	7–10 d \rightarrow taper	Prednisolone	0.5–1 mg/kg/d
Stem cell transplantation	Recurrent serious manifestations (see Table III)	LAF-isolation c.2 months, isolation at home c.6–9 months	HLA identical marrow transplant	$>2 \times 10^6$ /kg CD34 ⁺ cells

*Oral solution.
ident., identification; LAF, laminar air flow; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; HLA, human leucocyte antigen; CGD, chronic granulomatous disease; s.c., subcutaneously.

Tab. 1 Allgemeine Behandlungsformen für CGD. Erklärung im Text [21].

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit besteht in der relativ kostenintensiven subkutanen Interferon- γ -Gabe (siehe Tab. 1). Dies ist ein Makrophagen aktivierendes Zytokin, welches normalerweise von T-Zellen sezerniert wird. Ein Teil der X-CGD-Patienten mit sog. Spleißstellen-Mutationen sprechen zumindest zeitweise auf diese Therapie an [43, 44], in dem die Spleißeffizienz der GP91^{phox}-Transkripte gesteigert wird und es somit zur Superoxidproduktion durch die NADPH-Oxidase auf Ebene der myeloischen Vorläuferzellen kommen kann [45, 46]. Der Nutzen bei bestehenden Infektionen ist jedoch umstritten und daher kein Standard-Therapeutikum für CGD-Patienten [24].

Durch Transfusion funktioneller Spendergranulozyten können Infektionen ebenso bekämpft werden. Allerdings ist die Wirkung auf die Lebenszeit von wenigen Tagen infundierter Granulozyten limitiert [2]. Zusätzlich besteht das Risiko der Antikörperbildung gegen das körperfremde GP91^{phox}-Protein, was zu einer Immunreaktion führen kann und somit Folgetherapien wie eine SZT oder eine Gentherapie ausschließt.

Der einzig heilende Therapieansatz für CGD ist die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen mit einer funktionellen GP91^{phox}-Genkopie. Dies kann durch Stammzellen eines HLA (*human leukocyte antigen*) -identischen gesunden Spender ermöglicht werden [47, 48]. In einer europäischen Studie wurden 27 CGD-Patienten erfolgreich mit solchen Spenderzellen nach myeloablativer Verabreichung von Busulfan (16 mg/kg Gesamtdosis) behandelt [49]. Die CGD-Patienten konnten in 81 % der Fälle vollständig geheilt werden, wobei die Überlebensrate bei insgesamt 85 % der 27 Patienten lag. Schwere Nebenwirkungen, wie *graft versus host disease* oder aufkommende Entzündungen, wurden fast ausschließlich in einer Patientengruppe mit bestehenden Infektionen vor der Therapie beobachtet. Lediglich ein Patient zeigte kein Anwachsen der Spenderzellen und musste daher autolog transplantiert werden. Insgesamt zeigte diese Studie eine gute Erfolgsrate bei Patienten ohne schwerwiegende Infektionen zum Zeitpunkt der Behandlung und ist somit auch eine gute therapeutische Option für CGD-Patienten. Die Sterberate bei Patienten mit vorhandenen Infektionen zum Zeitpunkt der SZT könnte weiter verringert werden, indem eine weniger aggressive chemotherapeutische Behandlung eingesetzt würde. In einer anderen klinischen Studie wurde eine nicht ablative Konditionierung mit Cyclophosphamid (120 mg/kg), Fludarabin (125 mg/kg) und Antithymozyten Globulin (40mg/kg) gewählt und anschließend mit HLA-identischem Spendermaterial ohne T-Zellen transplantiert. Hier benötigten jedoch alle 10 CGD-Patienten eine Spender-Lymphozyten-Infusion um den Chimerismus zu erhöhen, da das Stammzelltransplantat relativ schlecht angewachsen war [50]. In zwei weiteren Studien mit reduzierter Konditionierung (Busulfan 8 mg/kg, Fludarabin 180 mg/m², Antithymozyten Globulin 40 mg/kg bzw. 4 Gy Körperbestrahlung, Cyclophosphamide 50 mg/kg und Fludarabin 200 mg/m²) an insgesamt vier CGD-Patienten mit bestehenden Infektionen konnte dagegen vollständiges Anwachsen des Stammzelltransplantates sowie die Heilung des CGD-Phänotyps festgestellt werden [51, 52]. Dementsprechend ist die reduzierte Konditionierung vor Stammzelltransplantation bei Hoch-Risiko CGD-Patienten eine vielversprechende therapeutische Option. Bei Abwesenheit von HLA-identischem Spendermaterial kann auch mit haploidentischen Spenderzellen transplantiert werden. Dieses Verfahren ist jedoch aufgrund der Gefahr der Abstoßung des Transplantates und der verzögerten Immunrekonstitution eher riskant [53]. Bei Abwesenheit eines HLA-identischen Spenders ist daher die autologe Transplantation mit genetisch korrigierten Stammzellen (Gentherapie (siehe 1.3)) eine weitere heilende Therapieoption für CGD-Patienten.

1.3 Gentherapie

1.3.1 Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten

Die Gentherapie ist eine relativ junge biomedizinische Anwendung mit dem Ziel, Krankheiten mit Hilfe von Nukleinsäuren vorzubeugen oder zu heilen [54-57]. Hierin liegt der grundlegende Unterschied zu herkömmlichen Therapieformen, welche in der Regel lediglich die Symptome von Krankheiten lindern, die Gentherapie jedoch die Ursachen für die Entstehung dieser Symptome angeht und somit einen heilenden Therapieansatz darstellt. Ebenso ist eine ergänzende, komplementäre Anwendung der Gentherapie zu herkömmlichen Therapieformen denkbar [58]. Die Gentherapie liefert ein sehr breites Spektrum an Angriffsmöglichkeiten zur Bekämpfung von Krankheiten. Neben monogenen Erbkrankheiten [59-61] konnten bereits vielversprechende Ansätze bei Krebserkrankungen [62-64], neurodegenerativen Erkrankungen [65-67], sowie Erkrankungen des blutbildenden Systems [68-71] und der Immunschwächekrankheit AIDS [72, 73] gezeigt werden. Etwa 70% der aktuellen klinischen Gentherapiestudien betreffen Krebserkrankungen und nur etwa 30% die restlichen oben aufgeführten Krankheiten [74].

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Formen der Gentherapie. Die einfachste und geläufigste Art der Gentherapie ist aktuell die Gensatztherapie monogener Erkrankungen. Hierbei wird ein normales („gesundes“) Gen in Form von DNA stabil, jedoch ungerichtet in das Genom von Patientenzellen eingebaut. Durch das Genprodukt kann in den Patientenzellen der Defekt kompensiert werden und der Phänotyp einer Krankheit gelindert oder sogar vollständig geheilt werden (siehe Abb. 1.6). Der grundlegende Baustein für eine erfolgreiche Gentherapie-Anwendung ist ein gutes molekulares Verständnis für die Ursachen der zu behandelnden Krankheit. Daraus ergibt sich die Wahl des Transgens sowie der Zielzellen oder des Gewebes für die Therapie. Ebenso essentiell ist die Verfügbarkeit eines adäquaten Tiermodells für die präklinische Validierung therapeutischer Genfähren im Kontext jeder einzelnen Krankheit [58]. Gentherapeutische Fähren sind jene therapeutischen Moleküle, die es erlauben Nukleinsäuren in Patientenzellen stabil einzubauen und somit auf alle weiteren Tochterzellen zu vererben (siehe 1.3.2).

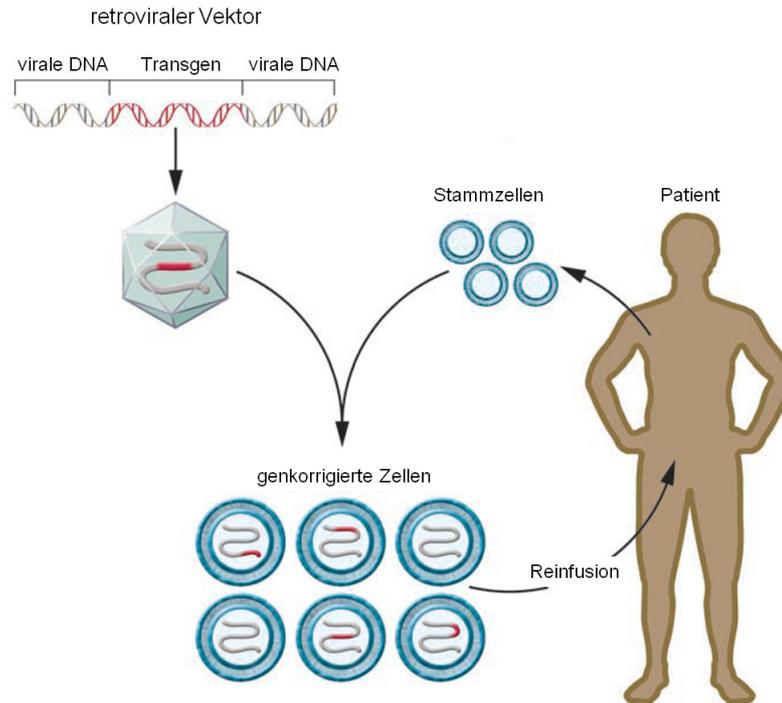


Abb. 1.6 Prinzip einer ex vivo Gentherapiebehandlung. Stammzellen eines Patienten werden ex vivo mit einem retroviralen Vektor transduziert. Das Transgen wird stabil in die Patientenzellen eingebaut und somit auf alle Tochterzellen vererbt. Genkorrigierte Zellen werden zurück in den Patienten infundiert. Dort bilden sie das hämatopoetische System erneut aus und kompensieren den Funktionsdefekt einer Erkrankung. (Modifiziert nach [75])

Genföhren können für eine Therapie auf unterschiedliche Art appliziert werden. Bei einer *in vivo* Verabreichung kommen die systemische Injektion ins Blutsystem, die lokale Injektion ins Zielgewebe oder die Inhalation in Frage. Vorteil dieser Verabreichung ist sicherlich der relativ geringe Kostenfaktor, jedoch bringen die Gefahren in Bezug auf die Immunogenität und die Toxizität, ebenso wie die ungerichtete Transduktion von Zellen im Körper große Nachteile mit sich. Bei der ersten klinischen Pilotstudie zur Behandlung der Ornithin Transcarbamylase Defizienz (letaler Defekt der Urea-Synthese in der Leber) an freiwilligen Patienten durch *in vivo* Injektion adenoviraler Partikeln an der Universität von Pennsylvania in Jahr 1999, kam es zu einem tragischen Todesfall eines Patienten. Dieser Patient (Jesse Gelsinger) hatte die höchste Virendosis erhalten, was zu einer sehr starken Immunabwehrreaktion des Körpers und nach vier Tagen schließlich zum Multiorganversagen führte. Die anderen Patienten dieser Studie mit geringeren Virendosen zeigten eine geringere aber vorhandene Immunreaktion und hatten nur in 3 von 11 Fällen eine leichte metabolische Verbesserung aufgrund der Gentherapiebehandlung [76, 77].

Bei einer **ex vivo** Verabreichung von Genföhren werden Patientenzellen zuerst entnommen und unter GMP (*Good Manufacturing Practice*) -Bedingungen in Zellkulturbeuteln mit Genföhren transduziert und anschließend möglichst zeitnah zuröck in die Patienten reinfundiert [78]. Der Vorteil einer *ex vivo* Anwendung liegt in der M6glichkeit der Selektion von Zielzellen vor der Transduktion. Die Kultivierbarkeit der Zielzellen und das Anwachsen nach Transplantation wie im Fall von hämatopoetischen Stammzellen, ist jedoch Grundvoraussetzung für diese Form der gentherapeutischen Anwendung.

Weitere Faktoren spielen für die Auswahl eines Gentransfersystems eine wichtige Rolle. Entscheidende Merkmale sind die Gr66e des Transgens und die benötigten z.T. zellspezifischen bzw. physiologischen Expressionslevel sowie die Art und Teilungsaktivität der Zielzellen. Darüber hinaus sollte die effiziente Produktion unter GMP-Bedingungen wirtschaftlich möglich sein. Letztlich sollte der Sicherheitsaspekt vor allem in Bezug auf Immunreaktionen und Insertionsmutagenese streng kontrolliert und somit ein Risiko für die Patienten möglichst gering gehalten bzw. eine Nutzen-Risiko-Abwägung getroffen werden.

1.3.2 Systeme für den Gentransfer

Durch Gentransfer können Nukleinsäuren von einem Organismus in einen anderen Organismus übertragen werden. Hierfür stehen vielfältige **nicht virale** sowie **virale** Systeme zur Auswahl. Die vergleichsweise einfachen, nicht viralen Systeme unterliegen den komplexeren, viralen Systemen vor allem in Bezug auf die Effizienz und die Langzeitexpression eines Transgens. Ein weiterer grundlegender Unterschied der Gentransfersysteme liegt in der Eigenschaft, in einem Zielgenom integrieren zu können bzw. episomal vorzuliegen. Alle stabil integrierenden Systeme bergen potentiell die Gefahr einer Insertionsmutagenese durch Veränderung der Information der Nukleinsäureabfolge am Integrationsort und meist auch durch Einbringung regulatorischer Elemente wie z.B. Promotoren, Enhancern oder Insulatoren. Eine Übersicht geläufiger Gentransfersysteme ist in Tab. 2 mit ihren Vor- und Nachteilen aufgelistet. Die Auswahl des geeignetsten Gentransfersystems hängt von der jeweiligen Anwendung ab, da bislang kein universell einsetzbares Transfersystem existiert.

Transfersystem	Vorteile	Nachteile
viral		
Retroviren (dsRNA)	<ul style="list-style-type: none"> • Stabile Integration • Langzeit-Expression möglich • Keine Immunogenität • Breiter Zelltropismus • Etwa 10 kb Verpackungskapazität 	<ul style="list-style-type: none"> • Transduziert keine ruhenden Zellen • Potentielle Insertionsmutagenese • Mittlere Virustiter (10^6-10^7 iu/ml)
Lentiviren (dsRNA)	<ul style="list-style-type: none"> • Stabile Integration • Transduziert auch ruhende Zellen • Langzeit-Expression möglich • Keine Immunogenität • Breiter Zelltropismus • Etwa 10 kb Verpackungskapazität • Hohe Virustiter (10^9 iu/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> • Potentielle Insertionsmutagenese
Adenoviren (dsDNA)	<ul style="list-style-type: none"> • Transduziert auch ruhende Zellen • Hohe Virustiter (10^{10} iu/ml) • Bis zu 30 kb Verpackungskapazität • Keine Insertionsmutagenese 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunogen • Keine Integration • Transiente Expression
Adenoassoziierte Viren (ssDNA)	<ul style="list-style-type: none"> • Stabile Integration von etwa 10 % der Viren, vor allem in Chr. 19 • Dauerhafte Expression möglich • Niedrige Immunogenität 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Langzeit-Transduktionseffizienz da etwa 90 % episomal auftreten • Geringes Potential zur Insertionsmutagenese • Geringe Verpackungskapazität von etwa 4 kb
nicht viral		
DNA Injektion	<ul style="list-style-type: none"> • Einfache Handhabung • Nicht immunogen 	<ul style="list-style-type: none"> • Transiente Expression
DNA-Liganden Konjugate	<ul style="list-style-type: none"> • Zellspezifische Applikation 	<ul style="list-style-type: none"> • Transiente Expression
Gen Pistole	<ul style="list-style-type: none"> • Einfache Handhabung • Nicht immunogen 	<ul style="list-style-type: none"> • Transiente Expression
Liposomen	<ul style="list-style-type: none"> • Große Transferkapazität • Wenig toxisch 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Transfektionseffizienz • Schwierige <i>in vivo</i> Anwendung

Tab. 2 Vor- und Nachteile von Gentransfersystemen. (ds: *double-stranded*; ss: *single-stranded*; iu: *infectious units*) [77, 79, 80].

1.3.3 Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren haben ihren Ursprung in der Familie Retroviridae, den sog. Retroviren. Im Gegensatz zu den DNA-Viren, wird bei RNA-Viren das RNA-Genom mit Hilfe der Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben und anschließend stabil im Wirtsgenom eingebaut (integriert). Zu den bekanntesten Retroviren gehören die γ -Retroviren z.B. *Murine Leukemia Virus* (MLV) und die Lentiviren z.B. *Human Immunodeficiency Virus 1* (HIV-1). Ursprüngliche γ -Retroviren sind pathogen für Mäuse und können unter anderem Krebserkrankungen hervorrufen, daher sind sie auch unter dem Namen Onko-Retroviren bekannt. Ursprüngliche Lentiviren wie HIV-1 sind humanpathogen und können das AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) -Syndrom verursachen.

Für die Entwicklung viraler Vektoren wurden die Gene für die Pathogenese entfernt. Darüber hinaus wurden diejenigen Gene weitestgehend modifiziert, welche für die Replikation erforderlich sind (siehe 1.3.3.1). Daraus sind sog. replikationsinkompetente Vektorsysteme entstanden, d.h. produzierte Viren können genau einmal eine Zielzelle infizieren und ihr genetisches Material in einem Genom einbauen, danach jedoch nicht weiter replizieren bzw. freigesetzt werden. Diese Art sicherheitsoptimierter viraler Vektorsysteme finden in der Gentherapie eine breite Anwendung (siehe 1.3.3.2).

1.3.3.1 Retroviraler Replikationsmechanismus

Viren gehören nicht zu der Klasse der Lebewesen, da sie über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen und für ihre Vermehrung auf Wirtszellen angewiesen sind. Viren nutzen Glykoproteine an der Oberfläche ihrer Hüllmembran für die Bindung an die Oberfläche von Wirtszellen. Durch diesen hochspezifischen Prozess fusionieren in der Folge die Phospholipiddoppelmembranen der Wirtszelle und der Virushülle. Nach der Freisetzung der viralen *core*-Einheit in das Zytoplasma kann die reverse Transkription der einzelsträngigen, positiv-polarisierten RNA des Virus in doppelsträngige DNA erfolgen. Dieser hochkomplexe Vorgang erfolgt innerhalb des Reversen-Transkriptions-Komplexes, welcher die virale Reverse Transkriptase (RT) beinhaltet [81]. Anschließend wird der Präintegrationskomplex (PIC) zusammen mit einigen viralen Proteinen wie z.B. der Integrase gebildet. Nach dem Kernimport erfolgt die stabile Integration der viralen DNA im Wirtsgenom. Jetzt kann die virale DNA (Provirus) von zellulären Polymerasen wie der RNA-Polymerase-II abgelesen werden. Hierdurch entstehen wiederum alle

Komponenten die für ein neues Viruspartikel benötigt werden. Die virale RNA wird zum einen im Zytoplasma der Wirtszelle in die viralen Proteine translatiert, welche sich in der Zellmembran anhäufen, und zum anderen wird die genomische virale RNA durch Assemblierung bei dem Ausknospungsprozess (*budding*) in den neu entstehenden Virionen aufgenommen. Nach dem Abschnüren der viralen Partikel kommt es zur Reifung durch Reorganisation der *core*-Einheit, wodurch die volle Infektiösität des Virus erlangt wird. Der Lebenszyklus kann somit erneut beginnen (siehe Abb. 1.7) [82, 83].

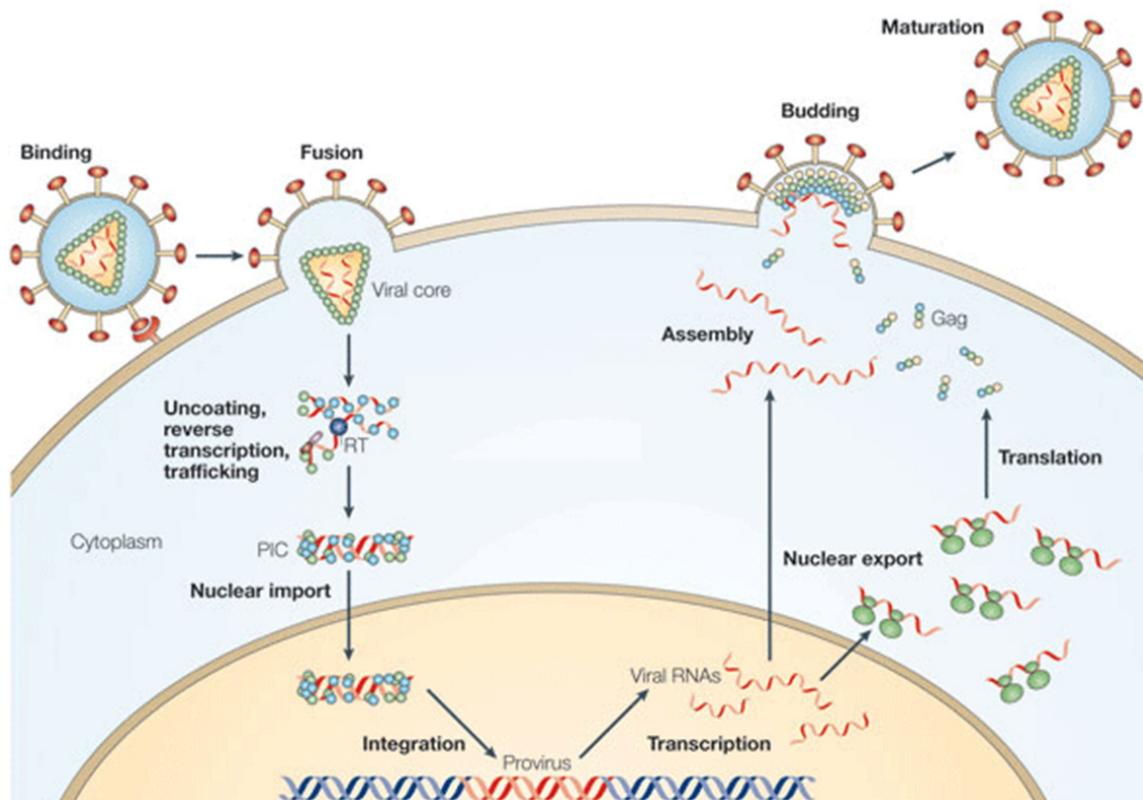


Abb. 1.7 Retroviraler Replikationsmechanismus. Erklärung im Text. Modifiziert nach [82].

Das retrovirale Genom kodiert neben den akzessorischen Genen für die drei essentiellen Gene *gag*, *pol* und *env* (siehe Abb. 1.8). Das Glykoprotein Antigen (*gag*) kodiert für die viralen Kapsidproteine. Das *pol*-Gen (*polymerase*) kodiert für die Reverse Transkriptase, die Integrase und die Protease. Aus dem *env*-Gen (*envelope*) entsteht die spezifische Virushülle. Umrandet werden diese Gene von zwei identischen *long terminal repeats* (LTR) in der integrierten, proviralen Form. Diese nichtkodierenden, regulatorischen Elemente bestehen jeweils aus einer U3 (*unique 3' region*), R (*repeat region*) und U5 (*unique 5' region*) Region. Außerdem enthalten sie die Promotor und Enhancer

Sequenzen in der 5'LTR sowie das Poly-Adenylierungssignal in der 3'LTR. Die Transkription viraler Gene beginnt jeweils an der TATA-Box am Ende der U3 der 5'LTR. Terminiert wird sie am Poly-Adenylierungssignal im Übergang von der R in die U5 Region von der 3'LTR. Ein weiteres wichtiges Element ist das Verpackungssignal ψ (PSI) in der Leadersequenz, welches für die Aufnahme von voller Länge genomischer RNA in die Virushülle benötigt wird. Spleißvarianten, welche durch SD (Spleißdonor) und SA (Spleißakzeptor) definiert sind, werden wegen der fehlenden Verpackungssequenz nicht in das entstehende Virion verpackt. Die PBS (*primer binding site*) in der Leadersequenz wird für den Beginn der Reversen Transkription, als Bindestelle für eine transfer RNA bei der Initiation des minus-DNA-Stranges genutzt. Im Laufe der Reversen Transkription werden auch die beiden identischen LTR benötigt, da sie jeweils zu einem Teil als Vorlage für die Synthese der anderen LTR durch die Reverse Transkriptase dienen [84]. Abschließend bleibt zu erwähnen, dass der Integrationsprozess bei γ -Retroviren nur nach Auflösung der Kernmembran während der Zellteilung möglich ist, also nur proliferierende Zellen transduziert werden können [85, 86]. Dagegen kann der lentivirale PIC-Komplex durch Kernlokalisationssequenzen den Kernimport vermitteln, wodurch auch ruhende Zellen stabil transduziert werden können [87-89].

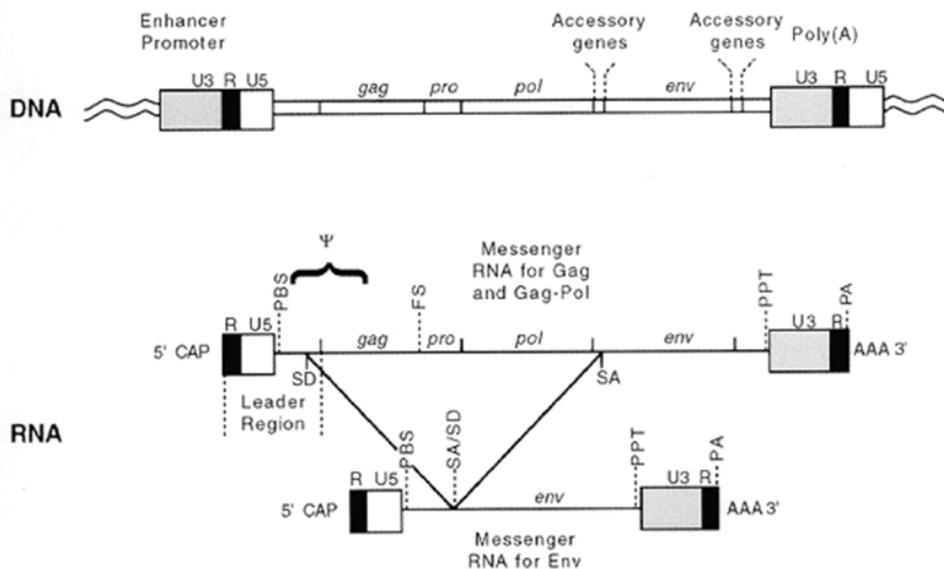


Abb. 1.8 Genetische Organisation eines verallgemeinerten Provirus. Die integrierte provirale Form der viralen DNA mit den beiden endständigen LTR (*long terminal repeats*) ist oben gezeigt. Die mRNA für *gag* und *pol* ist in der Mitte dargestellt. Für das *env* Protein wird die gespleißte Form der mRNA genutzt (siehe unten). Weitere Erklärungen im Text. (PBS) *primer binding site*; (ψ) Verpackungssignal; (SD) Spleißdonor; (FS) *frameshift site*; (SA) Spleißakzeptor; (PPT) *polypurine tract*; (PA) Poly-Adenylierungssignal; (AAA) Poly(A)-Schwanz. [84]

1.3.3.2 Retrovirale Vektoren in der Gentherapie

Die Entwicklung retroviraler Vektoren für die Gentherapie wurde durch das Verständnis vom viralen Replikationszyklus und der viralen Genprodukte ermöglicht. Die Deletion pathogener viraler Gene und die Erhaltung der Gene, welche für die Infektion und die stabile Integration in Wirtszellen notwendig sind, haben sicherheitsverbesserte Vektoren ermöglicht, die für ein sog. *gene of interest* kodieren. Das weit verbreitete Drei-Plasmid-System teilt die Gene für die Herstellung von replikationsinkompetenten Viruspartikeln auf drei verschiedene Plasmide auf (siehe Abb. 1.9) [90]. Das Transferplasmid kodiert für das Transgen und enthält die beiden LTRs sowie das Verpackungssignal (ψ). Hierdurch wird diese RNA in das virale Kapsid verpackt. Die beiden Helferplasmide kodieren entweder für die Gene *gag* und *pol* oder für das *env*-Gen. Diese Genprodukte werden nicht in die viralen Partikel verpackt, da sie nicht über das Verpackungssignal verfügen. Durch Kotransfektion dieser Plasmide in eine Verpackungszelllinie entstehen alle Komponenten für die Entstehung eines viralen Partikels. Da nur das Transferplasmid in diese aufgenommen wird, können produzierte Viren Zielzellen infizieren und auch die Expressionskassette stabil im Wirtsgenom integrieren, es entstehen in der Folge jedoch keine weiteren viralen Partikel. Für die Herstellung klinisch relevanter Virusüberstände werden in der Regel stabile Verpackungszelllinien mit *gag*, *pol* und *env* eingesetzt, welche nur noch mit dem Transfervektor transfiziert werden [91, 92].

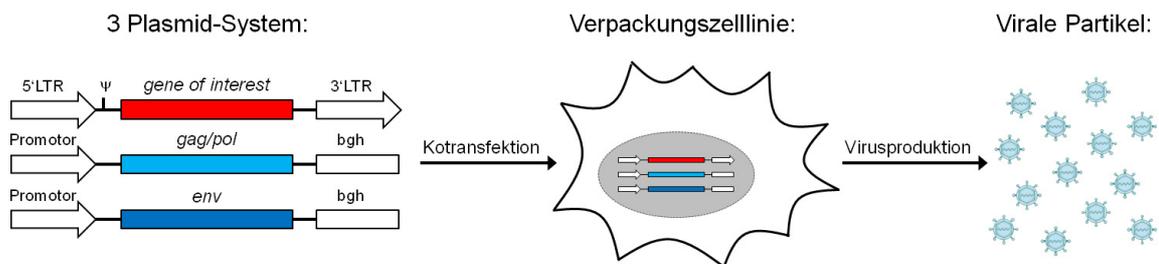


Abb. 1.9 Produktion retroviraler Partikeln mit dem Drei-Plasmid-System durch Kotransfektion in eine Verpackungszelllinie. LTR: *log terminal repeat*; *gag*: *glycoprotein antigen*; *pol*: *polymerase*; *env*: *envelope*; *bgh*: Poly-Adenylierungssignal vom *bovine growth hormone*. Erklärung im Text.

Der Wirtstropismus eines viralen Partikels wird durch Oberflächenrezeptoren in der Virushülle bestimmt. Dieses Phänomen wird Pseudotypisierung genannt. Am geläufigsten für klinische Anwendungen mit γ -retroviralen Vektoren sind die beiden Virushüllen GaLV (*Gibbon ape Leukemia virus*) und RD114 (*feline endogenous virus envelope*), da

diese in der Lage sind repopulierende, humane hämatopoetische Zellen (z.B. CD34⁺) effizient zu infizieren [93-95]. Dagegen wird bei lentiviralen Vektoren häufig die Virushülle vom *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV-G) eingesetzt. Dieser erlaubt einen breiteren Wirtstropismus und die Produktion von sehr hohen Virustitern (10⁹ IU), da so produzierte Partikel konzentrierbar sind [96]. Nachteil dieser Virushülle ist die Toxizität bei konstitutiver Expression hoher Mengen in Verpackungszelllinien. Daher werden hier neben der Kotransfektion auch induzierbare Transgen-Kassetten verwendet [97, 98].

Entscheidend für den klinischen Einsatz genmodifizierter Zellen für hämatopoetische Erkrankungen ist die Fähigkeit dieser Zellen, nach Transplantation den Organismus eines Patienten vollständig rekonstituieren zu können. Hierzu werden i. A. Stamm- bzw. Vorläuferzellen verwendet, welche im Zielorganismus anwachsen (*engraften*) können, sich selbst erneuern und in die verschiedenen hämatopoetischen Zellen differenzieren können (siehe 1.1) [99]. Grundvoraussetzung ist auf der einen Seite die Aufreinigung der „richtigen“ Zielzellen für die Transduktion. Hier wird für die Gewinnung von Vorläuferzellen der Oberflächenmarker CD34 verwendet, welcher den aktuellen Standard bei SZT in der Klinik darstellt [4, 100]. Auf der anderen Seite muss dieses wertvolle Potential der Vorläuferzellen nach dem Transduktionsprozess erhalten bleiben. In dieser Beziehung gibt es grundlegende Unterschiede zwischen γ -retroviralen und lentiviralen Vektorsystemen. Erstere sind für die stabile Integration auf die Zellteilung der Wirtszelle angewiesen (siehe 1.3.3.1). Daraus ergibt sich die notwendige *ex vivo* Kultivierung mit proliferationsfördernden Cytokinen, welche jedoch keinesfalls die Differenzierung bewirken sollten. Dieser Balanceakt zwischen Erhaltung der Repopulierungskapazität und notwendiger Zellproliferation fällt bei lentiviralen Vektorsystemen weg, da diese auch nicht teilende (ruhende) Zellen transduzieren können [88, 101, 102]. Die *ex vivo* Manipulation wird hierdurch deutlich kürzer und erhöht die Wahrscheinlichkeit, das Stammzellpotential transduzierter Zellen erhalten zu können.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Verwendung retroviraler Vektoren für therapeutische Anwendungen ist die provirale Integration im Genom der Patientenzellen. Der stabile Einbau therapeutischer DNA in Patientenzellen unterscheidet die Gentherapie von herkömmlichen Behandlungsformen und ist die Voraussetzung für einen langanhaltenden Therapieeffekt. Mit der viralen Integration geht jedoch auch immer eine Insertionsmutagenese einher, da die ursprüngliche Basenabfolge am Ort des Einbaus unabdinglich geändert wird. Die Folgen hieraus können zahlreich sein, da theoretisch nahezu alle Integrationsorte bei einer ungerichteten Gentherapie in Frage kommen.

Retroviren verfügen nicht über ein bestimmtes Konsensusmotiv für die Integration. Vielmehr schneidet die Integrase relativ unspezifisch die doppelsträngige DNA im Genom. Die virale DNA wird anschließend verknüpft, und es kommt zu einer Verdoppelung der Sequenzen (von etwa 4-6 bp) aus dem Genom, welche das Provirus flankieren [103, 104]. Es gibt jedoch unterschiedliche Präferenzen für den Ort der proviralen Integration im Genom. γ -retrovirale Vektoren integrieren bevorzugt in einem Fenster von +/- 5kb um den Transkriptionsstart und in die Nähe von CpG-Inseln eines Gens, welches nicht im Heterochromatin-Bereich lokalisiert ist, jedoch unabhängig von der Stärke der Transkriptionsaktivität eines Gens [105, 106]. Dagegen integrieren lentivirale Vektoren bevorzugt in Genbereiche, welche zudem transkriptionell sehr aktiv sind [107, 108]. Kommt es zu einer proviralen Integration in oder um ein Gen, so kann es zu Wechselwirkungen zwischen den viralen Promotor- sowie Enhancer-Elementen mit den endogenen Promotoren kommen. Hier kann vor allem die Aktivierung der Transkription (insertionelle Aktivierung) von proliferationsfördernden Onkogenen zu unerwünschten Nebeneffekten einer Gentherapiebehandlung führen. Ebenso besteht die Möglichkeit einer transkriptionellen Aktivierung durch Fusionstranskripte zwischen der viralen und der endogenen RNA. Sowohl für γ -retrovirale Vektoren, als auch für lentivirale Vektoren sind Spleißing-Phänomene zwischen dem proviralen SD in der Leader-Sequenz und einem SA endogener Transkripte beschrieben, welche in der Folge zur klonalen Dominanz geführt haben [pers. Mitteilung Leboulch und [109]].

1.3.4 Klinische Gentherapiestudien für monogene Erbkrankheiten

Eine Gentherapie eignet sich besonders für die Behandlung monogener Erbkrankheiten, also Erbdefekten, bei denen ein Gen betroffen ist. Richtungsweisende Erfolge wurden bei der Behandlung der schweren kombinierten Immunschwäche (SCID-X1) gemacht. Bei diesem Immundefekt treten Mutationen in der γ C-Kette eines Zytokin-Rezeptors auf, welcher für die T-Zell Differenzierung notwendig ist (siehe 1.1.2) [11]. Der starke positive Selektionsvorteil eines spontan zurückmutierten (revertierten) lymphoiden Vorläuferzellklons in einem SCID-X1-Patienten führte zur partiellen immunologischen Rekonstitution. Dies ließ eine Genkorrektur autologer Stammzellen vielversprechend erscheinen. Erfolge in präklinischen Versuchen an Mausmodellen sowie humanen Zelllinien mit retroviralem Gentransfer der γ C-Kette (IL2RG) bestätigten die guten Heilungschancen dieser schwerwiegenden Immunschwächekrankheit in präklinischen Versuchen [110]. Die erste erfolgreiche klinische Gentherapiestudie an 10 SCID-X1-

Patienten wurde unter Leitung von Alain Fischer, Marina Cavazzana-Calvo und Salima Hacein-Bey-Abina am Necker Hospital des Enfants Malades in Paris durchgeführt. Alle Patienten erhielten retroviral behandelte allogene Stammzellen ohne chemotherapeutische Konditionierung in der Hoffnung, dass der starke positive Selektionsdruck genkorrigierter lymphoider Vorläuferzellen für die Immunrekonstitution ausreichen würde. Tatsächlich konnte bei neun Patienten eine Rekonstitution der Immunfunktion beobachtet werden. Dies war der erste große Durchbruch einer klinischen Gentherapie-studie zur Behandlung einer Immundefizienz mit klinischem Nutzen der Patienten. Die Ausnahme bildete ein Patient mit Organomegalie (Vergrößerung der Organe) zur Zeit der Behandlung, bei dem keine genkorrigierten Zellen nachgewiesen werden konnten [111]. Allerdings gab es auch Rückschläge bei dieser Studie, da in den Folgejahren bei insgesamt vier Jugendlichen die Entwicklung von T-Zellleukämien festgestellt wurde. Bedingt wurden diese *severe adverse events* durch provirale Aktivierung proliferationsfördernder Gene (*Lmo-2*, *Ccnd2* oder *Bmi-1*) und z.T. durch zusätzliche chromosomale Abnormalitäten der Patientenzellen (siehe Tab. 3). Eine Beteiligung des IL2RG-Transgens wurde bei der Entstehung der Leukämien kontrovers diskutiert. Ein Zusammenhang konnte zwar im murinen Modell, jedoch nicht im humanen Organismus nachgewiesen werden [112]. Drei der Leukämien aus der französischen Studie konnten durch nachfolgende Stammzelltransplantationen von einem gesunden Spender erfolgreich bekämpft werden, in dem vierten Fall jedoch nicht [13, 60, 113]. In einer sehr ähnlichen Gentherapiestudie zur Behandlung von 10 SCID-X1-Patienten am *Institute of Child Health in London* (UCL) unter Leitung von Adrian Thrasher, konnte bei allen Patienten eine erfolgreiche Immunrekonstitution erreicht werden [114]. In dieser Studie

Study	Vector	Complication	Insertion sites	Additional chromosomal abnormalities	Outcome
SCID-X1 (P4, Paris)	MFG-Ampho	T-ALL, mature T cell	LMO2	CDKN2A del	Died
SCID-X1 (P5, Paris)	MFG-Ampho	T-ALL	LMO2	Notch mutation	CR
SCID-X1 (P7, Paris)	MFG-Ampho	Late cortical T cell			
SCID-X1 (P7, Paris)	MFG-Ampho	T-ALL	CCND2	CDKN2A del	CR
SCID-X1 (P7, Paris)	MFG-Ampho	Late cortical T cell			
SCID-X1 (P10, Paris)	MFG-Ampho	T-ALL	LMO2	Notch mutation	CR
SCID-X1 (P10, Paris)	MFG-Ampho	Late cortical T cell	BMI1		
SCID-X1 (P8, London)	MFG-GALV	T-ALL	LMO2	Notch 1 mutation CDKN2A deletion TCRb/STIL-TAL1 translocation	CR

Tab. 3 SCID-X1-Patienten mit klonaler Expansion nach Gentherapie. (SCID-X11) *severe combined immuno deficiency X1*; (P) Patient; (Ampho) *amphotropes envelope*; (GALV) *Gibbon Ape leukemia virus envelope*; (T-ALL) T-Zell akute lymphatische Leukämie; (LMO-2) *Lim domain only 2*; (CCND2) *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*; (BMI-1) *polycomb ring finger oncogene*; (TCR) T-Zell Rezeptor; (CR) *complete remission*. Modifiziert nach [115].

ist bei einem Patienten eine T-Zelleukämie in der Folge einer *Lmo-2* Aktivierung aufgetreten (siehe Tab. 3). Auch hier wurden zusätzliche Chromosomale Abnormalitäten (Notch-1 Mutation, CDKN2A Deletion und TCRb/STIL-TAL-1 Translokation) festgestellt, welche wahrscheinlich in der Summe mit der LMO-2 Überexpression zur Leukämieentstehung führten [116]. Bei diesem Patient kam durch eine nachfolgende SZT zu einer vollständigen Remission [115].

Sehr vielversprechende Ergebnisse zur Heilung des Defektes im Purin-Metabolismus bei der Immundefizienz ADA-SCID (Adenosin Deaminase SCID) wurden in Italien, in den USA, in Japan und in England hervorgebracht. Insgesamt wurden über 30 Patienten mit γ -retroviralen Vektoren behandelt, die in etwa 67 % der Fälle zur einer stabilen Genmarkierung mit erfolgreicher Immunrestitution geführt haben [117]. Eine Gruppe um Alessandro Aiuti aus Mailand hat die funktionelle Reconstitution von 9 aus 10 Patienten nach nicht-myeloablativer Konditionierung (Busulphan) ohne gravierende Nebeneffekte zeigen können [118]. Keiner der Patienten entwickelte bis heute Anzeichen einer Leukämieentstehung. In London wurden in der Gruppe von Adrian Thrasher fünf Patienten mit einem SFFV-basierten γ -retroviralen Vektor nach Melphalan-Konditionierung behandelt. Hier wurde eine gute Immunrestitution in zwei Fällen beobachtet. Ein limitierter Effekt in den drei anderen Patienten war auf die niedriger Anzahl von Stammzellen für der Transplantation und deren niedrige Transduktions-effizienz (<5 %) bzw. auf eine fehlerhafte Thymusfunktion eines Patienten zurück zu führen [115]. Zwei weitere Patienten wurden am NIH in den USA bzw. in Japan ohne chemotherapeutische Konditionierung erfolgreich behandelt. Unterschiede zeigten sich jedoch in der verlangsamten Kinetik der T-Zell Reconstitution. Diese Befunde unterstreichen die Verwendung einer Konditionierung für ein optimales Anwachsen genmodifizierter Zellen [115]. Die Gentherapie für ADA-SCID stellt mittlerweile aufgrund der hohen Erfolgsrate die Therapie erster Wahl dar [61, 119, 120].

Ein weiterer großer gentherapeutischer Erfolg nach myeloablativer Konditionierung konnte für die neurodegenerative Erkrankung *X-linked Adrenoleukodystrophy* (ALD) erstmals mit Hilfe lentiviraler Genfähren für zwei Patienten in der Arbeitsgruppe um Patrick Aubourg und Nathalie Cartier in Paris gezeigt werden. Der typische progressive Demyelinierungsprozess bei dieser Krankheit konnte in beiden behandelten Patienten gestoppt werden, vergleichbar mit den Ergebnissen nach einer allogenen SZT. Aufgrund der polyklonalen Hämatopoese bestehen in dieser Studie keine Bedenken für die sichere Anwendung dieser Therapieform [65].

Die erste erfolgreiche Behandlung des Wiskott-Aldrich-Syndroms (WAS) mit genmodifizierten HSZ wurde kürzlich von der Gruppe um Christoph Klein von der MHH in Hannover bekanntgegeben. In dieser Studie konnten die T- und B-Zellen, die natürlichen Killerzellen und die Monozyten in zwei Patienten funktionell korrigiert werden. Die klinischen Symptome beider Patienten, wie Hautausschläge, erhöhte Blutungsneigung, Autoimmunität und die Anfälligkeit gegenüber schwerwiegenden Infektionen wurden vollständig aufgelöst. Analysen der proviralen Integrationsorte ergaben zwar Treffer in Wachstumsgenen, sowie Genen der Immunabwehr, jedoch bestehen aufgrund der durchgehend polyklonalen Hämatopoese 3 Jahre nach Therapiebeginn keine Sicherheitsbedenken [121].

Ein weiterer guter Kandidat für eine Behandlung mit Gentherapie ist die Chronische Granulomatose. Bei diesen Patienten ist die Superoxidproduktion der Phagozyten gestört (siehe 1.2.2). Die retrovirale Genkorrektur autologer Stammzellen sollte keinen Transgen-vermittelten Einfluss auf die Proliferation modifizierter Zellen haben, da es sich bei der NADPH-Oxidase um ein metabolisches Gen handelt. Zudem sind schon relativ geringe Level von etwa 10 % funktioneller neutrophiler Zellen ausreichend, um die Symptome bei CGD-Patienten weitestgehend abzumildern. Diese Beobachtung beruht auf Untersuchungen von heterozygoten Trägern dieser Erbkrankheit [27] ebenso wie auf Versuchen mit CGD-Knockout-Mäusen [122]. Darüber hinaus sind schon relativ geringe Expressionslevel in transduzierten Zellen ausreichend für die Bildung von ROS mit Hilfe der NADPH-Oxidase [123]. Bei den ersten klinischen Phase I Gentherapiestudien für die Korrektur von CGD mit p47^{phox} bzw. X-CGD mit GP91^{phox} von der Gruppe um H. Malech wurde ohne Konditionierung der Patienten vor Retransplantation genmodifizierter autologer Zellen behandelt. Hier konnte bei fünf Patienten allenfalls ein transients therapeutischer Effekt in den ersten Monaten gemessen werden, der anschließend auf unter 1% funktionell korrigierter Zellen absank [124-126]. Der mangelnde Selektionsvorteil transduzierter Zellen gegenüber nicht modifizierter Zellen bei CGD ist eine entscheidende Hürde für die gentherapeutische Behandlung dieses Immundefektes [127], welcher gerade in den ersten klinischen Studien neben der niedrigen Anzahl angewachsener Stammzellen im Knochenmark ausschlaggebend für den geringen therapeutischen Langzeiteffekt war.

Der erste große klinische Erfolg einer Gentherapie für X-CGD konnte mit dem Frankfurter Protokoll nach milder Konditionierung der Patienten vor der Reinfusion genkorrigierter Stammzellen erzielt werden [59]. Eine detaillierte Beschreibung dieser Studie ist in 1.3.5 aufgeführt.

Drei weitere X-CGD-Patienten wurden in London von der Gruppe um A. Thrasher und drei weitere X-CGD-Patienten in Zürich von der Gruppe um R. Seger mit dem Protokoll aus Frankfurt ebenso mit dem SF71GP91^{phox}-Gentherapievektor behandelt. Bei vier dieser Patienten wurde eine Abnahme der geringen Zahl genkorrigierter Zellen über die Zeit gemessen. Ursache hierfür war vermutlich das mangelnde Anwachsen (*engraftment*) transplanteder Zellen. Trotz geringer Rekonstitution der GP91^{phox}-Enzymaktivität konnte jedoch zeitweise eine Verbesserung des gesundheitlichen Zustandes festgestellt werden und deutlich geringere Mengen an Begleitmedikamenten verabreicht werden. Bei zwei Patienten kam es jedoch ebenso zu einem Anstieg der Genmarkierung, vermutlich ebenso aufgrund der Insertionsmutagenese am *Mds1-Evi1*-Genlocus (pers. Mitteilung M. Grez). Demzufolge hat die Verwendung des SF71GP91^{phox}-Gentherapievektors nach erfolgreichem *engraftment* genkorrigierter Zellen bisher immer zu einer klonalen Dominanz geführt.

Drei weitere X-CGD-Patienten wurden in den USA von H. Malech mit Konditionierung der Patienten (10 mg/kg Busulfan) unter Verwendung eines LTR getriebenen γ -retroviralen Vektors (MFGs-GP91^{phox}) behandelt. Auch hier zeigte sich nur ein transients Erfolg der Therapie, trotz Reinfusion von deutlich mehr und zum Teil höher transduzierter Zellen in die Patienten ($4.1 - 14 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen/kg; 25-73% GP91⁺). Wie in der ersten Gentherapiestudie von H. Malech gingen die genmodifizierten Zellen in den Patienten trotz relativ starker Konditionierung schon nach wenigen Monaten weitestgehend verloren. Bei einem Patienten konnte nach einem Jahr immerhin 1 % DHR positiver Zellen nachgewiesen werden, welche im Bereich des wildtyp-Levels ROS produzierten [126]. Der mangelnde Selektionsvorteil GP91^{phox}-exprimierender Zellen war auch in dieser Studie entscheidend für den therapeutischen Langzeitverlauf.

1.3.5 Frankfurter Gentherapiestudie zur Behandlung von X-CGD

1.3.5.1 Vorgeschichte der Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei X-CGD-Patienten nach Behandlung mit Gentherapie molekularbiologisch untersucht. Beide Patienten hatten in ihrer Krankengeschichte zahlreiche schwerwiegende und lebensbedrohliche Infektionen. Die Diagnose des X-CGD-Immundefektes wurde 1981 für Patient 1 (P1) gestellt. Schwere Bakterien- und Pilzinfektionen verursachten eine Granulombildung im Ureter mit Stenose, daher erfolgte eine pyeloplastische Operation (Nierenbeckenplastik) (1978). Dieser Patient entwickelte in den folgenden Jahren einen Leberabszess (1980), eine Pseudomona Septikämie (1985), eine Candida Ösophagitis (1992) und eine Salmonellen Septikämie (1993). Eine schwere Osteomyelitis, eine Spondylitis mit epiduralen und paravertebralen Abszessen führte zu einer Korporektomie (2002). Seit 2003 wurden in der Folge schwerwiegende therapieresistente Leberabszesse durch *Staphylococcus aureus* Infektion diagnostiziert. Bei der Aufnahme im Krankenhaus 2004 in Frankfurt am Main wurde mit Clindamycin, Cefalexin, Cotrimoxazol und Itraconazol behandelt. Clindamycin wurde später gegen Rifampicin ausgetauscht. Die Aufnahme in die Frankfurter Phase I/II Gentherapiestudie wurde nach Abklärung mit der regulatorischen Behörde im Paul-Ehrlich-Institut von den behandelnden Ärzten beschlossen. Cotrimoxazol und Itraconazol wurde auch nach Beginn der Gentherapiebehandlung prophylaktisch und unterstützend verabreicht. Rifampicin wurde an Tag 65, ebenso wie Itraconazol ab Tag 381 nach Beginn der Gentherapiebehandlung abgesetzt (persönliche Mitteilung J. Schwäble und M. Grez).

Die Diagnose der X-CGD-Immunschwächekrankheit wurde 1979 für Patient 2 (P2) gestellt. Dieser Patient litt unter zervikalen Lymphknoten Abszessen (1983), einer Meningitis (1985), einem Parotis Abszess (1990), zwei Leber Abszessen und zervikalen Lymphknoten Abszessen (1991 und 1992), einer Sinusitis maxillares (1995), einer bilateralen Hidradenitis axillares (Schweißdrüsenabszesse) und einer Pneumonie (2000), ebenso wie unter einer bilateralen Lungen Aspergillosis mit zerebraler Emboli und Ausbildung einer Lungenkavität (ab 2002). Bei der Aufnahme im Krankenhaus 2004 in Frankfurt am Main wurde er mit Voriconazol und Cotrimoxazol behandelt. Die Aufnahme in die Frankfurter Phase I/II Gentherapiestudie wurde auch hier nach Abklärung mit der regulatorischen Behörde im Paul-Ehrlich-Institut von den behandelnden Ärzten beschlossen. Die Aspergillose in der Lunge konnte nach Gentherapie aufgelöst werden, dennoch wurde aufgrund einer Mycoplasmen-Pneumonie

und einer Sinusitis maxillares an Tag 149 nach Beginn der Gentherapiebehandlung für 3 Wochen mit Clindamycin behandelt. Während der Busulfan-Konditionierung zur Vorbereitung der Transplantation genmodifizierter Zellen, wurde liposomales Amphotericin B anstelle von Voriconazol bis Tag 23 nach Gentherapiebeginn verabreicht. Sowohl Cotrimoxazol als auch Voriconazol wurde dem Patienten therapiebegleitend prophylaktisch gegeben (persönliche Mitteilung J. Schwäble und M. Grez).

1.3.5.2 Beobachtungen nach Gentherapiebehandlung

Das Frankfurter Protokoll für die Behandlung von zwei X-CGD-Patienten mit Gentherapie wurde im Vergleich zu vorhergehenden Studien um eine submyeloablative Konditionierung mit Busulfan (4 mg/kg in 2 Dosen) vor Reinfusion genmodifizierter Zellen erweitert. Hierdurch wurde das Anwachsen der transplantierten Stammzellen unterstützt und die Grundvoraussetzung für den erwünschten Langzeittherapieeffekt geschaffen [59]. Durch G-CSF-Gabe wurden CD34⁺ Zellen (Stammzellen) in das periphere Blutgefäßsystem der Patienten mobilisiert. Nach Apherese wurden die Patientenzellen zwei Tage prestimuliert und anschließend *ex vivo* mit dem Gentransfektor SF71GP91^{phox} an drei aufeinander folgenden Tagen transduziert. Zwischen 40-45% transgenexprimierender Zellen ($3-5 \times 10^6$ CD34⁺/kg) wurden an Tag 0 jeweils in die Patienten reinfundiert (Abb. 1.10).

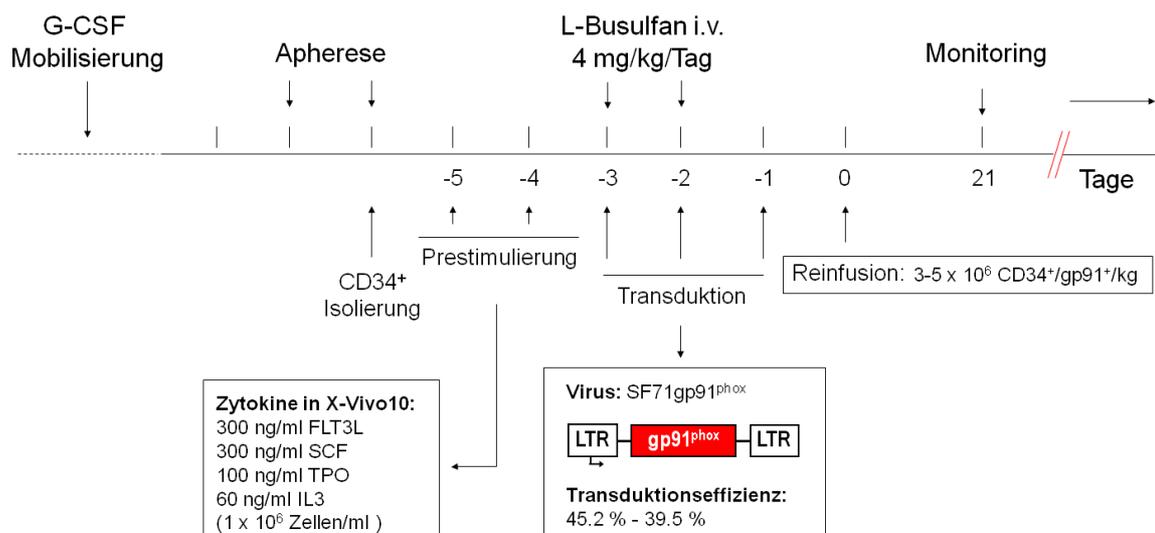


Abb. 1.10 Behandlung von zwei X-CGD-Patienten mit dem Gentherapieprotokoll aus Frankfurt. Erklärung im Text.

Das gute Anwachsen genkorrigierter CD34⁺-Stammzellen führte initiell zu etwa 20-30% funktioneller Granulozyten, welche in der Lage waren die Infektionen mit *Staphylococcus aureus* in der Leber von Patient 1 (P1) und mit *Aspergillus fumigatus* in der Lunge von Patient 2 (P2) schon 50 Tage nach der Behandlung fast vollständig aufzulösen [59]. Dies war zuvor mit den Standardtherapeutika (siehe 1.2.3) nicht gelungen und somit der weltweit erste Erfolg einer Gentherapiestudie für die Behandlung von X-CGD. Die Zunahme genmodifizierter Zellen nach etwa 100-200 Tagen Behandlung in den Patienten wurde durch provirale Aktivierung von drei proliferationsfördernden Genen (*Mds1-Evi1*, *Prdm16* und *Setbp1*) ausgelöst (siehe Abb. 1.11) [59].

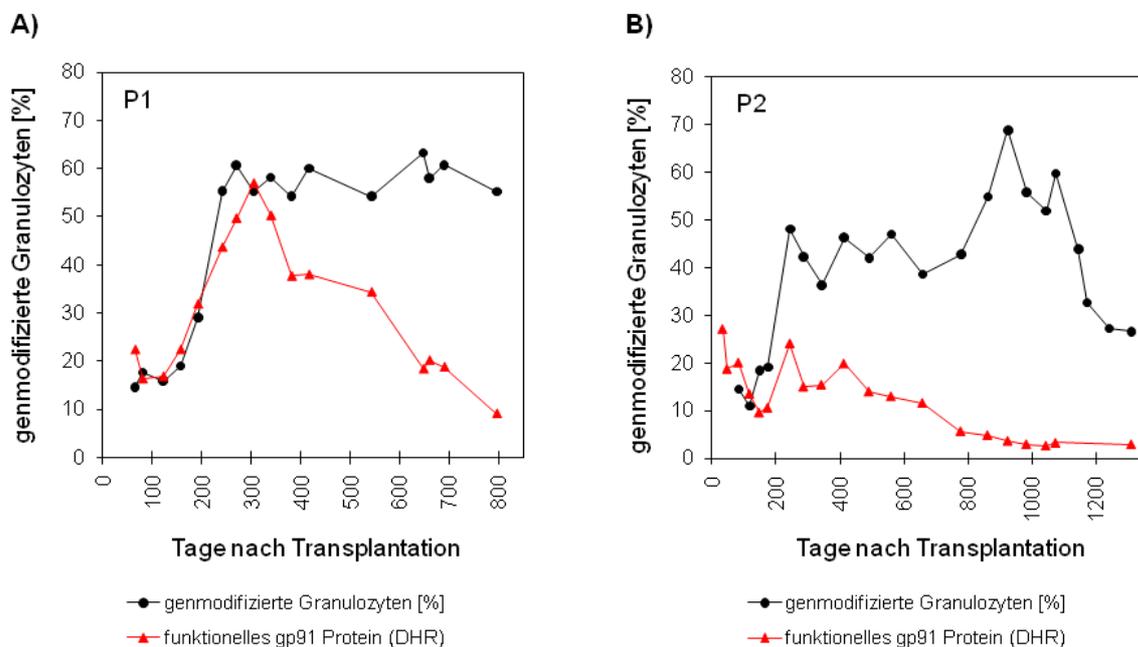


Abb. 1.11 Expansion genmodifizierter Granulozyten und Verlust der Superoxidproduktion nach Gentherapie. Mittels qPCR gegen die provirale DNA wurde bei zwei X-CGD-Patienten eine Zunahme genmodifizierter Granulozyten nach Behandlung mit Gentherapie nachgewiesen (P1: A); P2: B), schwarze Linie) (Daten von Eufets GmbH Idar-Oberstein bereitgestellt). Die Rekonstitution der respiratorischen *Burst*-Aktivität in Granulozyten wurde mit Hilfe eines DHR-Assays im Verlauf der Zeit gemessen. Trotz hoher Genmarkierung war ein Abfall der Superoxidproduktion in P1 (A) und P2 (B) zu beobachten (rote Linie). (DHR: Dihydrorhodamin)

Ursache für die klonale Expansion genmodifizierter Zellen war der eingesetzte LTR-getriebene γ -retrovirale Vektor mit seinem sehr starken viralen SFFV-Promotor und Enhancer. Durch Insertion in die drei oben genannten Gene konnte es zu einer transkriptionellen Aktivierung kommen. Die insertionelle Aktivierung dieser Gene führte

im Laufe der klinischen Gentherapiestudie zu einem Anteil von bis zu 40-60 % transduzierter Granulozyten. Dieser Transfervektor-bedingte Selektionsvorteil hat in der klinischen X-CGD-Gentherapiestudie zumindest teilweise zum therapeutischen Effekt beider Patienten beigetragen.

In beiden Patienten setzten sich hämatopoetische Klone mit Insertionen im *Mds1-Evi1*-Genlokus über den Verlauf der Gentherapie durch (siehe Abb. 3.1). Der *Mds1-Evi1*-Genlokus auf Chr. 3q26 kodiert für mehrere Isoformen. Zum einen entsteht das reine MDS1-Transkript mit dem Translationsstart in Exon 1 über dessen Funktion wenig bekannt ist. Alternative erste Exons von *Evi1* führen zu verschiedenen Spleißvarianten welche alle ihren Translationsstart in Exon 2 haben. Das Translationsprodukt von EVI1 gehört zu der Familie der PR Domäne-Transkriptionsfaktoren mit insgesamt 10 Zinkfinger-DNA-Bindedomänen vom Typ C₂H₂. Am N-Terminus liegen je 7 und am C-terminalen Ende je 3 Zinkfinger mit unterschiedlichen Bindespezifitäten vor [128]. Neben den MDS1- bzw. EVI1-Transkripten treten zusätzlich MDS1-EVI1-Fusions-transkripte auf

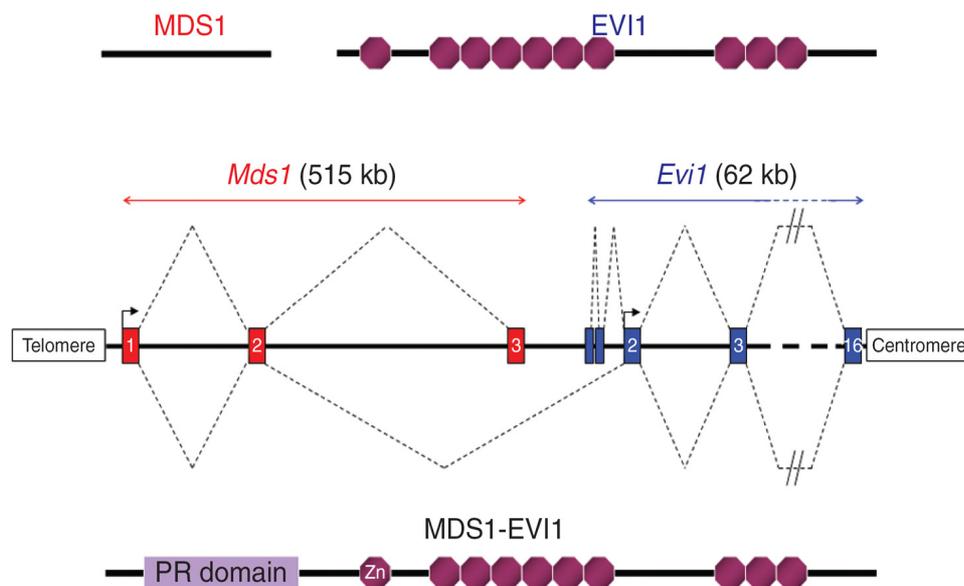


Abb. 1.12 Übersicht des humanen *Mds1-Evi1*-Genlokus auf Chr. 3q26. Das *Mds1*-Gen besteht aus 3 Exons und ist in einem Bereich von etwa 515 kb kodiert (rot markiert). Das *Evi1*-Gen besteht aus bis zu 16 Exons und ist auf einem Bereich von etwa 62 kb lokalisiert (blau markiert). Alternative erste Exons bei *Evi1* führen zu verschiedenen Spleißvarianten mit dem Translationsstart im Exon 2 (Pfeil). Am N-Terminus sind 7 und am C-Terminus 3 Zink-Finger-DNA-Bindedomänen vorhanden (violette Achtecke). MDS1-EVI1-Fusions-transkripte entstehen durch alternatives spleißen von Exon 2 von *Mds1* zu Exon 2 von *Evi1*. Dieses Fusions-transkript kodiert für das MDS1-EVI1-Fusionsprotein mit einer zusätzlich funktionellen positiven Regulator-Domäne (PR Domäne). Weitere Erklärungen im Text [129].

[130]. Diese entstehen aus dem alternativen Spleißen von Exon 2 von *Mds1* zu dem Exon 2 von *Evi1*. Hierdurch entsteht ein Fusionsprotein mit einer zusätzlichen funktionellen PR-Domäne, welche aus dem Bereich der Exon2-Exon2 Fusion hervorgeht (siehe Abb. 1.12). Diese PR-Domäne (Positive Regulator-Domäne) ist hoch konserviert in der Familie der SET/PR Domänen-Transkriptionsfaktoren wie z.B. bei EGL-43 (Differenzierungsfaktor bei *C. Elegans*), BLIMP (Plasma Zellen Differenzierungsfaktor) oder RIZ1 (Retinoblastom interagierendes Zn-Finger-Protein). Sowohl Transkripte mit PR-Domäne (PR+), wie bei MDS1-EVI1, als auch Transkripte ohne PR-Domäne (PR-) wie bei EVI1, sind in gesunden wie auch in leukämischen Zellen exprimiert [130]. Auffällig ist jedoch, dass die PR+ Isoformen in Krebszellen eher schwach exprimiert sind, wohingegen die PR- Splicevarianten häufig überexprimiert vorgefunden werden [131]. Dies führt zu der Vermutung, dass die PR-Domäne dem MDS1-EVI1-Fusionsprotein Eigenschaften eines Tumor-Suppressors verleiht. Über die genaue Wirkungsweise dieser Domäne ist bislang jedoch wenig bekannt.

Neben der klonalen Dominanz gab es ein zweites auffälliges Phänomen in der Frankfurter Gentherapiestudie. Trotz nachweisbar hoher Anzahl genkorrigierter Zellen im Blut der Patienten ist ein Abfall der Superoxidproduktion im Laufe der Zeit zu beobachten gewesen (siehe Abb. 1.11). Der Grund für den Verlust der Superoxidproduktion war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, da dieses Phänomen bis zu diesem Zeitpunkt bei keiner anderen Gentherapiestudien aufgetreten war. Mehrere mögliche Ursachen waren für das Auftreten dieses Phänomens denkbar. Klonale Schwankungen (Fluktuation), hervorgerufen durch die Transduktion myeloischer Vorläuferzellen, nicht jedoch langzeit-repopulierender Stammzellen, wären eine Erklärung für den Verlust genmodifizierter Zellen über die Zeit gewesen. Dagegen sprach jedoch die anhaltend hohe Anzahl genmarkierter Zellen bis zum Ende der Beobachtungszeiträume ebenso wie der Nachweis individueller Integrationen, sowohl in myeloiden als auch in lymphoiden Zellpopulationen [132]. Eine Immunantwort zytotoxischer T-Lymphozyten in den X-CGD-Patienten gegen die GP91^{phox}-Transgenexpression hätte ebenso zu einem Verlust der funktionell-genmodifizierten Zellen führen können (siehe 1.1.1). In der Folge wäre eine Selektion nicht exprimierender transduzierter Zellen in den Patienten, hervorgerufen durch Mutationen in der DNA-Sequenz denkbar gewesen. In dem Blut beider Patienten konnten jedoch in ELISA-Experimenten keine spezifischen Antikörper gegen GP91^{phox} nachgewiesen werden (pers. Mitteilung S. Stein und U. Köhl). Mögliche Mutationen in der proviralen DNA-Sequenz transduzierter Zellen, die zu einem Funktionsverlust des Transgens geführt haben könnten, wurden durch

Klonierung des Provirus mit nachfolgenden Transfektions-Experimenten widerlegt (pers. Mitteilung von C. Preiss).

Da ein Verlust transduzierter Zellen ebenso wie Mutation in der proviralen Sequenz ausgeschlossen werden konnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur proviralen GP91^{phox}-Transgenexpression angefertigt. Eine Erklärung für den Verlust der Enzymaktivität wäre durch den Verlust der GP91^{phox}-RNA-Expression denkbar gewesen. Hypothese dieser Arbeit war, dass der provirale Promotor im Verlauf der Therapie durch Gen-*Silencing* abgeschaltet wurde. Promotor-Methylierung mit einhergehenden Histonmodifikationen könnten an proviralen Insertionsorten zu transkriptionell inaktivem Heterochromatin geführt haben. Dieses Phänomen ist für retrovirale Vektorsysteme in hämatopoetischen Stammzellen bekannt [133, 134], war jedoch zu Beginn der vorliegenden Arbeit für keine klinische Gentherapiestudie beschrieben.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war ein detailliertes molekulares Monitoring transduzierter Zellen von zwei X-CGD-Patienten der Frankfurter Gentherapiestudie. Hierbei wurde der Fokus auf zwei Kernphänomene gelegt.

Zum einen wurde im Verlauf der Gentherapiebehandlung bei beiden X-CGD-Patienten ein Verlust der funktionalen Enzymrekonstitution über die Zeit beobachtet. In keiner anderen Gentherapiestudie war dieses Phänomen bisher aufgetreten. Daher wurden Untersuchungen zur Aufklärung der Ursache in dieser Studie gemacht. Der Fokus wurde hierbei auf die epigenetische Regulierung proviraler Transgenexpression gelegt.

Zum anderen wurde ein Proliferationsvorteil genmodifizierter Zellen im peripheren Blut beider X-CGD-Patienten gemessen, welcher durch insertionelle Aktivierung von drei CIS-Integrationen in den Genen *Mds1-Evi1*, *Prdm16* und *Setbp1* verursacht wurde [59]. Die Entstehung dominanter Klone mit Integrationen im *Mds1-Evi1*-Genlocus ließ eine bedeutende Rolle der Genprodukte bei der Hämatopoese vermuten. Daher sollte die Insertionsmutagenese an diesem Genlocus im weiteren Verlauf der Gentherapiestudie sowohl in Zellen des peripheren Blutsystems, als auch in Kolonien aus dem Knochenmark beider X-CGD-Patienten im Detail untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklav	Integra Biosciences, Baar, CH
Brutschränke	Heraeus, Hanau, DE
CellQuest Pro (FACS-Software)	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, München, DE
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
FACS Scan	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf, DE
Geldokumentationssystem	BioRad, München, DE
Heizblock	Techne, Princeton, NJ
i-Cycler	BioRad, München, DE
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Kryocontainer	Nalgene, Rochester, NY
Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester, NY
Lichtmikroskope	Zeiss, Göttingen; Leica, Wetzlar, DE
LightCycler 480	Roche, Mannheim, DE
Mikrowelle	Sharp, Hamburg, DE
Nanodrop	Thermo Scientific, Wilmington, USA
PCR Platten (96 Loch)	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen, DE
pH-Meßgerät	Knick, Berlin, DE
Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Pipettierhilfe (elektrisch)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Spektrophotometer	BioRad, München, DE
Spritzen	Dahlhausen, Köln, DE
Sterilbank	Heraeus, Hanau, DE
Sterilfilter	Millipore, Eschborn, DE
Stromquelle	BioRad, München, DE
Thermocycler	BioRad, München, DE
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg, DE
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen, DE
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Zählkammern	Hycor Biomedical, Edinburgh, UK
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, DE

Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen, DE
Zentrifugen	Beckman, München, DE

2.1.2 Zellkulturreagenzien, Medien und Zusätze

α -MEM (alpha Modified Eagle Medium)	Genaxxon, Ulm, DE
Aza-D (5-Aza-2'deoxyctidine)	Sigma, Taufkirchen, DE
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen, DE
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; High Glucose)	Life Technologies, Karlsruhe, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Taufkirchen, DE
DNase I (RNase-frei)	Roche, Mannheim, DE
EDTA	Sigma, Taufkirchen, DE
FBS (Fötales Rinderserum)	StemCell Technologies, Vancouver, BC
Glutamin (L-Glutamin)	BioWhittaker, Verviers, B
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	Sigma, Taufkirchen, DE
HEPES	Sigma, Taufkirchen, DE
HSA (Humanes Serumalbumin)	DRK-Blutspendedienst Niedersachsen, DE
HSC-CFU	Miltenyi BioTech, Bergisch Gladbach, DE
Kalziumchlorid	Sigma, Taufkirchen, DE
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, DE
Pancoll (human)	PAN Biotech, Aldenbach, DE
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	BioWhittaker, Verviers, B
Penicillin-Streptomycin	BioWhittaker, Verviers, B
Polybren	Sigma, Taufkirchen, DE
Protaminsulfat	Sigma, Taufkirchen, DE
Retronectin	Takara, Shiga, JPN
RPMI 1640 (ohne Glutamin)	Life Technologies, Karlsruhe, DE
Tris	Roth, Karlsruhe, DE
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen, DE
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Karlsruhe, DE
Wasser	Sigma, Taufkirchen, DE

2.1.2.1 Zytokine

hFLT3L	PreproTech INC, Offenbach, DE
hIL-3	PreproTech INC, Offenbach, DE
hSCF	PreproTech INC, Offenbach, DE
hTPO	PreproTech INC, Offenbach, DE

2.1.2.2 Antikörper (FACS)

7D5-FITC	Biozol, München, DE
anti-IgG-PE	Becton Dickinson, Heidelberg, DE

2.1.3 Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Agarose	Roth, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Roche, Mannheim, DE
AmpliTaq	Roche, Mannheim, DE
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen, DE
Chloroform	Roth, Karlsruhe, DE
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen, DE
DNA free Kit	Ambion, Austin, USA
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden, DE
dNTPs (Nukleosidtriphosphate)	New England Biolabs, Frankfurt, DE
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem, Darmstadt, DE
EpiTect Bisulfit Kit	Qiagen, Hilden, DE
Ethanol	Roth, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, DE
Glycogen	Roche, Mannheim, DE
Größenmarker (DNA; 100bp Ladder)	Eurogentec, Seraing, B
IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid)	Sigma, Taufkirchen, DE
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumacetat	Sigma, Taufkirchen, DE
LB Agar	Life Technologies, Karlsruhe, DE
LB Broth Base	Life Technologies, Karlsruhe, DE
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen, DE
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, DE
NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel, Düren, DE
PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol)	Roth, Karlsruhe, DE
Protaminsulfat	Sigma, Taufkirchen, DE
QIAquick gel extraction kit	Qiagen, Hilden, DE
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt, DE

Retroscript Kit	Ambion, Austin, USA
RNA Amplification Kit (FullSpectrum™ Complete Transcriptome)	BioCat, Heidelberg, DE
RNAqueous-Micro Kit	Ambion, Austin, USA
RNase free DNase Set	Ambion, Austin, USA
RNase free Tubes (non sticky)	Ambion, Austin, USA
RNase Zap	Ambion, Austin, USA
RNase Zap Wipes	Ambion, Austin, USA
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden, DE
Saccharose	Sigma, Taufkirchen, DE
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, DE
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt, DE
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Tri-Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, DE
Tris	Roth, Karlsruhe, DE
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Universal Probe Library	Roche, Basel, CH
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Sigma, Taufkirchen, DE
Xylencyanol FF	Sigma, Taufkirchen, DE

2.1.4 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5α (Stratagene, Zuidoost, NE)	F ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) PhoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1
One Shot® TOP 10F ['] (Invitrogen, Karlsruhe, DE)	F [lacI ^q Tn10 (tet ^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK galK rpsL (str ^R) endA1 nupG
MAX Efficiency® Stbl2™ (Invitrogen, Karlsruhe, DE)	F ⁻ mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ ⁻ Δ(lac-proAB)

2.1.5 Software

Verwendung	Referenzen/Programm
BLAST Software	<ul style="list-style-type: none"> • http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ • http://www.ensembl.org/index.html • http://genome.ucsc.edu/
Bearbeitung von DNA/RNA Sequenzen; Primer-Design	<ul style="list-style-type: none"> • Lasergene 6 DNASTar: EditSeq, SeqMan, SeqBuilder • Integrated DNA Technologies: http://eu.idtdna.com/scitools/scitools.aspx • Universal Probe Library von Roche für qPCR: https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp
Bisulfit Konvertierung; Primer-Design für Bisulfit-Sequenzierung	<ul style="list-style-type: none"> • MethPrimer: http://www.urogene.org/methprimer/index1.html • BiqAnalyser : http://biq-analyzer.bioinf.mpg.de/tools/BiConverter/index.php
Auswertungen am FACS	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Quest Pro
Dokumentation; Auswertungen	<ul style="list-style-type: none"> • Microsoft Office
Literaturverzeichnis	<ul style="list-style-type: none"> • Endnote

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Primer für RT-PCR

Transkript	RT-PCR	Primer Name	Sequenzen in 5' - 3' Richtung	Fragmente
EVI1 (1b) (AF487422)	1.PCR	Evi-short-ex1-F1	G TTCCTCCTGCGAAACG	275bp
		Evi-MD-Race_1b-r	C CGGCGCCATAGTT	
	2.PCR	Evi-MD-RACE-14a_f	A CCGTGCGGTCTGG	261bp
		Evi-short-ex3-R2	T CATGGGGATAGTCTTCGCTC	
MDS1-EVI1 (S69002)	1.PCR	MEV-F1	T GCCACATCCAGTGAAGCAT	298bp
		MEV-R1	T GAGCCAGCTTCCAACATCT	
	2.PCR	MEV-F2	A GGAGGGTTCTCCTTACAAA	247bp
		MEV-R2	T GACTGGCATCTATGCAGAA	
MDS1-EVI1 (S69002) (inkl. Exon1)	1.PCR	MDS1-ex1-for1	A GGGAGGGAGAGAGAGTGAAAGAA	682bp
		MEV-R1	T GAGCCAGCTTCCAACATCT	
	2.PCR	MDS1-ex1-for2	A GAAACAGGAGAGAAACAGGAGGG	601bp
		MEV-R2	T GACTGGCATCTATGCAGAA	
LTR-EVI1	1.PCR	LTR1	G TGGACTCGCTGATCCTTG	199bp
		MEV-R1	T GAGCCAGCTTCCAACATCT	
	2.PCR	LTR2	T T GATTGACTGCCCACCTC	141bp
		MEV-R2	T GACTGGCATCTATGCAGAA	
LTR- PRDM16	1.PCR	LTR1	G TGGACTCGCTGATCCTTG	496bp
		PRDM16rev1	A CGTCCGTCAGTATTTGCTCCCAT	
	2.PCR	LTR2	T T GATTGACTGCCCACCTC	448bp
		PRDM16rev2	T TTGCTCCCATCCGAAGTCTGTCT	
GP91phox gesamt	1.PCR	GP91for	G GCCGCTCTAGAACTAGTGGA	260bp
		GP91revS1	A CAGCAGATTTGACAGACTGGCA	
	2.PCR	GP91forN2	T AGAACTAGTGGATCCTGCCACCA	176bp
		GP91revS2	T GCCAGTGCTGACCCAAGAAGTTT	
GP91phox Spleiß	1.PCR	LTR1	G TGGACTCGCTGATCCTTG	862bp, 730bp, 362bp
		GP91revS1	A CAGCAGATTTGACAGACTGGCA	
	2.PCR	LTR2	T T GATTGACTGCCCACCTC	751bp, 619bp, 251bp
		GP91revS2	T GCCAGTGCTGACCCAAGAAGTTT	
Human β-Aktin (NM_001101)	1.PCR	Act-5'	A TGATATCGCCGCGCTCGTCGTC	346bp
		Act-3'	T TCTCGCGTTGGCCTTGGGGTTTCAG	
	2.PCR	Act-5'-2	G ACAACGGCTCCGGCATGTGCAA	256bp
		Act-3'-2	C ACGCAGCTCATTGTAGAAGG	

2.1.6.2 Primer für qPCR

Target	Primer Name	Sequenzen in 5' - 3' Richtung	Sonde	Fragment
GP91 ^{phox}	GP91-for-N2	TAGAACTAGTGGATCCTGCCACCA	#26 CTGGGCTG FAM Cat 04687574001 (Roche Probe Library)	104bp
	GP91-rev-N2	GACAAAGAGGAAGACGTTCAACCC		
GP91 ^{phox}	GP91 f	GGTTTTGGCGATCTCAACAGAA	TCATCACCAAGGTGG TCACTCACCTTTC 5' FAM (Operon)	114bp
	GP91 r	TGTATTGTCCCACTTCCATTTTGAA		
WPRE	WPRE for	GTGGTGTGCTCTGTGTTTGC	#20 CTGGCTGG FAM Cat 04686934001 (Roche Probe Library)	65bp
	WPRE rev	AGTTGACAGGTGGTGGAAT		
murin β-Aktin	m beta Act for	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CACTGCCGCATCCTC TTCCTCCC 5' Texas Red (Operon)	135bp
	m beta Act rev	CAATAGTGATGACCTGGCCGT		

2.1.6.3 Primer für qRT-PCR

Target	Primer Name	Sequenzen in 5' - 3' Richtung	Sonde	Fragment
GP91 ^{phox}	GP91-for-N2	TAGAACTAGTGGATCCTGCCACCA	#26 TGGGCTG FAM Cat 04687574001 (Roche Probe Library)	104bp
	GP91-rev-N2	GACAAAGAGGAAGACGTTCAACCC		
GP91 ^{phox} s	GP91 for	CCTGAGCATCTTCGTGATCC	#5 TGTGGCTG FAM Cat 04685024001 (Roche Probe Library)	66bp
	GP91 rev	CGGTAGTACCACACGAACAGG		
WPRE	WPRE for	GTGGTGTGCTCTGTGTTTGC	#20 CTGGCTGG FAM Cat 04686934001 (Roche Probe Library)	65bp
	WPRE rev	AGTTGACAGGTGGTGGAAT		
human GAPDH	GAPDH-for-qPCR-S60-2	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT	#60 TGGGGAAG FAM Cat 04688589001 (Roche Probe Library)	94bp
	GAPDH-rev-qPCR-S60-2	ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT		

2.1.6.4 Primer für Bisulfit-PCR

Target	BS-PCR	Primer Name	Sequenzen in 5' - 3' Richtung	Fragment
SF71 GP91/ SF71 GFP	1.PCR	BS-for05	AGAATAGAGAAGTTTAGATTAAGG	429bp
		BS-rev06	CCCRAAATAACAATCAATCAA (R wobble= A+G)	
	2.PCR	BS-for05	AGAATAGAGAAGTTTAGATTAAGG	415bp
		BS-rev02	ATCAATCAATCTAAAAAACCCCTCC	
FES GP91	1.PCR	FES-BS-for3	ATATTTTGGGTTTTTTGGGTTTAG	490bp
		FES-BS-rev1	TTCAAACCCAACCACACC	
	2.PCR	FES-BS-for1	TGGGTTTAGTATTGTGGGG	468bp
		FES-BS-rev1-2	CCCAACCACACCAAATC	
FES GFP	1.PCR	FES-GFP-BS-for1	TTTTTTGGGTTTAGTATTTGTTTG	560bp
		FES-GFP-BS-rev1	AAATAAACTTCAAATCAACTTACC	
	2.PCR	FES-GFP-BS-for2	GGTTTAGTATTGTGGGGTTT	420bp
		FES-GFP-BS-rev2	CCTTACTCACCATAATAACAAAATC	
Lenti SFFV GFP	1.PCR	BS-SFFV-F1	TTTTTAGAAAAAGGGGGGAATG	537bp
		BS-SFFV-R1	ACCAAAATAAACACCACCCC	
	2.PCR	BS-SFFV-F2	GGGGGAATGAAAGATTTTA	525bp
		BS-SFFV-R1	ACCAAAATAAACACCACCCC	
A2 (UCOE- URM)	1.PCR	BS-A2-F1	ATTGGTTTGATTTTTGTTT	401bp
		BS-A2-R1	AAACCTTCCCACCATTAAC	
	2.PCR	BS-A2-F2	GTTGGTTGATTTTTATTGAG	365bp
		BS-A2-R1	AAACCTTCCCACCATTAAC	
CBX (UCOE- URM)	1.PCR	BS-CBX-F1	AATTGATTTTTGGTGTATAGGA	592bp
		BS-CBX-R1	AACAAACCAATCAAAAATTAA	
	2.PCR	BS-CBX-F2	TGATTTTTGGTGTATAGGAGAG	583bp
		BS-CBX-R2	CCAATCAAAAATTAAAAAAAAA	
MRP8 (URM)	1.PCR	BS-M-int-F1	TGGTTTAGGTTTTGTGAAGTG	660bp
		BS-M-int-R1	TCAAACCATCAAAAACACTTC	
	2.PCR	BS-M-int-F1	TGGTTTAGGTTTTGTGAAGTG	648bp
		BS-M-int-R2	AAACAACCTCTCCCTACCAAAA	

2.1.6.5 Primer für lokusspezifische Bisulfit-PCR

Integration	BS-PCR	Primer Name	Sequenzen in 5' - 3' Richtung	Fragment
87429F02 (MDS1-5'LTR)	1.PCR	BS-PCRforS01 G2-0003	GGAATTTATTGAAAAATTGTGAGTAAG	549bp
		BS-PCRrevS01	CAATCAATCAATCTAAAAAACCT	
	2.PCR	BS-PCRforS02 G2-0003	TTTATTGAAAAATTGTGAGTAAGGGA	543bp
		BS-PCRrev02	ATCAATCAATCTAAAAAACCTCC	
87429F02 (3'LTR-MDS1)	1.PCR	BS-PCR-forS04	AGGTTTGGTAAGTTAGTTGTAGTAA	566bp
		BS-PCRrevS06 G2-0003-TF	TAATCTCCTACCAAATCCTCTAACCC	
	2.PCR	BS-PCRforS05	TTAAGAATAGAGAAGTTTAGATTAAGGG	473bp
		BS-PCRrevS05 G2-0003-TF	TCCCACCAATTTAAATCCTTAATAT	
87429A02 (3'LTR-MDS1)	1.PCR	BS-72for_o1	AAGGTATGGAAAAATATAAATTAA	618bp
		BS-26rev_o2	AAAACCCTATAAAAAAACCTAAAC	
	2.PCR	BS-72for_n3	TTAAATTAAGAATAGAGAAGTTTAGATT	544bp
		BS-26rev_n4	CTCTAATTTTTACAAAAATATTCACAT	
81676B06 (3'LTR-GLIS1)	1.PCR	BS-PCRfor07	TTGTAGGTTTGGTAAGTTAGT	612bp
		BS-PCRrevS12 G2-0002-TF	TCAAAACCTAAATTCAACTCCAAC	
	2.PCR	BS-PCRfor05	AGAATAGAGAAGTTTAGATTAAGG	539bp
		BS-PCRrevS11 G2-0002-TF	AAATTCAACTCCAACCCTACTTCTA	
76776G11 (MDS1-5'LTR)	1.PCR	BS G11 5for1	GAAAAGGGTGGATGAAAGATTTTAT	508bp
		BS G11 5rev1	AACAATCAATCAATCTAAAAAACCC	
	2.PCR	BS G11 5for2	GGGTGGATGAAAGATTTTATTTGTA	491bp
		BS G11 5rev2	ATCTAAAAAACCCCTCCCAAAAAT	
77110A09 (MDS1-5'LTR)	1.PCR	BS A09 5for1	AATTTAGTTATTTGGAAAGAAAGAAATTA	645bp
		BS A09 5rev1	CAATCAATCAATCTAAAAAACCT	
	2.PCR	BS A09 5for2	AATTAATTATTTTATTAATTTTGGAAAATA	542bp
		BS A09 5rev2	AAACCCTCCCAAAAATCAAC	
75916A08 (PRKRA-5'LTR)	1.PCR	BS A08 5for1	AGTGAAGATATTTTTTTTGGAAAATTTT	555bp
		BS A08 5rev1	CAATCAATCAATCTAAAAAACCT	
	2.PCR	BS A08 5for2	GAAAATTGAAATTTAAGTTTTTGT	511bp
		BS A08 5rev2	ATCTAAAAAACCCCTCCCAAAAAT	
80484A02 (PRKCE-5'LTR)	1.PCR	BS G1-01 5F1	AGAGGGGTTGTTTTTTGGTTT	679bp
		BS G1-01 5R1	ATCAATCAATCTAAAAAACCTCC	
	2.PCR	BS G1-01 5F3	TTTTTTAGATTTAAGGTTTTTTT	591bp
		BS G1-01 5R2	ATCTAAAAAACCCCTCCCAAAAAT	
80484A02 (3'LTR-PRKCE)	1.PCR	BS G1-01 3F1	TTTTAGGTTTTTTAAGGATTTGAAAT	563bp
		BS G1-01 3R1	CTTCCCTTCTACCCAAATAAATAC	
	2.PCR	BS G1-01 3F3	TTTTTAAGGATTTGAAATGATTTTG	516bp
		BS G1-01 3R3	AAATCTCTCTCTCTTACAACCC	
78166H03	1.PCR	BS-56for_o1	TTTGTAGGTTTGGTAAGTTAGTTGTAGT	649bp
		BS-56rev_o2	TAATCAAACCCAAAAATCTATTTAATA	
	2.PCR	BS-56for_n3	ATTAAGAATAGAGAAGTTTAGATTAAGG	542bp
		BS-56rev_n4	ATACACACTCAAATTTAAAAAACACTAC	
G2-0079	1.PCR	BS-79for_o1	GGTATGGAAAAATATAAATTAAGA	588bp
		BS-79rev_o2	ACTTCATAAAAAACAATTAATAAA	
	2.PCR	BS-72for_n3	TTAAATTAAGAATAGAGAAGTTTAGATT	512bp
		BS-79rev_n4	AAAAAATTAACCTACATAAAAAAAA	

2.1.6.6 Primer für Kolonie-PCR

M13_for (-40)	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC

2.1.6.7 Primer für Sequenzierungen von pCR2.1-TOPO

M13_for (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC

2.1.7 Plasmide

2.1.7.1 Klonierungsvektor

Vektor Bezeichnung in dieser Arbeit	Detaillierte Vektor Bezeichnung	Herkunft
M661	SIN11CMVGFP	von Axel Schambach bereitgestellt

2.1.7.2 Plasmid für Subklonierungen

Vektor Bezeichnung	Herkunft
pCR [®] 2.1 TOPO	Invitrogen, Karlsruhe, DE

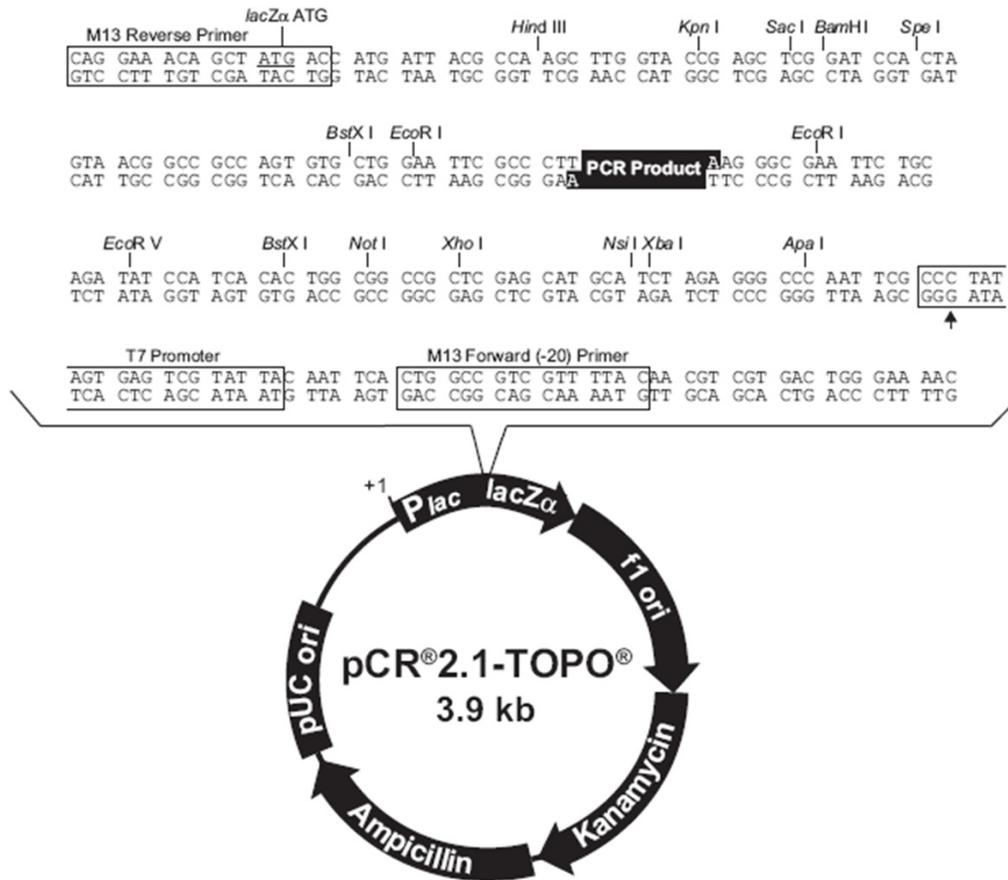


Abb. 2.1 pCR®2.1-TOPO-Vektor. Der pCR®2.1-TOPO-Vektor wurde in dieser Arbeit für Subklonierungen von PCR-Fragmenten und anschließender Sequenzierung verwendet. Dieses Plasmid hat ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion positiver Klone. *lacZα*: α Untereinheit des *lacZ* Gens für Blau/Weiß-Selektion rekombinanter Kolonien, MCS: *multiple cloning site* in *lacZα* mit kovalent gebundener Topoisomerase-I an 3'-Überhang von T (deoxythymidin). Die Topoisomerase ermöglicht die effiziente Ligation von Taq-Polymerase-Fragmenten mit A-Überhang (Deoxyadenosin), M13: M13 Primer *reverse binding site* für Sequenzierungen der Inserts, T7: T7 *promotor/priming site*, f1 ori: *Origin of replication I* (www.invitrogen.com).

2.1.7.3 γ -retrovirale Helferplasmide

Vektor Bezeichnung	Herkunft
pCDNA3MLVg/p	von Stefan Stein bereitgestellt
Eco187	von Stefan Stein bereitgestellt

2.1.7.4 γ -retrovirale Plasmide

Vektor Bezeichnung in dieser Arbeit	Detaillierte Vektor Bezeichnung	Herkunft
SF71 GP91	SF71GP91 ^{phox}	von Stefan Stein bereitgestellt
SF71 GFP	SF71GFPW	in dieser Arbeit kloniert aus SF71GP91 ^{phox} und aus M661Ax (SIN11CMVGFP)
FES GP91	SER11fes91sW	von Eva Arnold bereitgestellt
FES GFP	SER11GFPW	in dieser Arbeit kloniert aus SER11fes91sW und aus M661Ax (SIN11CMVGFP)

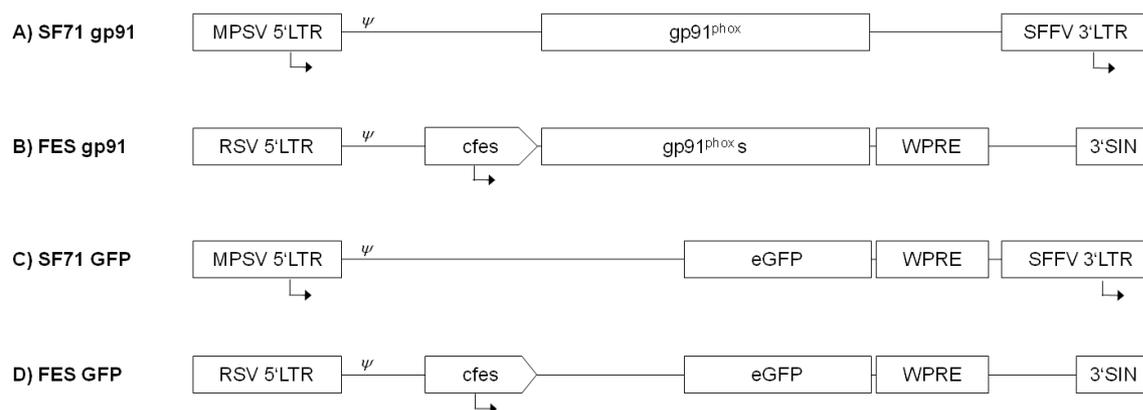


Abb. 2.2 Übersicht γ -retroviraler Plasmide. **A)** In der Frankfurter Gentherapiestudie wurde der Vektor SF71GP91 für die Behandlung von zwei X-CGD Patienten eingesetzt. Die GP91^{phox}-Transgenexpression wird in proviraler Konformation von dem SFFV-Promotor in der viralen 5'LTR gesteuert. **B)** Der Vektor FESGP91 zeigte gute Ergebnisse in präklinischen Mausversuchen für die Anwendung in einer Gentherapie für die Behandlung der Chronischen Granulomatose. In dieser Arbeit wurde der Vektor auf seine Anfälligkeit gegenüber *Silencing* getestet. Aufgrund der SIN-Konfiguration in den LTRs, wird hier die GP91^{phox}-Expressions-kassette von dem internen cfes-Promotor gesteuert. Das Transgen wurde im Vergleich zu der Variante im klinischen Vektor (A) synthetisch hergestellt und codonoptimiert. Zusätzlich wurde es in Fusion mit dem WPRE Element exprimiert. **C)** und **D)** Diese beiden Konstrukte wurden als GFP-Kontrollvektoren für A) und B) bei den prädiktiven *Silencing*-Assays in dieser Arbeit eingesetzt, da das GP91^{phox}-Protein in der murinen Zelllinie P19 im FACS mit dem 7D5 Antikörper nicht detektierbar ist. (MPSV: *Myeloproliferative Sarcoma Virus*; SFFV: *Spleen Focus Forming Virus*; RSV: *Rous Sarcoma Virus*; LTR: *Long Terminal Repeat*; cfes: *feline sarcoma virus*; SIN: *Self Inactivating*; WPRE: *Woodchuck hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element* (WPREmut Variante); eGFP: enhanced green fluorescent protein; ψ : Verpackungssignal)

2.1.7.5 Lentivirale Plasmide

Vektor Bezeichnung in dieser Arbeit	Detaillierte Vektor Bezeichnung	Herkunft
SFFV GFP	pCCL-SEW-GFP WPREmut	von Christian Brendel bereitgestellt
URM	pCCL-UrM-GFP WPREmut	von Christian Brendel bereitgestellt

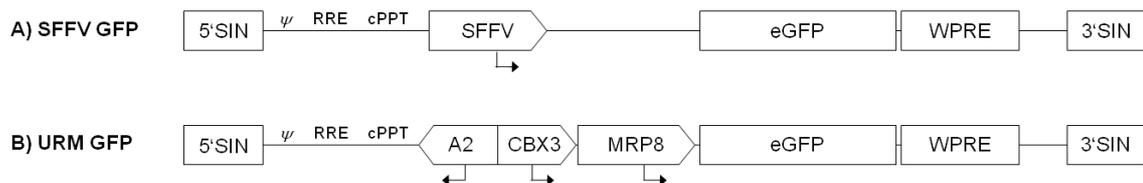


Abb. 2.3 Übersicht lentiviraler Konstrukte in proviraler Konformation. A) SFFVGFP diente in dieser Arbeit als Referenzvektor für den prädiktiven *Silencing*-Assay, da er ebenso wie der klinische Vektor (siehe Abb. 2.2) die Transgenexpression von dem SFFV-Promotor steuert. **B)** Der URM (UCOE rreverse MRP8) - Vektor wurde von Christian Brendel in Mausversuchen aufgrund seiner effizienten und zellspezifischen Expression ausgewählt und daher in dieser Arbeit im prädiktiven *Silencing*-Assay untersucht. Dieser Vektor steuert die Transgenexpression von dem myeloischen Promotor MRP8 in Kombination mit dem bidirektionalen UCOE Element, das aus dem A2 und dem CBX3 Promotor besteht. (SIN: *Self Inactivating*; SFFV: *Spleen Focus Forming Virus*; eGFP: enhanced green fluorescent protein; WPRE: *Woodchuck hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element* (WPREmut Variante); ψ : Verpackungssignal; UCOE: Ubiquitous Chromatin Opening Element; RRE: *Rev Responsive Element*; cPPT: *central Polypurin Tract*; MRP8: *Myeloid Related Protein 8*)

2.1.8 Ausgangsmaterial von X-CGD-Patienten

Peripheres Blut oder Knochenmarksuspensionen von zwei X-CGD-Patienten nach Gentherapiebehandlung wurde in Röhrchen mit EDTA bzw. Heparin von Dr. Marion Ott aus der Hämatologie der Universitätsklinik in Frankfurt am Main erhalten. DNA- und RNA-Isolationen erfolgten sofort nach Erhalt bzw. nach Dichteauffrennung (Ficoll) einzelner Zellpopulationen. Vitale Zellen bzw. Zellpellets wurden nach Aufreinigung kryokonserviert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Arbeiten mit *E. Coli*

2.2.1.1 Transformation kompetenter Bakterien

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA durch kompetente Bakterien. In dieser Arbeit wurde mit chemisch kompetenten DH5 α , TOP10F' oder Stabl2 Bakterienzellen gearbeitet. Diese wurden für die Aufnahme von Plasmid-DNA mit einem Hitzeschock behandelt. Hierfür wurden zwischen 30 μ l und 50 μ l kompetenter Bakterienzellen etwa 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 μ l Ligationsansatz bzw. 1 μ l von einer 1:1000 Vdg. eines Plasmids vorsichtig hinzugegeben und leicht vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 Sek. einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, anschließend 2 min auf Eis inkubiert und danach in 200 μ l SOC Medium (LB-Medium ohne Antibiotika) etwa 45 min bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden jeweils 10 μ l bzw. 50 μ l der Zellen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und 15-18 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei der Verwendung des pCR2.1-TOPO-Vektors in TOP10F' Bakterienzellen wurde auf IPTG/X-GAL vorbehandelten LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Durch Blau/Weiß-Selektion konnten so positive Top10F'-Klone mit Insert, von Klonen mit religiertem Vektor unterschieden werden.

2.2.2 DNA Isolierung

2.2.2.1 Plasmid-Minipräparation

Bei der Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA für Klonierungen oder Sequenzierungen wurde in dieser Arbeit die Plasmid-Minipräparation mit Hilfe der alkalischen Lyse eingesetzt. Hierfür wurden je 4 ml Übernachtskultur in Eppendorf-Gefäßen für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Bakterienzellen wurden in 300 μ l TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; RNase A) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 μ l Lysispuffer (200 mM NaOH; 1% [w/v] SDS) wurden die Zellen durch Invertieren lysiert. Anschließend wurden die Proben mit 300 μ l 3 M KAc, pH 4,8 neutralisiert und 5 min auf Eis inkubiert. Ausgefällene Proteine, Membranbestandteile und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, 4°C) sedimentiert. Die im Überstand enthaltene

niedermolekulare Plasmid-DNA wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe von 0,6 Vol 100%-igem Isopropanol gefällt. Die Proben wurden für 20 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert, hierdurch wurde die gefällte DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde dann zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 µl bis 50 µl dH₂O rückgelöst. Die gelöste DNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.2 Plasmid-Midi/Maxipräparation

Die Präparation von Plasmiden in größeren Maßstäben (≥ 100 µg) erfolgte mit den Nucleo Bond Kits „PC 500“ oder „PC 10000 EP“ (Macherey-Nagel). Die verwendeten Systeme basieren auf Anionenaustauschern. Hierfür werden die Bakterien zunächst durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die Lysate werden auf DNA-bindende Austauschersäulen gegeben. Durch Waschen mit erhöhter Salzkonzentration (800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat; pH 5.0) werden RNA, Proteine und andere niedermolekulare Verunreinigungen aus den Säulen ausgewaschen. Danach wurde die gebundene DNA mit einem Hochsalzpuffer (1250 mM NaCl, 100 mM Tris; pH 8.5) eluiert und durch die Zugabe von Isopropanol gefällt. Nach Waschen mit 70%-igem Ethanol wurde das DNA-Pellet in 100 µl bis 500 µl dH₂O aufgenommen und bei 56°C für 10 min gelöst. Nach Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren (siehe 2.2.3.1) konnte die Plasmid-DNA für zell- und molekularbiologische Arbeiten verwendet werden.

2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA mit dem DNeasy Tissue Kit

Die Isolation genomischer DNA von Patientenzellen an verschiedenen Tagen nach Beginn der Gentherapiebehandlung wurde mit der Silikagel-Membran-Technologie des „DNeasy Tissue“ Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierbei wurden zwischen 100 und 5×10^6 Zellen für die DNA-Präparation eingesetzt und für lokusspezifische PCRs oder Bisulfit-Sequenzierung verwendet.

Maximal 5×10^6 Zellen wurden pelletiert (1500 rpm; 5 min; 4°C) und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und für 2 min bei Raumtemperatur in Anwesenheit von 2 mg/ml RNase A inkubiert. Für die Lyse wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL zugegeben, gut gemischt und für 10 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe und Mischen von 200 µl Ethanol (96 %-

100 %) wurde die genomische DNA gefällt und der gesamte Ansatz auf eine DNeasy Säule gegeben. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei RT und 8000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und DNA mit 500 µl Waschpuffer (AW1) in einem weiteren Zentrifugationsschritt gewaschen. Die gebundene DNA wurde ein zweites Mal mit 500 µl Waschpuffer (AW2) bei 13.000 rpm für 3 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA 2 x mit je 100 - 200 µl Elutionspuffer (AE) bei 8.000 rpm für jeweils 1 min eluiert. Der DNA Gehalt wurde im Nanodrop (siehe 2.2.3.1) bestimmt.

2.2.2.4 Isolierung genomischer DNA mit Proteinase K

Die Isolation von DNA aus Patientenkolonien ist in dieser Arbeit durch Proteinase K Behandlung erfolgt. Die Zellproteine werden hierbei durch die Proteinase K verdaut und die DNA somit freigelegt. Gepickte Kolonien wurden in 100 µl Puffer K (1x PCR Puffer von PE Applied Biosystems; 2,5 nM MgCl₂; 0,5% Tween 20) mit 100 µg/ml Proteinase K resuspendiert. Danach zunächst für 45 min bei 56°C inkubiert, anschließend für weitere 10 min bei 95°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden etwa 5 µl - 20 µl der Lösung entweder für PCR-Analysen oder für Bisulfit-Konvertierungen verwendet.

2.2.3 Arbeiten mit DNA

2.2.3.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von gelöster DNA bzw. RNA erfolgte spektral-photometrisch am Nanodrop, durch Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Der Nanodrop wurde vor den Messungen jeweils mit dH₂O (DEPC) geeicht. Anschließend wurde mit 1 µl - 2 µl Probenmaterial gemessen und darauf geachtet, dass die Extinktionen im linearen Messbereich zwischen 0,1 und 0,9 lagen. Die Konzentrationen der Nukleinsäuren wurde unter Berücksichtigung des jeweiligen Konversionsfaktors (DNA: 50, RNA: 40) berechnet. Die Reinheit der Proben wurde durch das Verhältnis der Extinktionen bei den beiden Wellenlängen (E_{260}/E_{280}) gemessen. Dieser Wert lag bei sauberen DNA Proben bei 1,8 bzw. bei RNA Proben bei 2,0.

2.2.3.2 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

DNA-Moleküle können aufgrund der negativen Ladung der Phosphate in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit in einem Agarosegel hängt von der Größe der jeweiligen Fragmente ab. Kleinere Fragmente wandern hierbei schneller als größere. Entsprechend der Fragmentgrößen wurden Gele mit 1,0 % bis 2,5 % eingesetzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde dafür jeweils in TBE-Puffer (90 mM Tris-Base, 90 mM H₃BO₃, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) in einem Mikrowellenherd aufgekocht, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Nach kurzer Abkühlung wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,3 µg/ml) zugesetzt, bevor das Gel in eine Gelkammer mit entsprechenden Kämmen gegossen wurde. Als Laufpuffer während der Elektrophorese wurde ebenfalls TBE-Puffer verwendet. Aufzutrennende DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf ein Gel mit 0,2 Volumen Ladepuffer (6x konz: 40 % [w/v] Saccharose, 0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylencyanol FF in DEPC-Wasser (0,1 % [w/v] DEPC in dH₂O)) versetzt. Hierdurch sanken die Proben beim Auftragen in die Geltaschen ab. Die Gelelektrophorese wurde bei 35-45 mA (50-100 V) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde jeweils ein Größenmarker (5 µl 100 bp Ladder bzw. 1 kb Ladder) mitgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Transilluminierung unter UV-Bestrahlung bei 302 nm. Die digitale Dokumentation erfolgte mit der Quantity One Software.

2.2.3.3 Restriktion von Plasmid-DNA

Für Plasmidverdaue bei Klonierungen wurden 3 - 5 Einheiten von Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Frankfurt) pro µg DNA eingesetzt. Es wurden 5 µg-10 µg für zwei Stunden bei 37°C in einmal Restriktionspuffer (entsprechend den Vorgaben des Herstellers) geschnitten und anschließend in einem 1 % -igem Agarosegel analysiert.

2.2.3.4 Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurden der „NucleoSpin® Extract“ (Macherey-Nagel) oder der „Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Vorgaben des Hersteller verwendet. Hierfür wurden einzelne Banden unter schwacher UV-Bestrahlung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe eines Hochsalzpuffers wurde das Gelstück mit dem DNA

Fragment bei 50°C geschmolzen. Durch Zugabe von einem Volumen EtOH konnte die präzipitierte DNA an eine Silica Membran durch Zentrifugation gebunden werden. Überschüssige Agarose, sowie Verunreinigungen wurden anschließend durch einen Waschpuffer entfernt. Abschließend wurde die DNA mit TE Puffer (10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) oder dH₂O eluiert und für Klonierungen oder Sequenzierungen eingesetzt.

2.2.3.5 Ethanol Fällung von DNA

Für eine Fällung von DNA in Lösungen nutzt man die Eigenschaft von DNA, aufgrund ihrer starken negativen Ladung in Ethanol unlöslich zu sein und somit auszufallen. Hierfür wurden zu einer DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 3,5 Volumen -20°C kalten 100%-iges Ethanol gegeben und durch vortexen gut vermischt. Bei geringen DNA-Mengen (<100 ng) wurden 20 µg Glycogen zugegeben. Die Ansätze wurden dann etwa 30 min bei -20°C inkubiert, bei 13.200 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das DNA-Pellet einmal mit 70%-igen Ethanol gewaschen um Salze zu entfernen, bei 37°C für etwa 5 min luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen TE Puffer (10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) oder dH₂O bei 37°C rückgelöst.

2.2.3.6 TOPO-TA-Cloning Kit

Die *Taq*-Polymerase besitzt neben ihrer Polymeraseaktivität eine Template unabhängige terminale Deoxyadenosin-Transferase-Aktivität. PCR-Produkte einer *Taq*-Polymerase haben daher überhängende 3'-Adenosin-Enden, was für eine Ligation in einen Zielvektor mit überhängenden 3'-Thymidin-Enden wie z.B. den pCR2.1-TOPO Vektor (siehe 2.1.7.1) genutzt werden kann. Durch eine gebundene Topoisomerase-I mit Ligaseaktivität an den überhängende 3'-T-Enden des pCR2.1-TOPO Vektors ist eine sehr effiziente Ligation möglich. Ein Ligationsansatz bestand jeweils aus 0,25 µl pCR2.1-TOPO-Vektor, 1 µl PCR-Produkt (1:50 verdünnt), 1 µl Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 4 µl (ad dH₂O). Die Ligation ist bei Raumtemperatur (20°C) für 5 min bis 30 min erfolgt. Die Transformation der ligierten DNA-Fragmente erfolgte anschließend in chemisch kompetente TOP10F' Bakterien (siehe 2.2.1.1).

2.2.3.7 Sequenzierung von DNA Fragmenten

Die Sequenzierung mit einem Primer gegen eine bekannte DNA-Sequenz ermöglicht die Identifizierung benachbarter Basenpaare. Die Methode basiert auf der Kettenabbruchsynthese von Sanger. Hierbei wird die enzymatische Replikation durch 2',3'-Dideoxynucleotida (Terminator) der jeweiligen Nucleotide kontrolliert unterbrochen. Da diese charakteristisch für jede Base mit einem Fluoreszenzmarker versehen sind, können anschließend die Kettenabbruch-Produkte aufgetrennt und anhand eines Referenzmarkers, ein Chromatogramm erstellt werden. Hieraus ergibt sich die Basenfolge der sequenzierten DNA. Als Template wurde in dieser Arbeit 1 µl Kolonie-PCR-Fragment, 1 µl Sequenzierprimer und 13 µl dH₂O eingesetzt. Alle Sequenzierungen von Bisulfit-PCR Fragmenten der vorliegenden Arbeit sind im GSH von Margot Landersz an dem 3100 Avant Genetic Analyzer mit dem M13for(-20) oder dem M13rev Primer (siehe 2.1.6.7) durchgeführt worden. Erhaltene Sequenzen konnten anschließend mit dem DNASTAR Programm (siehe 2.1.5) *in silico* analysiert werden.

2.2.3.8 Bisulfit-Konvertierung von DNA

Die Expression von Genen kann epigenetisch durch Methylierung von Promotor-CpG-Dinucleotiden in sogenannten CpG-Inseln reguliert werden. Methylierte Promotoren sind im Allgemeinen transkriptionell reprimiert, wohingegen nicht methylierte Promotoren aktiv zur Transkription beitragen können [135]. Für die Analyse des Methylierungszustandes eines retroviralen Promotors wurde die Bisulfit-Sequenzierung in dieser Arbeit eingesetzt. Hierbei wurde isolierte DNA aus Patientenzellen oder Zelllinien zunächst Bisulfit konvertiert. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Umwandlung von nicht methylierten Cytosinen zu Uracilen, wohingegen diese Reaktion bei methylierten Cytosinen ausbleibt (siehe Abb. 2.4 A). Während der anschließenden PCR-Reaktion werden von der Polymerase Thyminde anstelle der Uracile eingebaut. Durch Sequenzierung subklonierter PCR-Fragmente erfolgte die Bestimmung des Methylierungszustandes proviraler CpG-Dinucleotide in dieser Arbeit (siehe Abb. 2.4 B). Eine Qualitätskontrolle der Konvertierung konnte bei der Auswertung der Sequenzen anhand von Cytosinen welche nicht in CpG-Dinucleotiden lokalisiert waren erfolgen. Da hier in der Regel keine Methylierung stattfindet, sollten diese Cytosine als Thyminde vorliegen. Nach Angaben des Herstellers verlief die Konvertierungsreaktion zu 99% (EpiTect Bisulfit Kit, Qiagen). Dies konnte in den Untersuchungen bestätigt werden. Lagen die Konvertierungsraten deutlich darunter, wurden die Sequenzen aus den

Analysen ausgeschlossen. In dieser Arbeit wurden in der Regel zwischen 100 ng und 500 ng DNA für die Bisulfit-Sequenzierungen initiiell konvertiert. Die Behandlung erfolgte mit dem „EpiTect“ Bisulfit Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers und wurde im iCycler (BioRad) durchgeführt.

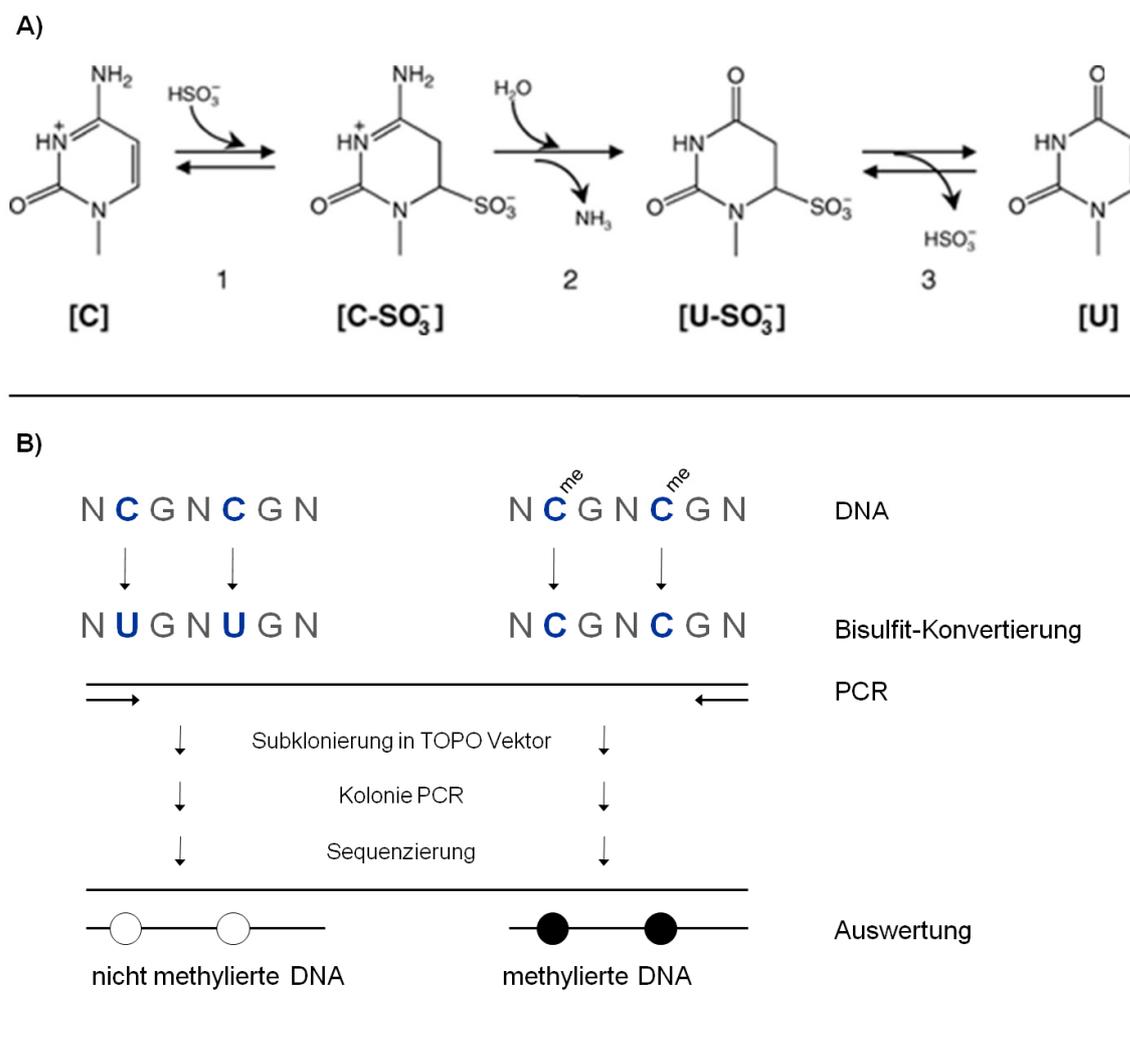


Abb. 2.4 Übersicht der Bisulfit-Konvertierung und -Sequenzierung. A) Die Bisulfit-Konvertierung von Cytosin zu Uracil erfolgt in drei Schritten. Zuerst findet eine Sulfonierung nicht methylierter Cytosine [C] statt. Methylierte Cytosine sind aufgrund der Methylgruppe geschützt. Im zweiten Schritt erfolgt eine irreversible Desaminierung. Im dritten Schritt entsteht durch Desulfonierung Uracil [U] [136]. **B)** Bei der Bisulfit-Sequenzierung wurde isolierte DNA zuerst Bisulfit konvertiert (siehe A). Konvertierte-DNA diente als Template in einer PCR mit Bisulfit spezifischen Primern (siehe 2.1.6.4 und 2.1.6.5). PCR Fragmente wurden in den pCR2.1-TOPO-Vektor subkloniert und in Bakterien transformiert. Nach Kolonie-PCR einzelner Fragmente wurde sequenziert und graphisch ausgewertet.

2.2.4 RNA Isolierung

Bei allen Arbeiten mit RNA Molekülen wurden zuvor verwendete Pipetten, Zentrifugen und Oberflächen von Tischen weitestgehend von RNasen befreit. Dies erfolgte mit „RNase Zap“ bzw. „RNase Zap Wipes“ (Ambion). Es wurden gestopfte Spitzen eingesetzt, RNase freie Reaktionsgefäße genutzt (Non-Stick RNase free Tubes, Ambion) und mit RNase freiem Wasser gearbeitet. Diese Maßnahmen waren notwendig um die RNA vor dem Abbau durch RNasen zu schützen.

2.2.4.1 Trizol

Bei der Isolierung der gesamt RNA von mindestens 1×10^6 Zellen mit Hilfe von Trizol (Invitrogen) wurde nach Angaben des Hersteller gearbeitet. Das Prinzip beruhte auf einer Chloroform Aufreinigung von Nukleinsäuren in der wässrigen Phase nach einer Zelllyse mit dem Trizol-Reagenz. Die genomische DNA Fäll hierbei an der Interphase aus, wohingegen die RNA in der wässrigen Phase (obere Phase) gelöst ist. Zur Minderung von DNA Verunreinigungen wurde in dieser Arbeit die Chloroform Aufreinigung zweimal hintereinander durchgeführt. Bei geringen Zellzahlen wurde die Fällung für eine Stunde bei -80°C zur Erhöhung der Ausbeute gelagert. Pellets wurden je zweimal in 70% -igem Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung an der Sterilbank in 10 μl bis 50 μl RNase freiem bzw. DEPC Wasser rückgelöst. Alle Proben wurden nach vollständiger Rücklösung mit DNase verdaut (siehe 2.2.5.1) bevor weitere Arbeitsschritte erfolgt sind.

2.2.4.2 RNAqueous-Micro Kit

Die RNA-Isolation hämatopoetischer Kolonien mit weniger als 1×10^6 Zellen der zwei untersuchten X-CGD-Patienten ist mit dem „RNAqueous-Micro-Kit“ (Ambion) nach Angaben des Herstellers erfolgt. Das Prinzip beruhte auf der Bindung der Nukleinsäuren auf einer Silica-Membran, welche nach wiederholten Waschschritten in einem geringen Volumen dH_2O (RNase frei) eluiert wurde. Nach der Elution wurde ein DNase Verdau (siehe 2.2.5.1) durchgeführt.

2.2.5 Arbeiten mit RNA

2.2.5.1 DNase Verdau von RNA

Der Abbau verunreinigender DNA in RNA-Präparationen ist mit Hilfe des „*DNA free*“ Protokolls (Ambion) gemäß den Angaben des Herstellers erfolgt. Hier wurden pro 10 µg RNA, 1 µl rDNase in rDNase-Puffer 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase mit der Hilfe inaktivierender Beads pelletiert und der Überstand nach Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.3.1) für cDNA Synthesen (siehe 2.2.5.2 und 2.2.5.3) eingesetzt.

2.2.5.2 cDNA Synthese mit dem Retroscript Kit

Der „Retroscript Kit“ (Invitrogen) wurde nach Angaben des Herstellers für cDNA Synthesen eingesetzt, sofern mindestens 1 µg RNA Ausgangsmaterial vorhanden war. Oligo-Decamer-Primer wurden für die Reverse Transkription eingesetzt. Jede Probe wurde jeweils einmal mit Reverser Transkriptase und einmal ohne Reverse Transkriptase in die Reaktion eingesetzt. Hierdurch konnten unspezifische Signale bei der RT-PCR (siehe 2.2.6.1) nach Auftrennung im Agarosegel bestimmt werden.

2.2.5.3 cDNA Synthese mit RNA-Amplifikation

Die cDNA-Synthese von Patienten-RNA-Material ist mit dem „*Full Spectrum Complete Transkriptome RNA Ampifikation Kit*“ (BioCat) erfolgt. In dieser Arbeit wurden jeweils 100 ng RNA Ausgangsmaterial für die Amplifikation eingesetzt. Das Prinzip beruht auf der klassischen Reversen Transkription (siehe 2.2.5.2) für die Synthese des ersten cDNA Strangs mit „Universal Primern“. Darauf folgte die Synthese des zweiten cDNA Stranges und PCR Amplifikation des RNA Transkriptoms unter Verwendung von „*Full Spectrum PCR Primern*“. Entscheidend bei der quantitativen Amplifikation war die Anzahl der Zyklen, welche für 100 ng RNA Ausgangsmaterial bei 11 Zyklen lag. Bei degradierten Proben wurden zwei zusätzlich Zyklen empfohlen. Mit dieser Vorgehensweise konnte das limitierte Patientenmaterial für RT-PCR und RT-qPCR Untersuchungen eingesetzt werden. Die quantitative Genauigkeit des Amplifizierten Transkriptoms lag nach Herstellerangaben bei 95% bei eingesetzten 100 ng RNA Ausgangsmaterial. Auch hier wurde jede Probe einmal mit Reverser Transkriptase und einmal ohne Reverse Transkriptase in die Reaktion eingesetzt, um unspezifische

Fragmente der PCR Reaktion identifizieren zu können. 5% jeder Amplifikationsreaktion wurde auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen, wodurch die gleichmäßige Amplifikation von Fragmente zwischen 100 bp und 1500 bp überprüft wurde. Nur wenn ein gleichmäßiger Schlier zu sehen war, wurden die Proben für weitere RT-PCR Reaktionen verwendet.

2.2.6 Polymerase Ketten Reaktion

Eine Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation geringer DNA-Mengen mit Hilfe von zwei flankierenden, sequenzspezifischen Primern (Oligonukleotide von 18 bp bis 28 bp Länge) und thermostabilen DNA Polymerasen. Die geschieht in der Regel in drei Schritten:

1. Denaturierung des DNA Doppelstranges bei 95°C
2. Annealing der Primer jeweils bei spezifischer Temperatur (48°C-60°C)
3. Elongation der Primer in 5'-3' Richtung bei 72°C

Durch Wiederholung dieser drei Schritte für 20x bis 35x Zyklen können definierte DNA-Bereiche exponentiell vermehrt werden. In dieser Arbeit wurde hierfür der iCycler (Bio Rad) verwendet. Anschließende Auswertung erhaltener Fragmente erfolgte durch Auftrennung in Agarose Gelen (siehe 2.2.3.2). Eine Übersicht für die Zusammen-setzung der PCR Ansätze sowie der Bedingungen ist in Tab. 4 gezeigt.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Primer for (10 µM)	1 µl	Denaturierung	10 min
Primer rev (10 µM)	1 µl	1) Denaturierung (95°C)	30 s
dNTP's (5 mM)	2 µl	2) Annealing (48°C-60°C)	30 s
10x Taq-Puffer (3,5 mM MgCl ₂)	5 µl	3) Elongation (72°C)	30 s – 1 min
Template	1-10 µl	Elongation (72°C)	2 min
Polymerase (2,5 U)	0,5 µl	Halten (4°C)	∞
dH ₂ O	ad 50 µl	Zyklen 1) bis 3)	25x – 35x

Tab. 4 Allgemeine Übersicht von PCR-Ansatz und -Programm.

2.2.6.1 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine spezielle Form der Polymerase Ketten Reaktion, bei der cDNA (komplementäre DNA) als Template eingesetzt wird. Die cDNA wurde durch Reverse Transkription isolierter RNA aus Patientenzellen oder Zelllinien synthetisiert (siehe 2.2.5.2 und 2.2.5.3). Amplifizierte Fragmente repräsentieren somit spezifische RNA-Transkripte. Diese Methode eignete in dieser Arbeit für die Bestimmung der GP91^{phox}-Transgenexpression (siehe 3.2.2; 3.2.3; 3.2.4), sowie für die Charakterisierung insertioneller Aktivierungen benachbarter Gene proviraler Integrationen (siehe 3.1.1 und 3.1.2). Allgemein wurde beim Primer-Design für RT-PCRs auf die Lokalisierung in verschiedenen Exons. Hierdurch konnten falsch positive Signale von verunreinigter genomischer DNA ausgeschlossen. Zusätzlich wurden negativ Kontrollen mitgeführt, bei denen die Reverse Transkriptase bei der cDNA Synthese nicht zugegeben wurde. Es sind jeweils nested PCRs- bzw. semi-nested-PCRs durchgeführt worden. Hier wurden 1 µl einer 1:50 Vdg. bis zu 5 µl unverdünnter Ansatz aus der ersten PCR als Template für die zweite PCR eingesetzt wurde.

RT-PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Primer for (10 µM)	1 µl	Denaturierung	10 min
Primer rev (10 µM)	1 µl	1) Denaturierung (95°C)	30 s
dNTP's (5 mM)	2 µl	2) Annealing (55°C)	30 s
10x Taq-Puffer (3,5 mM MgCl ₂)	5 µl	3) Elongation (72°C)	45 s
Template (cDNA)	1-10 µl	Elongation (72°C)	2 min
Taq-Polymerase (2,5 U)	0,5 µl	Halten (4°C)	∞
dH ₂ O	ad 50 µl	Zyklen 1) bis 3)	25x – 35x

2.2.6.2 pPCR/RT-qPCR

Eine quantitative PCR (qPCR) ist eine hochspezifische und sensitive Methode, die es erlaubt entstehende PCR-Produkte in Echt-Zeit (Real-Time) zu messen. Wird DNA als Template eingesetzt, spricht man von qPCR. Bei dem Nachweis von RNA-Transkripten wird cDNA eingesetzt, hier spricht man von RT-qPCR. Bei einer qPCR werden diverse Fluoreszenzmoleküle genutzt um entstehende Produkte messen zu können. Der sequenzunspezifische Farbstoff SYBR-Green bindet die kleine Furche der DNA und erhöht seine Fluoreszenz bei der Bindung von Doppelsträngen. Demnach kann auf die Menge an PCR-Produkten von dem Fluoreszenzzuwachs während der PCR-Reaktion zurückgeschlossen werden. Dies ist die einfachste, jedoch aufgrund der unspezifischen Bindung von DNA-Doppelsträngen auch die fehleranfälligste qPCR-Methode, sofern

unspezifische Fragmente nicht ausgeschlossen werden können. Die geschieht im Allgemeinen über die Analyse der Schmelzkurven entstandener Produkte nach dem PCR Lauf. Eine Möglichkeit die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, ist die Verwendung von 5'-fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide (Sonden) in Kombination mit sequenzspezifischen Primern. Fluoreszenzmarkierte Sonden haben an dem 3' Ende einen Quencher (*dark dye*) welcher durch FRET (Fluoreszenz Resonanz Elektron Transfer) die Fluoreszenz vom 5' Ende bei räumlicher Nähe absorbiert. Beim Abbau dieser Sonde durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase während der PCR-Reaktion werden Fluoreszenzmoleküle (z.B. FAM, ROX) räumlich vom Quencher getrennt, hierdurch kann die Fluoreszenz nicht mehr absorbiert werden. Daher entsteht ein messbares Fluoreszenzsignal welches proportional zu der Amplifikation während der PCR ist. Durch Aufnahme der Signale von einer CCD (*charged couple device*) Kamera mit spezifischen Filtern für jeweilige Floreszenzen, kann die sigmoidale Amplifikation von PCR-Produkten berechnet werden. Hierbei sind drei Phasen der Amplifikation zu beachten. Dies sind die exponentielle, die lineare und die Sättigungsphase. Messwerte einzelner Probe werden bei einer qPCR bei Eintritt in die exponentielle Phase bestimmt, sobald ein reaktionsspezifischer *Threshold* überschritten wird. Die Anzahl der Zyklen bis zum Eintritt in exponentielle Phase wird als „C_t“ definiert und dient als Berechnungsgrundlage für Mengenbestimmungen von PCR-Produkten.

In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) der Transgenexpression in Patienten- und P19-Zellen und die absolute Quantifizierung bei der Analyse proviraler Kopien in P19-Zellen angewendet. Bei der relativen Quantifizierung werden erhaltene Messwerte mathematisch zueinander in Relation gesetzt und somit eine relative Veränderung der Messgröße bestimmt. Bei der absoluten Quantifizierung werden unbekannte Proben in Bezug zu einer Eichreihe mit bekannten Werten (z.B. Zellklone mit einer proviralen Kopie) gesetzt.

Primer- und Proben-Design sind in dieser Arbeit mit dem „*Universal Probe Library Assay design center*“ (www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp) erfolgt. Hier wurde eine *Library* von 165 Sonden mit jeweils 8 bis 9 Nukleotiden Länge genutzt. Durch Verwendung derart kurzen Sonden, können vielfältige Zielsequenzen abgedeckt werden, jedoch wird die Spezifität der PCR-Reaktion erst in Kombination mit den beiden flankierenden Primern gewährleistet

Alle qPCR-Reaktionen in dieser Arbeit wurden jeweils in Triplikaten gemessen. Jedes Zielgen wurde über ein Haushaltsgen (z.B. Aktin, GAPDH) normalisiert. Standard-

abweichungen wurden aus zwei unabhängigen Läufen berechnet, deren jeweilige Triplikate gemittelt wurden. Es wurde entweder der iCycler (Bio Rad) oder der Light Cycler 480 (Roche) verwendet. Nachfolgend sind Reaktionsansätze und Bedingungen für verschiedene Nachweise angegeben.

Duplex qPCR/RT-qPCR-Ansatz (GP91 ^{phox} s/mAct)		PCR-Programm	
GP91s Primer rev (30 µM)	0,5 µl	Denaturierung/Aktivierung	15 min
GP91s Primer rev (30 µM)	0,5 µl		
GP91s Sonde #5 (10 µM)	0,2 µl	1) Denaturierung (95°C) 2) Annealing/Elongation (60°C)	15 s 60 s
m-βAktin Primer for (12 µM)	0,5 µl		
m-βAktin Primer rev (30 µM)	0,5 µl		
m-βAktin Sonde #5 (16 µM)	0,1 µl	Zyklen 1) bis 2)	50x
2x AB-PCR Mix	10 µl		
Template DNA (10 ng) / cDNA dH ₂ O	1-7,7 µl ad 20 µl		

Tab. 5 qPCR/RT-qPCR für den Nachweis von GP91^{phox}s und m-βAktin. Primer und Sonden siehe 2.1.6.3.

Duplex qPCR/RT-qPCR-Ansatz (GP91 ^{phox} /mAct)		PCR-Programm	
GP91 f (300 nM)	1 µl	Denaturierung/Aktivierung	15 min
GP91 r (300 nM)	1 µl		
GP91 Sonde (2 nmol)	0,2 µl	1) Denaturierung (95°C) 2) Annealing/Elongation (60°C)	15 s 60 s
m-βAktin Primer for (12 µM)	0,5 µl		
m-βAktin Primer rev (30 µM)	0,5 µl		
m-βAktin Sonde #5 (16 µM)	0,1 µl	Zyklen 1) bis 2)	50x
2x AB-PCR Mix	10 µl		
Template DNA (10ng) / cDNA dH ₂ O	1-6,7 µl ad 20 µl		

Tab. 6 qPCR/RT-qPCR für den Nachweis von GP91^{phox}s und m-βAktin. Primer und Sonden siehe 2.1.6.3.

RT-qPCR-Ansatz (GP91 ^{phox} /GAPDH)		PCR-Programm	
Primer for (10µM)	1 µl	Denaturierung/Aktivierung	15 min
Primer rev (10µM)	1 µl	1) Denaturierung (95°C) 2) Annealing (55°C) 3) Elongation (72°C)	30 s 30 s 30 s
2x AB-PCR Mix	12,5 µl		
Template cDNA	1-10 µl		
Sonde	0,5 µl	Zyklen 1) bis 3)	50x
dH ₂ O	ad 25 µl		

Tab. 7 RT-qPCR für den Nachweis von GP91^{phox} und GAPDH. Primer und Sonden siehe 2.1.6.3

2.2.6.3 Bisulfit-PCR

Bei einer Bisulfit-PCR wurde sog. Bisulfit konvertierte DNA (BS-DNA siehe 2.2.3.8) als Template einer Reaktion eingesetzt. Das Primer-Design ist mit Hilfe der Methprimer-Software erfolgt [137] und in der Regel in CpG-freie Bereiche gelegt worden. Hierdurch wurde die Amplifikation methylierter sowie nicht methylierter Cytosine gleichermaßen ermöglicht. Bei dem Design von Primer BS-rev06 konnte ein CpG in der Sequenz nicht vermieden werden, daher wurde ein degenerierter Primer mit einer wobble Base (A oder G) an dieser Stelle verwendet (siehe 2.1.6.4). Es sind jeweils nested PCR bzw. semi-nested-PCRs durchgeführt worden, bei denen 1 µl der ersten PCR als Template für die zweite PCR eingesetzt wurde. Nachfolgend sind Reaktionsansätze und Bedingungen angegeben.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Primer for (10 µM)	1 µl	Denaturierung	10 min
Primer rev (10 µM)	1 µl	1) Denaturierung (95°C)	30 s
dNTP's (5 mM)	2 µl	2) Annealing (52°C/55°C)	30 s
10x Taq-Puffer (3,5 mM MgCl ₂)	5 µl	3) Elongation (72°C)	45 s
Template (BS-DNA)	1-10µl	Elongation (72°C)	2 min
Taq-Polymerase (2,5 U)	0,3 µl	Halten (4°C)	∞
dH ₂ O	ad 50 µl	Zyklen 1) bis 3)	35x

Tab. 8 Bisulfit-PCR-Ansatz und -Programm. Primer siehe 2.1.6.4 und 2.1.6.5

2.2.6.4 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde in dieser Arbeit als Standard-PCR durchgeführt, bei der einzelne Bakterien-Kolonien als Template für eine PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Die Bakterien-Kolonien wurden zuvor mit dem pCR2.1-TOPO Vektor (siehe 2.1.7.1) transformiert und nach Blau-Weiß Selektion positive Klone gepickt werden. In diesen Vektor wurden jeweils PCR-Fragmente von RT-PCRs (2.2.6.1) oder Bisulfit-PCRs (2.2.6.3) subkloniert. Erhaltene Fragmente der Kolonie-PCR wurden meist für Sequenzierungen eingesetzt. Nachfolgend sind Reaktionsansätze und Bedingungen angegeben.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Primer for (10 µM)	1 µl	Denaturierung	10min
Primer rev (10 µM)	1 µl	1) Denaturierung (95°C)	30 s
dNTP's (5 mM)	2 µl	2) Annealing (53°C)	30 s
10x Taq-Puffer (3,5 mM MgCl ₂)	5 µl	3) Elongation (72°C)	45 s
Polymerase (2,5 U)	0,3 µl	Elongation (72°C)	2 min
dH ₂ O	ad 50 µl	Halten (4°C)	∞
		Zyklen 1) bis 3)	25x

Tab. 9 Kolonie-PCR-Ansatz und -Programm. Primer siehe 2.1.6.6.

2.2.7 Klonierungsstrategien für zwei γ -retrovirale Vektoren

Der MPSV basierte γ -retrovirale Ausgangsvektor SF71GP91 (von Stefan Stein bereitgestellt) und der RSV basierte γ -retrovirale Ausgangsvektor FESGP91 (von Eva Rudolf bereitgestellt) wurden mit NcoI und HindIII verdaut. Die Vektorrückräder wurden im Anschluss jeweils mit einem NcoI/HindIII Fragment aus dem M661Ax (von Axel Schambach bereitgestellt) Vektor ligiert. Somit wurde die GP91^{phox} bzw. die GP91^{phox}_s-WPREmut-Expressionskassette jeweils durch eine GFP-WPREmut-Expressionskassette ausgetauscht.

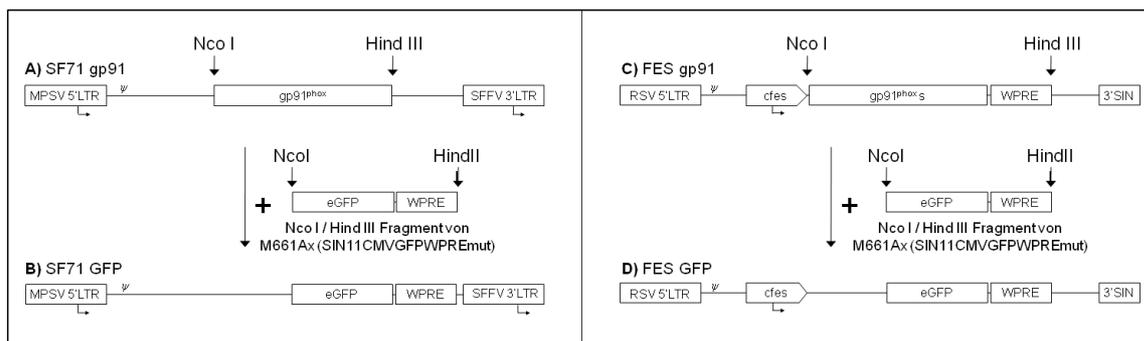


Abb. 2.5 Klonierungsstrategien γ -retroviraler Vektoren SF71GFP und FESGFP (SER11fesGFPW). Ausgangsvektoren sind in A) SF71GP91 bzw. C) FESGP91 gezeigt. Durch Ligation der eGFP-WPRE Kassette aus M661Ax wurden SF71GFP und FESGFP kloniert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Arbeiten mit Zellen

2.3.1.1 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Zellen im Volumenverhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,4 %) gemischt. Trypanblau ist ein negativ geladener Farbstoff, der durch die Membran toter Zellen diffundieren und somit anfärben kann, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Durch Auszählung der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer konnten lebende bzw. tote Zellen folgendermaßen bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Anzahl gezählter Zellen} / \text{Anzahl ausgezählter Quadrate}) \times (\text{Vdg.-Faktor}) \times 10^4$$

2.3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen wurden bei 80 % bis 90 % Dichte, einmal in Zellkulturmedium gewaschen und in entsprechendem Zellkulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO in Kryo-Gefäßen aufgenommen. Anschließend wurde in einem Isopropanol Bad langsam auf -80°C gekühlt und zur längeren Lagerung im Stickstofftank bei -196°C aufbewahrt.

2.3.1.3 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Zum entfernen von DMSO wurden die Zellen anschließend zweimal in entsprechendem Zellmedium gewaschen und mit der jeweiligen Zelldichte ausplattiert.

2.3.2 Arbeiten mit Zelllinien

2.3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Medien und PBS wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

2.3.2.2 Kultivierung humaner 293T-Verpackungszellen

Bei der 293T-Zelllinie handelte es sich um eine humane Nierenzelllinie aus primärem, embryonalem Nierengewebe. Diese Zellen waren mit dem Adenovirus E1A-Genprodukt transformiert. Zusätzlich wurde das SV40 *large-T*-Antigen transfiziert, welche die episomale Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung und entsprechendem Promotor ermöglichte (ATCC: CRL-1573; [138]). Das Gen für das *large-T*-Antigen wurde mit einem G418-Resistenzgen kotransfiziert und durch Kultur der Zellen über mehrere Passagen in Gegenwart von 400 µg/ml G418 selektioniert [139]. Die adhären 293T-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA 1:5 bis 1:10 verdünnt. Für die Verwendung von 293T-Zellen für die Virusproduktion (siehe 2.3.3) in dieser Arbeit wurden die Zellen frisch aufgetaut und maximal bis Passage 20 verwendet.

2.3.2.3 Kultivierung muriner P19-Zellen

Die murine embryonale karzinoma Zelllinie P19 (DSMZ: ACC 316) wurde von einem Teratokarzinom aus dem C3H/He Mausstamm etabliert [140, 141]. Die Kultivierung erfolgte in α -MEM mit 20 % FCS, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Diese adhären 293T-Zellen wurden unter Verwendung von Trypsin/EDTA alle 3 - 4 Tage 1:10 bis 1:20 gesplittet. Die P19-Zelllinie wurde in dieser Arbeit für Virustiterbestimmungen und für den prädiktiven *Silencing*-Assay (siehe 3.5.2 und 3.5.5) eingesetzt.

2.3.3 Produktion γ -retroviraler Partikel

Die Produktion replikationsinkompetenter γ -retroviraler Partikel ist in 293T-Zellen (siehe 2.3.2.2) durch Drei-Plasmid-Transfektion erfolgt. Sowohl der Transfervektor, als auch die beiden akzessorischen Helfervektoren enthalten je einen SV40-Replikationsursprung. Da die 293T-Zelllinie das *large-T*-Antigen von SV40 stabil exprimiert, können die eingebrachten Plasmide repliziert werden, was letztlich zu einer Erhöhung der Anzahl produzierter viraler Partikel führt. Bei der Virusproduktion wird der transgenkodierende Transfervektor als einziger Vektor in die viralen Partikel verpackt, da er das Verpackungssignal (ψ) enthält. Die akzessorischen Helfervektoren kodieren für die

Strukturgene (*gag/pol*) bzw. für das virale Hüllprotein (*env*) und werden in *trans* für die Virusproduktion bereitgestellt, jedoch nicht in die viralen Partikel verpackt.

Für die Transfektion von 293T Zellen wurde die Kalzium-Phosphat-Methode eingesetzt. DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitate werden hierbei von Zellen durch Endozytose aufgenommen. Vierundzwanzig Stunden vor einer Transfektion wurden 5×10^6 293T-Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zwei Stunden vor einer Transfektion wurde der Kulturüberstand gegen 8 ml frisches Medium ausgetauscht. Für jede Transfektion einer 10 cm Kulturschale wurde folgender Ansatz in einem 12 ml Reaktionsgefäß gemischt:

- 5 µg Transfervektor
- 7,5 µg pCDNA3MLVg/p (*gag und pol*)
- 1 µg Eco187 (Hüllprotein *env*)
- 50 µl 2,5 M CaCl₂
- ad 500 µl 0,1 TE + dH₂O (Verhältnis 2:1)

Unter „ausblubbern“ mit einer Pipettierhilfe wurde diesem Ansatz 500 µl 2x HBS-Puffer (281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 7,11±0,01) zugetropft. Nach 5-10 min Inkubation bei Raumtemperatur, wurde das Präzipitat tropfenweise auf die Zellen pipettiert, durch leichtes Schwenken der Schale gut verteilt und unter dem Lichtmikroskop überprüft. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank wurde das DMEM-Medium gegen 4 ml αMEM-Medium ausgetauscht. Vierundzwanzig und 48h Stunden später wurde der Virusüberstand abgesammelt und dabei durch einen 0,45 µm-Filter (mit PBS vorgewaschen) steril filtriert. Anschließend wurde der Virusüberstand bei -80°C in 0,5 ml bis 1 ml Aliquots gelagert. Da Einfrieren und Auftauen die Konzentration an infektiösen viralen Partikeln verringerten, wurde für nachfolgende Titerbestimmungen (siehe 2.3.3.1) und Transduktionen (siehe 2.3.3.1) immer einmal-weggefrorener Virusüberstand verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde durch FACS-Analyse virusproduzierender 293T-Zellen kontrolliert.

2.3.3.1 Virustiterbestimmung und Transduktion von P19-Zellen

Der biologische Virustiter wurde durch Transduktion einer definierten Anzahl von Zielzellen berechnet. Ein Tag vor einer Transduktion wurden $2,5 \times 10^4$ P19-Zellen in einer 24-Lochplatte in 500 μ l Medium ausgesät. Verdünnungen des Virusüberstandes (1:10 bis 1:1000) wurde zusammen mit Protaminsulfat in einer Endkonzentration von 4 μ g/ml in Duplikaten auf die Zielzellen gegeben. Anschließend wurde der Virusüberstand bei 1250 g und 32°C für 90 min auf die Zielzellen zentrifugiert. Danach wurde der Transduktionsansatz über Nacht (14 h bis 18 h) im Brutschrank inkubiert und der Virusüberstand am nächsten Tag durch frisches Medium ersetzt. Die Bestimmung des Virustiters (transduzierende Einheiten/ml) erfolgte nach insgesamt 72 h am FACS anhand einer Probe der Verdünnungsreihe, die weniger als 20% transduzierte Zellen enthielt. Durch diese Auswahl wurden vor allem Zellen mit einer proviralen Kopie pro Zelle in die Auswertung einbezogen und somit Mehrfachtransduktionen einzelner Zellen vermieden, die zu Fehleinschätzungen des biologischen Titers geführt hätten. Die Berechnung wurde folgenderweise vorgenommen:

$$\text{Virustiter [TU/ml]} = \frac{\text{transduzierte Zellen [\%]}}{100 \%} \times \text{Zellzahl} \times \text{Vdg-Faktor}$$

Die Transduktion von P19-Zellen ist in 6-Loch Zellkulturplatten erfolgt. Hierfür wurden 2×10^5 Zellen je Vertiefung in Duplikaten ausplattiert und in Gegenwart von Protaminsulfat (4 μ g/ml) mit verschiedenen Volumina Virusüberstand entsprechend der gewünschten MOI (zwischen 0,05 und 5) versetzt. Die Viruspartikel wurden anschließend für 90 min bei 1250 g und 32°C auf die P19-Zellen zentrifugiert und danach im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach jeweils 2 bis 3 Tagen wurde die Transgenexpression im FACS gemessen und parallel ein Teil der Zellen für RNA- bzw. DNA-Analysen für einen *Silencing*-Assay (siehe 3.5) abgenommen. Die übrigen Zellen wurden jeweils bis zum Ende der Versuchsreihe weiterkultiviert und abschließend kryokonserviert.

2.3.4 Arbeiten mit primären Patientenmaterial

2.3.4.1 Pancoll Aufreinigung peripherer Blutzellen von X-CGD-Patienten

Peripheres Blut (EDTA) von zwei X-CGD-Patienten wurde nach Gentherapiebehandlung in regelmäßigen Abständen von der Hämatologie (Dr. Marion Ott) erhalten. Für die Aufreinigung verschiedener Zellpopulationen mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die Proben zuerst 1:2 bis 1:3 in PBS verdünnt. Anschließend wurden 20 ml Pancoll vorsichtig mit 30 ml verdünnter Blutproben überschichtet. Durch Zentrifugation dieser Ansätze für 30 min bei 726 g bei 20°C (ohne Bremse) wurden die roten Blutkörperchen und die Granulozyten von den Monozyten, Lymphozyten und Blutplättchen getrennt. Sowohl rote Blutkörperchen als auch Granulozyten waren jeweils am Gefäßboden wiederzufinden, wohingegen Monozyten, Lymphozyten und Blutplättchen einen weißen Interphasering zwischen dem Pancoll-Medium und dem Blutplasma bildeten. Zur Aufreinigung mononuklearer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs: Monozyten und Lymphozyten) wurde das Plasma zuerst vorsichtig abgenommen und die Zellen des Interphaserings in einem neuen Falcon Gefäß in 50 ml PBS für 5 min bei 394 g und 20°C zweimal gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde ein Teil der Zellen vital oder als Pellet weggefroren und der Rest für DNA- und RNA-Isolierungen oder für FACS-Analysen eingesetzt. Granulozyten wurden aus der Zellfraktion auf den roten Blutkörperchen am Falcon-Gefäßboden gewonnen. Hierzu wurden unerwünschte roten Blutkörperchen durch Zugabe von 1x Pharm Lysis-Puffer für 30 min im Dunkeln lysiert. Anschließend wurde in 50 ml PBS gewaschen und bei Bedarf ein zweites Mal lysiert. Abschließend wurde das Zellpellet in 10-15 ml Kulturmedium für die Bestimmung der Zellzahl aufgenommen. Je nach Zellzahl wurden Aliquots direkt für DNA-, RNA- und FACS-Analysen verwendet und restliche Zellen in Pellets weggefroren oder vital in Aliquots mit bis zu 2×10^7 Zellen kryokonserviert.

2.3.4.2 Pancoll Aufreinigung von Knochenmarkzellen von X-CGD-Patienten

Blut aus dem Knochenmark (EDTA bzw. Heparin) der X-CGD-Patienten nach Gentherapiebehandlung wurde von der Hämatologie (Dr. Marion Ott) erhalten. Die Aufreinigung mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark ist wie unter 2.3.4.1 beschrieben erfolgt. Allerdings wurde vor der Dichtegradientenzentrifugation im Verhältnis 1:5 in PBS verdünnt, 1 ml DNase I (Pulmozym) zugegeben und nach 40 min Inkubation (bei Raumtemperatur unter schwenken) wurden die Zellen durch ein Zellsieb

gerieben. Aufgereinigte mononukleäre Zellen wurden nach dem Waschen für FACS-Analysen, Kryokonservierung, Methylzellulose- bzw. Collagen-Assays oder AzaD/TSA-Behandlungen in dieser Arbeit verwendet.

2.3.4.3 Kolonie-Assay auf Methylzellulose

Zur Charakterisierung proviraler Integrationsorte und der Genexpression einzelner Zellklone des zweiten X-CGD-Patienten wurde ein Kolonie-Assay auf Methylzellulose genutzt. Hierfür wurden 6×10^4 mononukleäre Zellen in 300 μ l IMDM (2 % FCS, 1000 U/ml Penicillin, 1000 mg/L Streptomycin) mit 2,7 ml Methylzellulose Mix (StemCell Technologies) vermischt und kurz gevortext. Nachdem sich die Luftblasen abgesetzt hatten wurden je 1 ml in 35 mm Zellkulturschalen pipettiert und mit leichtem drehen gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden zusammen mit einer wassergefüllten 35 mm Schale in eine 100 mm Petrischale gestellt und 12 bis 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Einzelne Kolonien wurden unter dem Mikroskop gepickt und je zur Hälfte für klonale DNA- und RNA-Analysen verwendet.

2.3.4.4 Kolonie-Assay auf Collagen

Der Nachweis der Superoxid-Rekonstitution von X-CGD-Patientenzellen nach AzaD/TSA-Behandlung wurde mit Hilfe des Kolonie-Assays auf Collagen durchgeführt. Im Unterschied zu dem Methylzellulose-Assay (siehe 2.3.4.3) wurden bis zu 4×10^5 Zellen in 100 μ l IMDM mit 2% FCS zu 2 ml zytokinhaltigem CollagenCult (StemCell Technologies) (50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml G-CSF) gemischt und anschließend 1200 μ l kalte Kollagen-Lösung zugegeben und gevortext. Danach wurden je 1,1 ml des Kollagen-Zellgemisches pro Platte ausplattiert und 12 bis 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Kolonien wurden nach NBT-Färbung (siehe 2.3.4.5) ausgewertet.

2.3.4.5 NBT-Färbung hämatopoetischer Kolonien

Für den Nachweis der NADPH-Oxidase Aktivität in hämatopoetischen Patientenkolonien wurden CFUs (*colony forming units*) auf Collagen nach etwa 14 Tagen mit einem NBT-Assay (*Nitroblue Tetrazolium*) untersucht. Dieser Assay diente dem Nachweis von reaktiven Sauerstoff-Spezien (ROS) durch Farbumschlag (blau) der NBT-Lösung. In

dieser Arbeit wurden hierfür Kolonien mit 0,2 % NBT-Lösung in PBS mit 1 mg/ml PMA überschichtet und für 1 h im Brutschrank inkubiert. NBT positive Kolonien wurde am Lichtmikroskop ausgezählt und für DNA- sowie RNA-Analysen einzeln gepickt.

2.3.4.6 Aza-D/TSA-Behandlung primärer Patientenzellen

Durch Behandlung von Zellen mit einem Methyltransferase-Inhibitor (Aza-D: 5-Aza-2'-Deoxycytidin) in Kombination mit einem Histondeacetylase-Inhibitor (TSA: Trichostatin A) kann einer transkriptionellen Repression von Genen entgegengewirkt werden [142]. In dieser Arbeit wurden mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark von P2 an Tag 1240 nach Therapiebeginn zunächst in 24-Loch Zellkulturplatten für 6 Tage in Expansionsmedium (IMDM Medium mit 4 mM L-Glutamin, 30 % FCS, 1 % Pen/Strep, 60 ng/ml hIL3; 100 ng/ml hSCF; 100 ng/ml hFLT3L; 300 ng/ml hTPO) zur Stimulierung der Proliferation von CD34⁺-Vorläuferzellen kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde alle 2-3 Tage durch Trypan-Färbung (siehe 2.3.1.1) auf Zellzahl und Proliferation überwacht. Danach wurde 2 Tage mit Aza-D (0 nM, 200 nM, 1000 nM und 2500 nM) behandelt und zur Verringerung toxischer Nebenwirkung anschließend zweimal in 10 ml PBS gewaschen. Darauf folgte eine Behandlung mit TSA (16,5 nM) für 7 Tage. Bei der negativen Kontrolle wurde die Aza-Behandlung ausgespart, ansonsten genauso wie mit den anderen Proben verfahren. Nach der TSA-Behandlung wurde ein Teil der Zellen für Bisulfit-Sequenzierungen (siehe 2.2.3.8) verwendet und der Rest auf Kollagen ausplattiert um die Reaktivierung der Superoxidproduktion hämatopoetischer Kolonien mit Hilfe eines NBT-Assays (siehe 2.3.4.5) zu bestimmen.

2.3.5 FACS Messung

Mit Hilfe des *Fluoreszenz Activated Cell Sorters* (FACS) können Zellproteine durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. Durch eine komplexe Lasertechnik werden die Zellen in einem geschlossenen, flüssigkeitsgefüllten Kapillarsystem einzeln gemessen. Hierbei werden charakteristische Eigenschaften der Zellen wie Größe, Granularität und Fluoreszenz bestimmt. Mit dieser Technik konnte die Transgenexpression auf Proteinebene in definierten Zellpopulationen analysiert werden. Dies war aufgrund von Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen GP91^{phox} oder der Eigenfluoreszenz von GFP möglich. In dieser Arbeit wurden für eine FACS-Probe zwischen 1 - 2 x 10⁵ Zellen in PBS gewaschen und für einen GP91^{phox}-Nachweis mit dem 7D5-PE

Antikörper (siehe 2.1.2.2) für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS Puffer (1 % FBS, 0,1 % NaN₃ in 1x PBS) gewaschen und mit FACS-Fix-Lösung (1 % Formaldehyd in 1x PBS) fixiert. GFP transduzierte Zellpopulationen wurden direkt fixiert. Am FACS-Gerät (FACS Scan) wurden die Proben jeweils im Vergleich zu negativ Kontrollen (wt Zellen und wt Zellen mit Isotypenkontrolle des eingesetzten Antikörpers, siehe 2.1.2.2) gemessen. Auswertungen erfolgten mit Hilfe der Cell Quest Pro-Software (Becton Dickinson).

2.3.5.1 FACS Sortierung

Die Sortierung von unterschiedlichen Zellfraktionen innerhalb einer Zellpopulation aufgrund der charakteristischen Proteinexpression auf der Zelloberfläche ist mit dem FACS möglich. Durch die Lasertechnik können positive (fluoreszierende) Zellen identifiziert und selektiv von der restlichen Population getrennt werden. Dies erfolgt durch ein bestimmtes *gating* der Zellen. In dieser Arbeit wurden primäre Zellen von einem X-CGD-Patienten 472 Tage nach Gentherapiebehandlung in eine GP91^{phox} exprimierende und eine GP91^{phox}-negative Population für weiterführende RNA-Analysen getrennt. Dies erfolgte mit Hilfe des 7D5-PE Antikörpers (siehe 2.1.2.2) am FACS ARIA (Becton Dickinson).

2.4 Bioinformatische Methoden

2.4.1 *In silico* Analysen von DNA- und RNA-Sequenzen.

Mit Abschluss der Sequenzierung des humanen Genoms sind Kartierungen proviraler Integrationsorte, sowie Analysen von RNA-Transkripten benachbarter Genen am Insertionsort ermöglicht worden. Provirale Integrationsstellen von zwei Gentherapie-behandelten X-CGD-Patienten wurden mittels LAM-PCR (Manfred Schmidt) bestimmt. Anhand LTR-flankierender genomischer Sequenzen konnte der Integrationsort durch Sequenzvergleich mit Datenbanken exakt bestimmt werden (www.ncbi.nlm.nih.gov/, www.ensembl.org/index.html, genome.ucsc.edu/). Mit Hilfe dieser Sequenzinformation konnte das Primer-Design lokusspezifischer Bisulfit-Sequenzierungen erfolgen. Darüber hinaus waren die BLAST-Ergebnisse Grundlage für untersuchte RNA-Transkripte am Integrationsort. Indieser Arbeit waren vor allem MDS1-EV11- und PRDM16-Transkripte

von Bedeutung. Das Primer-Design für einzelne RNA-Transkripte ist mit der Software von Integrated DNA Technologies (<http://eu.idtdna.com/scitools/scitools.aspx>) erfolgt.

2.4.2 CpG-Inseln und Primer-Design für Bisulfit-Sequenzierungen

Für Bisulfit-Sequenzierungen wurden zunächst Sequenzen auf CpG-Inseln untersucht (vor allem im Promotorbereich). Hierzu wurde das Programm „MethPrimer“ (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) verwendet [137]. Die Bestimmung von CpG-Inseln erfolgte nach folgenden Kriterien: GC > 50 %; GC Anteil vorhanden zu erwartet > 0,6; min. 100 bp Fragmentlänge. Das Programm berechnet Primer für die Amplifikation von Bereichen mit CpG-Inseln. Hierbei wurde sehr genau auf die Fragmentlänge geachtet, da bei Bisulfit-Konvertierung der DNA leicht Doppelstrangbrüche entstehen und bisher nur Fragmente bis etwa 720 bp (Angaben des EpiTect Bisulfit Kits, Qiagen) nachweisbar sind.

2.4.3 Auswertung und graphische Darstellung von Bisulfit-Sequenzierungen

Die Auswertung der Bisulfit-Sequenzierungen ist mit dem Programm DNASTar erfolgt. Sequenzen aus den verschiedenen Versuchsreihen, wurden mit der original Sequenz sowie der in silico konvertierten original Sequenz mit dem SeqMan Programm in einem Sequenz-Alignment übereinandergelegt. Hierdurch konnten methylierte Cytosine (welche als C auftauchen) von nicht methylierten Cytosine (welche durch die Konvertierung als T auftauchen) unterschieden werden (siehe Abb. 2.4). Die anschließende Auswertung von CpG-Dinukleotiden erfolgte mit Hilfe von Power Point, in dem methylierte Cytosine als schwarzer Kreis, nicht methylierte Cs als weißer Kreis in einer Reihe graphisch dargestellt wurden. Eine Reihe entsprach jeweils einer sequenzierten Bakterien-Kolonie. Quantifizierungen wurden durch Auszählen vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Expansion genmodifizierter Zellen in einer X-CGD-Gentherapiestudie

Im Rahmen einer klinischen Phase I/II Gentherapiestudie wurden im Jahr 2004 zwei X-CGD-Patienten erstmals erfolgreich behandelt [59]. In der Krankengeschichte beider Patienten waren zuvor zahlreiche schwerwiegende Abszesse und Infektionen u.a. in Leber und Lunge aufgetreten, welche nach Behandlung mit bisherigen Standardtherapeutika (Antibiotika und Antimycotika) (siehe 1.2.3) [21, 143, 144] zu keiner gesundheitlichen Verbesserung geführt hatten. Bedingt durch die schlechte körperliche Verfassung war eine Stammzelltransplantation von einem passenden und gesunden Spender nicht möglich. Die vergleichsweise starke chemotherapeutische Behandlung vor heterologer Transplantation hätte vorhandenen Infektionsherden eine unkontrollierte Ausbreitung im Körper ermöglicht, da das Immunsystem hierbei nahezu vollständig ausgeschaltet wird. Dementsprechend hatten beide X-CGD-Patienten keine alternativen Therapieoptionen und erfüllten somit die Eintrittsbedingungen für diese klinische Phase I/II Gentherapiestudie. Hierbei wurden CD34⁺ Zellen (Stammzellen) nach G-CSF-Mobilisierung in das periphere Blutgefäßsystem der Patienten durch Aphaese isoliert und aufgereinigt. Im Anschluss daran wurden die Patientenzellen *ex vivo* transduziert. Dies erfolgte mit einem LTR-getriebenen γ -retroviralen Vektor (SF71GP91^{phox}), der für eine intakte cDNA-Kopie des therapeutischen Transgens GP91^{phox} kodierte. Währenddessen wurden beide Patienten mit einer milden Chemotherapie (Busulfan 2 x 4 mg/kg Körpergewicht) auf die anstehende Transplantation vorbereitet (siehe Abb. 1.10). Die hierdurch verursachte nicht-myeloische Ablation förderte die Einnistung genmodifizierter Zellen in das Knochenmark der Patienten nach Transplantation. Schon 50 Tage nach Therapiebeginn wurde der erste Erfolg dieser Gentherapiestudie sichtbar, da etwa 10 - 20 % der Patientenzellen (Granulozyten) mit dem Transgen GP91^{phox} transduziert waren (siehe Abb. 1.11) und die Infektionsherde in der Lunge und Leber nahezu vollständig aufgelöst werden konnten [59].

Nach Transplantation genmodifizierter Zellen wurden diese molekularbiologisch überwacht. An regelmäßigen Zeitpunkten wurden den Patienten Blutzellen entnommen und untersucht. Mittels qPCR gegen die provirale DNA konnte eine Zunahme des Anteils transduzierter Granulozyten in beiden Patienten nachgewiesen werden (Abb. 1.11, von der Eufets GmbH durchgeführt). Etwa 200 bis 300 Tage nach Transplantation kam es zu einer Zunahme auf etwa 40-60% bei beiden Patienten. Diese Expansion konnte mittels

RT-PCR auf die Aktivierung von drei proliferationsfördernden Genloci (*Setbp1*, *Prdm16* und *Mds1-Evi1*) zurückgeführt werden. Die transkriptionelle Aktivierung hatte zu einem Selektionsvorteil dieser transduzierten Zellen geführt. Entsprechend konnte mit LAM-PCR gezeigt werden, dass der Anteil an Zellen mit Insertionen in diesen drei Genen, mit der Expansion genmodifizierter Granulozyten im Verlauf der Gentherapie korrelierte [59].

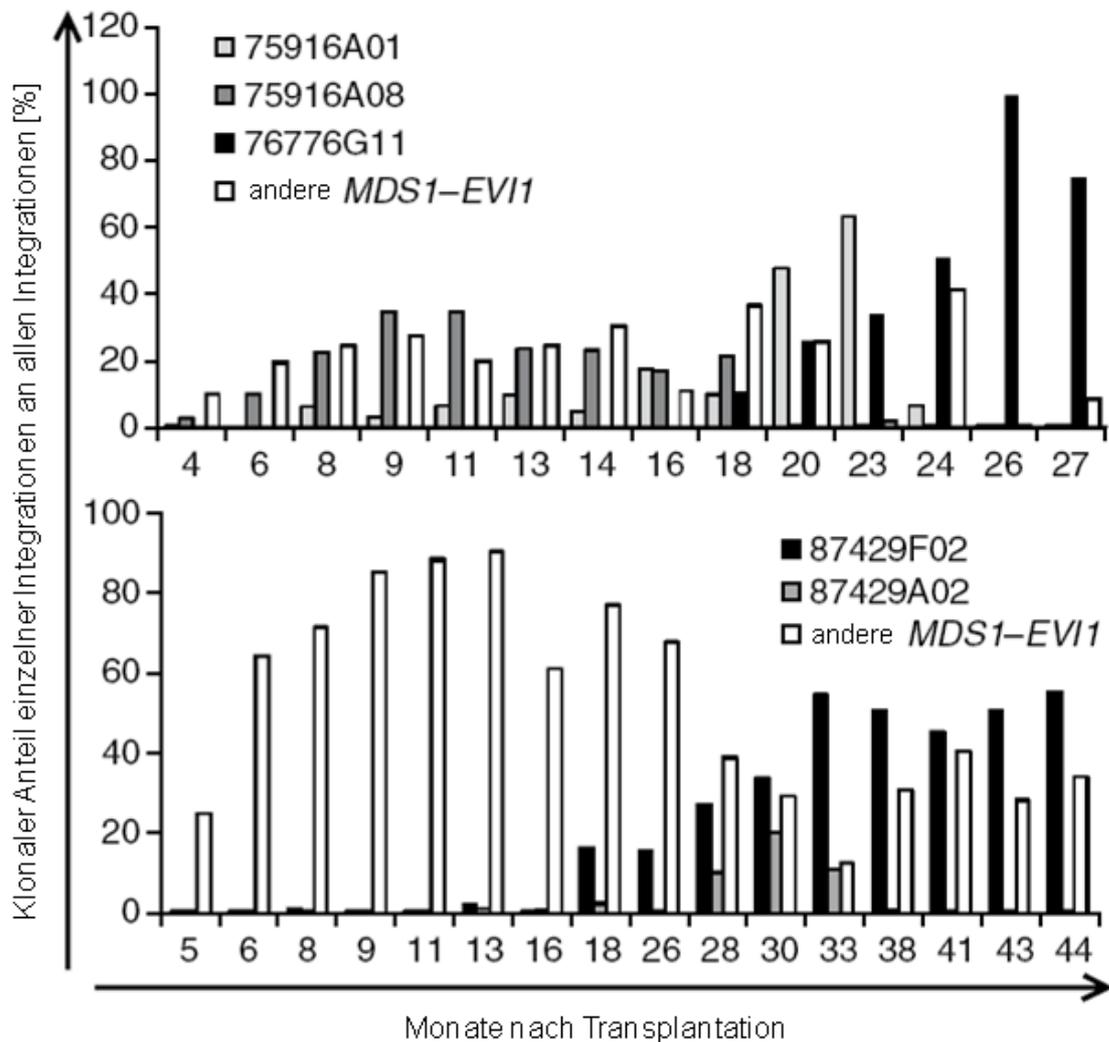


Abb. 3.1 Klonaler Anteil einzelner proviraler Integrationen an allen proviralen Integrationen. Tracking dominanter Insertionen in peripheren Blutproben über die Zeit von Patient 1 (oben) und Patient 2 (unten). Die Frequenz einzelner Klone wurde durch LAM-PCR-Integrationsanalysen mit Pyrosequenzierung quantifiziert (Manfred Schmidt, Christof v. Kalle). Bei Patient 1 dominierte Klon A08 (*Prkra*) mit anderen MDS1-Integrationen bis Monat 18 die Hämatopoese und wurde dann von Klon A01 (*Mds1*) und G11 (*Mds1*) abgelöst. Klon G11 setzte sich bis Monat 27 durch. In Patient 2 wurde die Hämatopoese etwa bis Monat 28 von verschiedenen MDS1-Integrationen dominiert. Hier setzten sich letztlich Klon F02 (*Mds1*) und Klon A02 (*Mds1*) bis Monat 44 durch. (modifiziert von [132]).

Durch Pyrosequenzierung der LAM-PCR-Analysen konnte zudem der klonale Anteil einzelner proviraler Integrationen an allen detektierbaren proviralen Integrationen quantitativ erfasst werden (Manfred Schmidt, Christof v. Kalle). Hier zeigte sich, dass die Hämatopoese bei Patient 1 bis Monat 18 nach Transplantation von Klon A08 (*Prkra*) zusammen mit anderen *Mds1*-Integrationen dominiert wurde. Ab Monat 20 wurden diese Klone von Klon A01 (*Mds1*) und Klon G11 (*Mds1*) verdrängt. Letztlich setzte sich Klon G11 bis Monat 27 nach Transplantation durch und machte einen Anteil von 80 - 100 % aller nachweisbaren Integrationen aus. Bei Patient 2 wurde die Hämatopoese von verschiedenen *Mds1*-Integrationen bis Monat 28 dominiert. Ab Monat 30 wurde der Klon F02 (*Mds1*) dominant und setzte sich bis Monat 44 nach Therapiebeginn durch (siehe Abb. 3.1).

Diese Fluktuation der klonalen Frequenz einzelner Insertionen spiegelte die Fitness einzelner Klone wieder. Diese Beobachtung zeigte deutlich, dass der *Mds1-Evi1*-Genlokus eine wichtige Rolle für die Proliferation transduzierter Zellen spielte. Das unterschiedliche Maß proliferationsfördernder Eigenschaften war vermutlich durch verschieden starke insertionelle Aktivierung des *Mds1-Evi1*-Genlokus abhängig von der Position in diesem Gen hervorgerufen. Zusätzlich waren sekundäre Ereignisse für die gesteigerte Fitness (Durchsetzungsvermögen) von Klon G11 und F02 sehr wahrscheinlich.

3.1.1 Expressionsanalysen am *Mds1-Evi1*-Genlokus

Durch Integrationsanalysen (LAM-PCR) konnten provirale Insertionen im Genom lokalisiert werden [59]. Eine Übersicht der Insertionen am predominantesten CIS-Genlokus (*Mds1-Evi1*) ist in Abb. 3.2 schematisch dargestellt. Auffällig ähnliche Insertionscluster wurden für beide Patienten gefunden. Unabhängig von der Orientierung waren die Proviren in den gleichen Intron-Bereichen des *Mds1-Evi1*-Genlokus integriert. Die Untersuchung auf insertionelle Aktivierung endogener Transkripte erfolgte durch RT-PCR mit spezifischen Primern gegen EVI1 (Exon 1B und Exon 4) oder dem Fusionstranskript MDS1-EVI1 (*Mds1* Exon 2 und *Evi1* Exon 2). Ebenso wurde geprüft, ob Fusionstranskripte der proviralen LTR mit dem 2. Exon von EVI1 nachzuweisen waren, ähnlich wie es für MSCV-Vektoren an dem *Prdm16*-Genlokus in Mausversuchen beschrieben wurde [109].

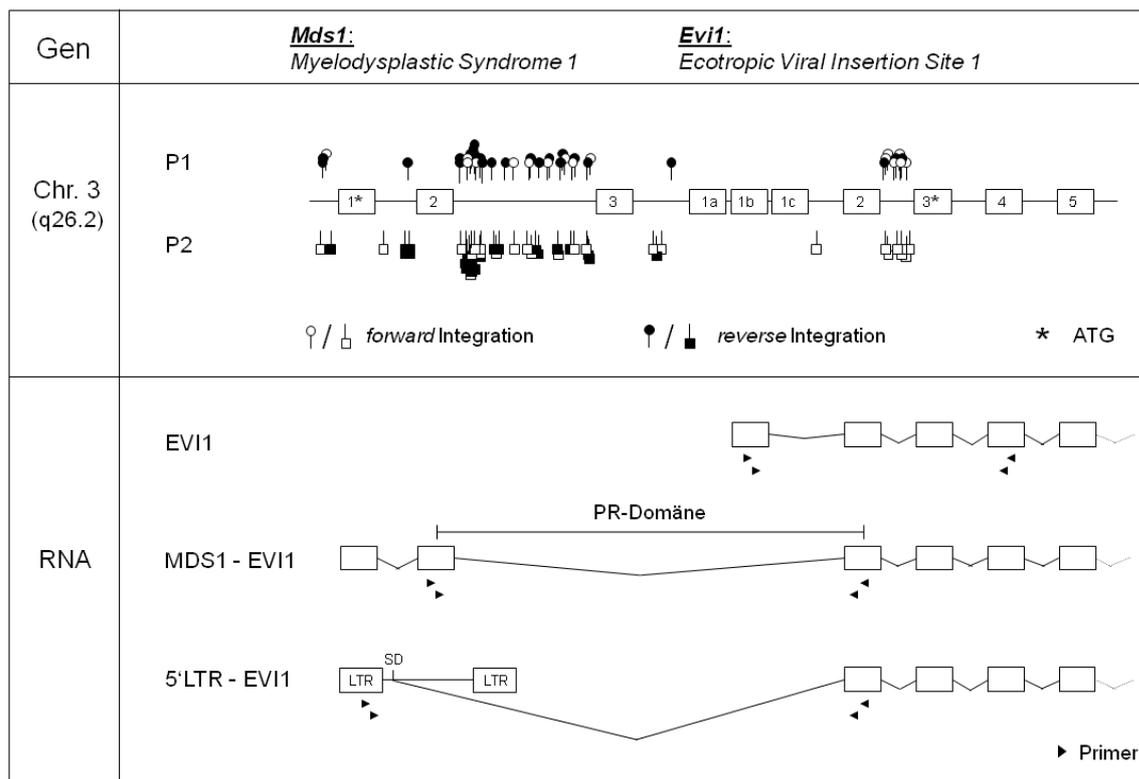


Abb. 3.2 Lokalisation proviraler Integrationen und Nachweis von Transkripten am *Mds1-Evi1*-Genloкус nach Getherapie. Untersuchung transkriptioneller Aktivierung durch Insertionsmutagenese mit RT-PCR gegen angegebene Transkripte am *Mds1-Evi1*-Genloкус (Primer: Pfeile). Insertionen in diesen Genen wurden mit LAM-PCR (Ott et al., Nat Med 2006) identifiziert und wie angegeben lokalisiert. (LTR: *long terminal repeat*; SD: Spleißdonor; PR-Domäne: positive Regulator Domäne)

3.1.1.1 Aktivierung des *Mds1-Evi1*-Genloкус in Patientenzellen

Die Eigenschaft von Retroviren stabil im Genom einer Wirtszelle integrieren zu können, ist *per se* mit einer Veränderung am Integrationsloкус verbunden. Das Phänomen der Insertionsmutagenese ist vor allem Folge von Promotor- und Enhancer-Effekten auf die endogene Genexpression und von der Vektordosis abhängig [145-148]. Da eine Anreicherung von Blutzellen der Patienten mit proviralen Insertionen am *Mds1-Evi1*-Genloкус nachweisbar war, wurden gezielte Untersuchungen der Genexpression an diesem Genloкус vorgenommen. Die Überexpression von EVI1- und MDS1-EVI1-Transkripten wurde bei Patienten mit myeloischer Leukämie bereits beschrieben und zumeist durch sogenannte Umlagerung des 3q26 Genloкус hervorgerufen [130]. Auch konnten Leukämien in Mäusen mit einzelnen Insertionen an diesem Genloкус charakterisiert werden [149].

In verschiedenen myeloischen Zellpopulationen von P1 konnte eine deutliche Hochregulierung der RNA-Expression von EVI1 sowie von MDS1-EVI1-Fusionstranskripten im Verlaufe der Therapie gezeigt werden. Vergleichbar mit der wildtyp-Situation, waren diese Transkripte bis an Tag 157 nach Gentherapie nicht nachweisbar. Im weiteren Verlauf konnten sie jedoch von Tag 381 bis Tag 820 durchgehend detektiert werden (Abb. 3.3 A). Diese Überexpression war analog bei P2 ab Tag 343 für MDS1-EVI1 und ab Tag 491 für EVI1 in der Granulozyten-Fraktion durchgehend nachweisbar (Abb. 3.3 B).

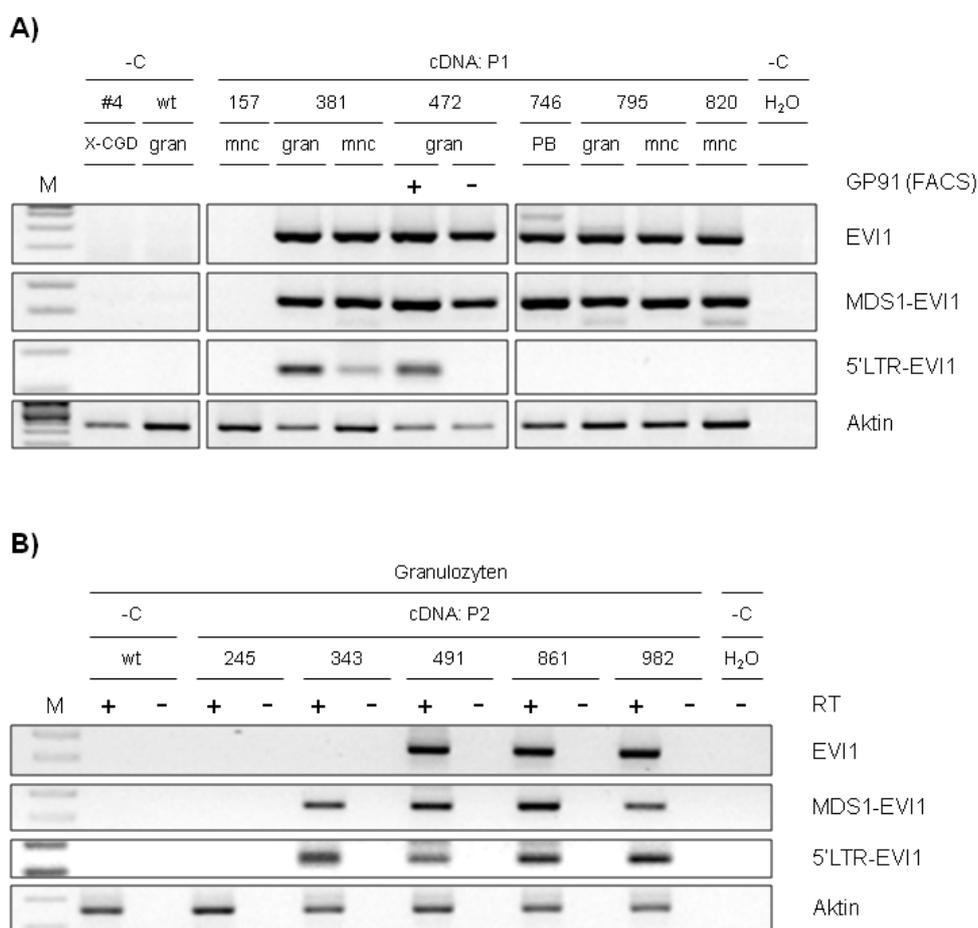


Abb. 3.3 Nachweis transkriptioneller Aktivierung am *Mds1-Evi1*-Genlokus in transduzierten Blutzellen von zwei X-CGD Patienten. RT-PCR-Nachweis von EVI1-Transkripten und von MDS1-EVI1- bzw. 5'LTR-EVI1-Fusionstranskripten in Zellen von P1 (A) und P2 (B) im Verlaufe der Zeit nach Gentherapie. (Zahlen: Tag nach Transplantation; #4: transduzierter PLB X-CGD Klon mit 2 Kopien SF71phox; wt: wildtyp; gran: Granulozyten; mnc: mononukleäre Zellen; PB: peripheres Blut; -C: negativ Kontrolle Wasser bzw. SF71phox transduzierte Zelllinie; RT: Reverse Transkriptase; M: 100bp Ladder)

Die Entstehung sogenannter 5'LTR-EVI1-Fusionstranskripten bei P1 konnte interessanterweise an den Zeitpunkten 381 sowie 472 und bei P2 von Tag 343 bis Tag 982 nach Therapiebeginn gezeigt werden. Zur Aufklärung des Ursprungs dieser Fusions-transkripte, wurden Granulozyten von P1 an Tag 472 auf GP91^{phox}-Proteinexpression mit dem FACS sortiert und anschließend die RNA-Expression untersucht. In der GP91^{phox}-exprimierenden Zellfraktion konnten 5'LTR-EVI1-Fusionstranskripte nachgewiesen werden, in der GP91^{phox}-negativen Fraktion jedoch nicht. Somit konnten diese Fusions-transkripte mit dem aktiv transkribierenden viralen SFFV-Promotor in Verbindung gebracht werden. Aus diesen Fusionstranskripten entstanden nach der Translation wahrscheinlich EVI1-Proteine, da der Translationsstart im 3. Exon von *Evi1* liegt (Abb. 3.2).

In weiterführenden Untersuchungen wurde überprüft, ob das erste Exon von *Mds1* Bestandteil des MDS1-EVI1-Fusionstranskriptes war. Hierzu wurden für RT-PCR-Analysen die *forward* Primer in das erste Exon von *Mds1* gelegt, die *reverse* Primer im zweiten Exon von *Evi1* beibehalten. Nach Sequenzierung amplifizierter Fragmente, konnte das Vorhandensein des ersten Exons von *Mds1* bestätigt werden (Abb. 3.4). Somit wurden die MDS1-EVI1-Fusionstranskripte in den X-CGD-Patientenzellen sehr wahrscheinlich vom endogenen *Mds1*-Promotor nach Transaktivierung durch den proviralen SFFV-Enhancer initiiert. Die zusätzliche etwas niedriger laufende Bande in der PB Probe von P2 an Tag 820 war durch unspezifische Primerbindung im Genom entstanden und entsprechend zu vernachlässigen.

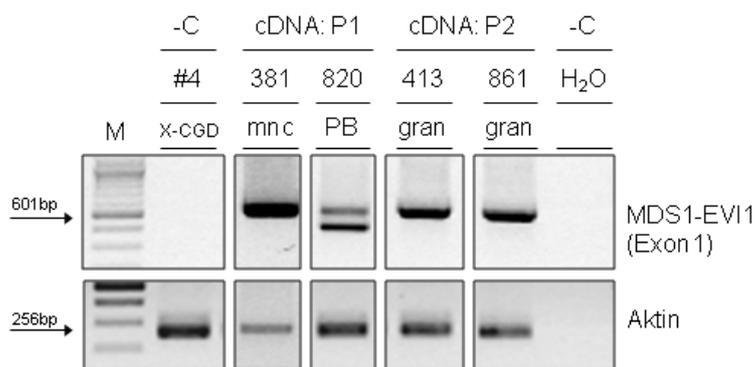


Abb. 3.4 Nachweis des ersten Exons von MDS1 als Bestandteil der MDS1-EVI1-Fusionstranskripte. RT-PCR Analyse mit spezifischen Primer gegen das erste Exon von *Mds1* und das 2 Exon von *Evi1*. (Zahlen oben: Tage nach Transplantation; #4: transduzierter PLB X-CGD Klon mit 2 Kopien SF71^{phox}; wt: wildtyp; gran: Granulozyten; mnc: mononukleäre Zellen; PB: peripheres Blut; -C: negativ Kontrolle; bp Basenpaare; M: 100bp Ladder)

Die Fragestellung nach dem Zusammenhang zwischen spezifischem Integrationsort und resultierendem Expressionsprofil hat genauere Untersuchungen auf klonaler Ebene notwendig gemacht. Hierzu wurden hämatopoetische Kolonien von P2 an Tag 982 je zur Hälfte für DNA-Untersuchungen des proviralen Insertionsortes und zur anderen Hälfte für RNA-Expressionsanalysen eingesetzt. Anhand lokusspezifischer PCRs (von Carolin Preiss durchgeführt) gegen dominante Klone von P2 (siehe Abb. 3.1) konnten spezifische provirale Integrationen einzelnen Kolonien zugeordnet werden. Kolonien des dominanten Klons F02 (*Mds1*) ebenso wie des Klons A02/B06 mit Insertionen in *Mds1* und *Glis1*, zeigten eine Überexpression der EVI1- sowie der MDS1-EVI1-Transkripte vergleichbar mit der Gesamtpopulation der Granulozyten an Tag 982 (Abb. 3.5). Die Expression des therapeutischen Transgens GP91^{phox}, sowie 5'LTR-EVI1 Fusions-transkripte waren in Kolonien dieser Klone nicht nachzuweisen. Dem zur Folge konnte trotz fehlender Transgenexpression eine Transaktivierung des *Mds1-Evi1*-Genlokus bei den Klonen F02, A02 und B06 gezeigt werden.

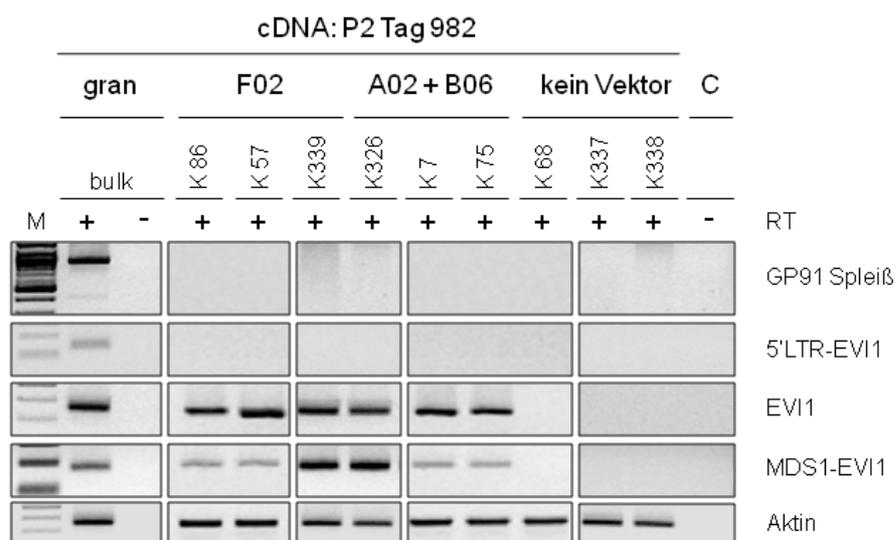


Abb. 3.5 Transkriptionelle Aktivierung des *Mds1-Evi1*-Genlokus in dominanten Klonen von P2. Knochenmark von P2 wurde an Tag 982 entnommen und Ficoll gereinigte mononukleäre Zellen auf Methylzellulose ausplattiert. Hämatopoetische Kolonien wurden nach 14 Tagen einzeln gepickt und je zur Hälfte für DNA-Analysen des Integrationsort mit lokusspezifischer-PCR und zur anderen Hälfte für RNA-Expressionsanalysen mittels RT-PCR gegen angegebene Transkripte eingesetzt. Gezeigt ist die insertionelle Aktivierung von EVI1- sowie von MDS1-EVI1-Transkripten dominanter Klone von P2, wohingegen die GP91^{phox}-Transgenexpression sowie die 5'LTR-EVI1-Fusionstranskripte nicht nachweisbar waren. Übersicht eingesetzter Primer für den Nachweis von GP91^{phox}-Transkripten mit Unterscheidung der Spleißvarianten siehe Abb. 3.8. (gran bulk: Gesamtpopulation der Granulozyten; K: Kolonie; F02: dominanter Klon 87429F02 (*Mds1*); A02 + B06: dominanter Klon mit zwei Integrationen 87429A02 (*Mds1*) und 81676B06 (*Glis1*); Kein Vektor: nicht transduzierte Kolonien, C: H₂O; RT: Reverse Transkriptase)

3.1.2 Expressionsanalysen am *Prdm16*-Genlocus

Mittels LAM-PCR-Analysen konnte *Prdm16* (Homolog von MDS1-EVI1) als weiterer CIS-Genlocus in der X-CGD-Gentherapiestudie identifiziert werden. Die insertionelle Aktivierung der RNA-Transkripte von PRDM16 war bereits beschrieben [59]. Da die Insertionen im ersten Intron vorwiegend in einem Cluster von 3kb in *forward* Orientierung in beiden X-CGD-Patienten nachzuweisen waren, konnte ein funktionaler Zusammenhang mit der klonalen Selektion vermuten werden (Abb. 3.6).

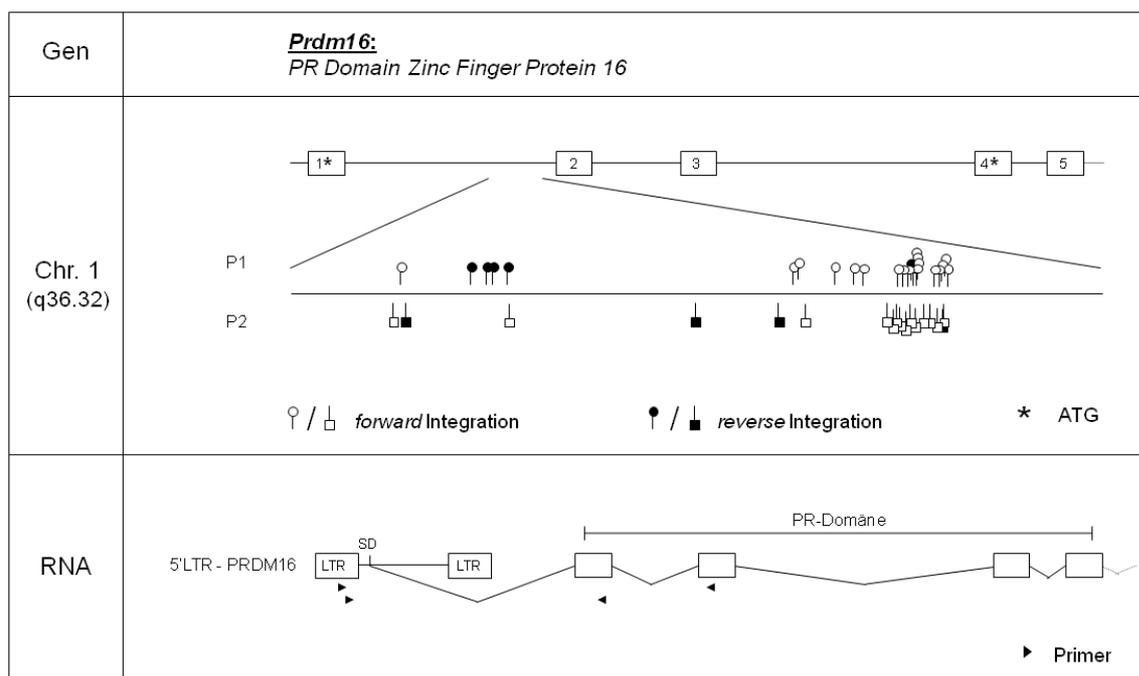


Abb. 3.6 Nachweis von Transkripten am *Prdm16*-Genlocus nach Gentherapie. Untersuchung transkriptioneller Aktivierung durch Insertionsmutagenese mit RT-PCR auf 5'LTR-PRDM16-Fusions-transkripte am *Prdm16*-Genlocus. Provirale Insertionen wurden mit LAM-PCR identifiziert und wie angegeben lokalisiert [59]. (LTR: *long terminal repeat*; SD: Spleißdonor; PR-Domäne: positive Regulator Domäne)

Die Entstehung von Fusionstranskripten am *Prdm16*-Genlocus wurde mit RT-PCR-Untersuchungen analog zu dem 5'LTR-EVI1-Fusionstranskript (Abb. 3.2 und Abb. 3.3) untersucht. Aus Maus-Transplantationsversuchen mit klonaler Dominanz waren solche Fusionstranskripte bereits bekannt [109]. Hierzu wurde RNA aus Granulozyten von P2 an den Tagen 413 und 861 nach Gentherapiebehandlung isoliert. Der Nachweis dieser

5'LTR-PRDM16-Fusionstranskripte ist in Abb. 3.7 gezeigt. Es ist wahrscheinlich, dass diese von der proviralen SFFV-LTR initiiert wurden und zu der verkürzten PRDM16-Proteinvariante ohne PR-Domäne führten, da *Prdm16* über ein alternatives ATG in Exon 4 verfügt (Abb. 3.6). Auf Proteinebene ist dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht worden.

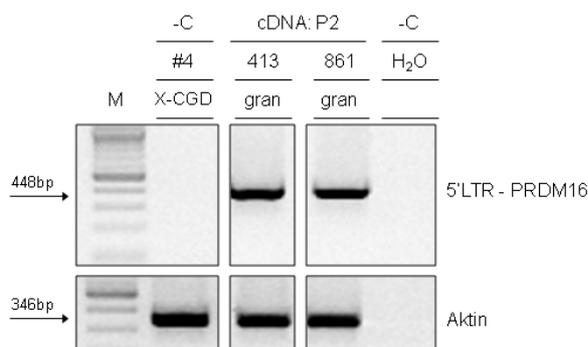


Abb. 3.7 Nachweis von 5'LTR-PRDM16-Fusionstranskripten mittels RT-PCR in Granulozyten von P2. (#4: transduzierter PLB X-CGD-Klon mit 2 Kopien SF71phox; Zahlen oben: Tage nach Transplantation; gran: Granulozyten; -C: negativ Kontrolle Wasser bzw. SF71phox transduzierte Zelllinie)

3.2 Rekonstitution der Superoxidproduktion in X-CGD-Patientenzellen

Im Rahmen des X-CGD-Patientenmonitoring nach Genterapie wurde die Proteinfunktion des eingebrachten Transgens mittels DHR-Assays an Granulozyten verfolgt. Dieser in der Klinik weit verbreitete Nachweis ist ein Maß für die Entstehung reaktiver Sauerstoff-Spezien (ROS) beim respiratorischen *Burst* in Granulozyten [150, 151]. Er wurde als Maß für die funktionelle Korrektur des Erbdefektes beider behandelter X-CGD-Patienten nach Genterapie eingesetzt. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass schon eine relativ geringe Korrektur der NADPH-Oxidase-Aktivität von etwa 10% in Monozyten zu einem klinischen Vorteil führen kann [28]. Ebenso konnte dies bei weiblichen, haploiden X-CGD-Überträgern gezeigt werden, da sie ein symptomfreies Leben mit dieser Erbkrankheit führen [29].

3.2.1 Monitoring der Proteinfunktion von GP91^{phox}

Zu Beginn der Therapie gab es eine gute Korrelation zwischen dem Anteil an DHR-positiven Granulozyten und dem Anteil transduzierter Granulozyten bei beiden

Patienten. Auch während der Expansionsphase transduzierter Zellen war die Proteinfunktion bei P1 bis etwa Tag 300 proportional zur Genmarkierung. Trotz stabiler Genmarkierung kam es jedoch zu einer starken Abnahme der Superoxidproduktion bei P1 etwa ab dem Tag 300 und bei P2 ab dem Tag 200 nach Therapiebeginn. Von initial 20 % bzw. 30 % DHR-positiver Zellen fiel das Level auf etwa 2 % bzw. 10 % in den Patienten ab (Abb. 1.11). Ähnliche Phänomene wurden bisher für keine andere humane Gentherapiestudie beschrieben und waren somit Ausgangspunkt für Untersuchungen der Transgenexpression in Patientenzellen.

3.2.2 Semiquantitative Analyse der mRNA-Expression von GP91^{phox}

Die Transgenexpression transduzierter Patientenzellen wurde von dem proviralen SFFV-Enhancer und -Promotor in der LTR gesteuert. Bestandteil des LTR-getriebenen γ -retroviralen Vektors ist ein Spleiß-Donor- (SD) und Spleiß-Akzeptor-System (SA) in der Leadersequenz. Für den Nachweis transgener Transkripte wurden *forward* Primer in den Leaderbereich und *reverse* Primer in die GP91^{phox}-Sequenz gesetzt. Hierdurch konnten endogene GP91^{phox}-Transkripte der Patientenzellen bei dem RT-PCR-Nachweis ausgeschlossen werden. Durch Variation der *forward* Primer vor oder hinter das SD/SA-System konnten verschiedene Spleißvarianten unterschieden werden (Abb. 3.8). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass in der Regel nur korrekt gespleißte GP91^{phox}-mRNA zu einem funktionellen GP91^{phox}-Protein führt. Alternative Translationsstarts am N-Terminus, ebenso wie Mutationen im kodierenden Teil des Transkriptes führen zum Abbau der Translationsprodukte in den Zellen [152].

Der semiquantitative Nachweis transgener GP91^{phox}-Transkripte bei P1 ist auf mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut an verschiedenen Zeitpunkten nach Gentherapie erfolgt. In diesem Ansatz wurde nicht zwischen verschiedenen Spleißvarianten unterschieden. Insgesamt war eine deutliche Abnahme transgener GP91^{phox}-Transkripte in Relation zur Ladekontrolle (Aktin) über die Zeit messbar (Abb. 3.9). Ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der GP91^{phox}-Proteinaktivität und der Abnahme der Transkriptmengen war sehr wahrscheinlich. Die negativen Kontrollen (ohne RT) haben kein Signal gezeigt, womit DNA-Verunreinigungen ausgeschlossen

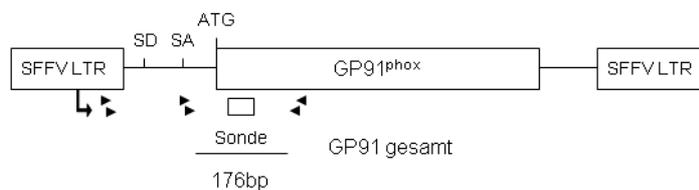
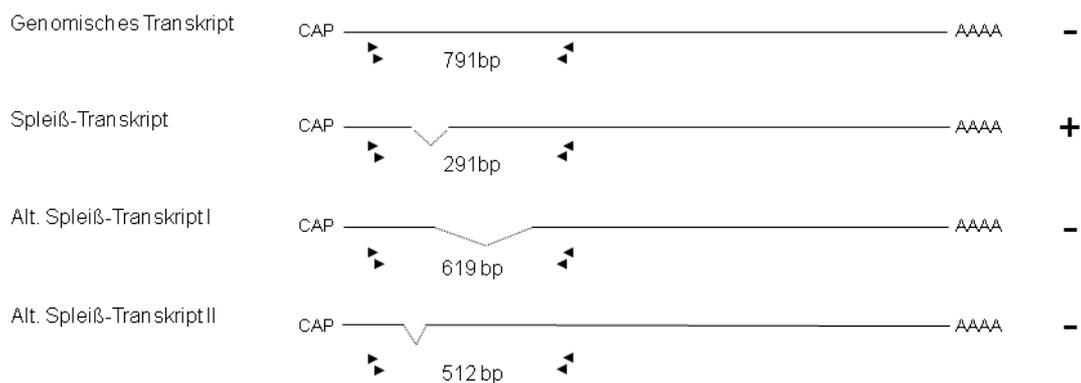
DNA: SF71^{phox} ProvirusRNA: GP91^{phox} TranskripteProtein: GP91^{phox}

Abb. 3.8 Übersicht proviraler GP91^{phox}-Transkripte. Das SF71^{phox}-Provirus initiiert die Transgenexpression im SFFV-Promotor der LTR (oben). GP91^{phox}-Transkripte sind mit Größe der RT-PCR-Fragmente angegeben (unten). Für nachfolgende quantitative RT-PCR-Analysen der gesamten GP91^{phox}-Transkripte wurde die angegebene Sonde verwendet. Nur das Spleiß-Transkript führt auch zu einem funktionellen Protein, die alternativen Spleiß-Transkripte I und II jedoch nicht (Abb. 3.11). SFFV: *Spleen Focus Forming Virus*; LTR: *long terminal repeat*; SD: Spleiß Donor; SA: Spleiß Akzeptor; alt: alternatives)

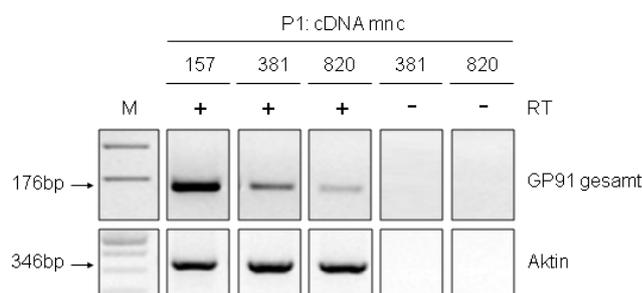


Abb. 3.9 Semiquantitative GP91^{phox}-RNA-Expressionsanalyse bei P1. RNA wurde aus gereinigten mono-nukleären Zellen von P2 an verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn isoliert und RT-PCR auf die cDNA gegen die gesamt GP91^{phox}-Transkripte (Abb. 3.8) durchgeführt. Eine Abnahme der GP91^{phox}-Transkripte war von Tag 157 zu Tag 820 zu beobachten. (Zahlen oben: Tage nach Transplantation; M: 100bp Ladder; RT: Reverse Transkriptase)

werden konnten. Zum Zeitpunkt 157 fehlt diese Kontrolle wegen mangelndem Ausgangsmaterial. Da alle Proben parallel bearbeitet wurden, war jedoch keine DNA-Kontamination zu erwarten.

Analysen der Transgenexpression wurden bei P2 auf gereinigte Granulozyten aus dem peripheren Blut durchgeführt. Hierbei wurde analog zu den Ergebnissen bei P1 eine Abnahme der gesamt GP91^{phox}-RNA-Transkripte im Therapieverlauf gemessen (vgl. Abb. 3.8). Darüber hinaus wurden bei P2 auch verschiedene Spleißvarianten unterschieden, die genauso wie die gesamt GP91^{phox}-Transkripte über die Zeit deutlich abnahmen (Abb. 3.10). Die alternative Spleiß-Variante I (Fragment 619bp) ergab nach Sequenzanalyse, dass der SA hinter dem ATG von GP91^{phox} lag und somit nicht zu funktionalem Protein führen konnte.

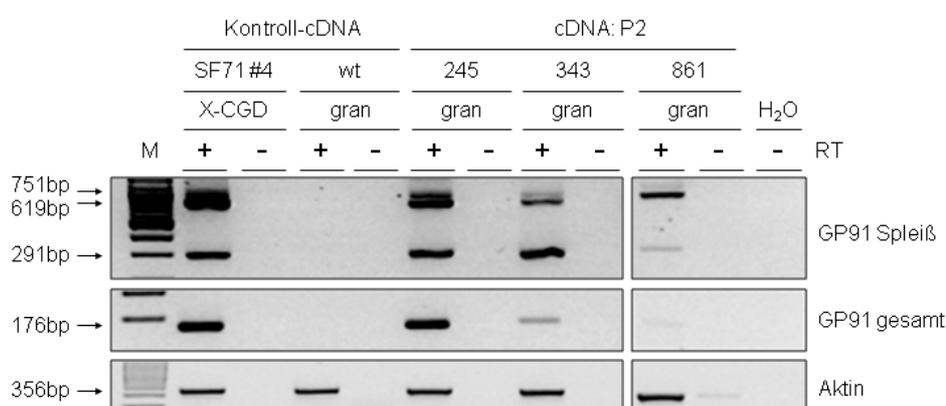


Abb. 3.10 Semiquantitative GP91^{phox}-RNA-Expressionsanalyse bei P2. RT-PCR-Analyse auf gereinigte Granulozyten von P2 an verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn bzw. von wildtyp Kontroll-Zellen oder einem Zelllinien-Klon #4 mit zwei Kopien SF71^{phox}. Nachgewiesen wurden gesamt GP91^{phox}-Transkripte bzw. Spleiß-Transkripte (vgl. Abb. 3.8). Eine Abnahme der GP91^{phox}-Transkripte sowie der Spleiß-Transkripte war von Tag 245 zu Tag 861 zu beobachten. (Zahlen oben: Tage nach Trans-plantation; M: 100bp Ladder; wt: wildtyp; RT: Reverse Transkriptase)

3.2.3 Qualitative Analyse der mRNA-Expression von GP91^{phox}

Zu Aufklärung des Beitrags verschiedener Spleißvarianten der GP91^{phox}-RNA-Transkripte zu der funktionalen Proteinexpression wurden Granulozyten von P1 von Tag 472 mit dem FACS sortiert. RT-PCR-Analysen der GP91^{phox}-positiven Fraktion ergaben die erwarteten Fragmente, vergleichbar mit dem transduzierten Zelllinienklon #4 mit zwei SF71^{phox}-Kopien. Entsprechend konnten das genomische Transkript (751bp), das korrekt gespleißte Transkript (291bp) und ein alternatives Spleiß-Transkript I (619bp)

nachgewiesen werden. In der GP91^{phox}-Protein negativen Granulozyten-Fraktion war das korrekt gespleißte GP91^{phox}-Transkript (291bp Fragment) nicht vorhanden. Neben dem genomischen Transkript waren jedoch zwei zusätzliche Fragmente aufgetreten (Abb. 3.11). Die Sequenzierung der stärkeren Bande (mit * markiert) ergab ein weiteres alternatives Spleiß-Transkript II, welches nicht zum funktionellen Protein translatiert werden konnte. Ursachen auf transkriptineller Ebene konnten nach Sequenzierung jedoch nicht abschließend geklärt werden. Die zweite zusätzliche, etwas schwächere Bande konnte nicht kloniert werden.

Aus diesen Untersuchungen ging deutlich hervor, dass nur diejenigen GP91^{phox}-Transkripte zur funktionellen Proteintranslation führen, die über das vorgesehene virale SD/SA-System gespleißt wurden (siehe 291bp Fragment, Abb. 3.8). Alle anderen nachgewiesenen Transkript-Varianten führten jedoch nicht zu einem im FACS nachweisbaren GP91^{phox}-Protein. Diese Beobachtung war konsistent mit der beschriebenen Instabilität der mRNA-Transkripte, hervorgerufen durch Mutationen in der Sequenz von GP91^{phox} (*Cybb*) [152].

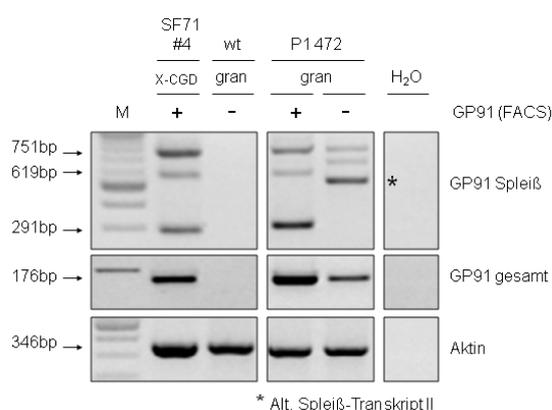


Abb. 3.11 Qualitative GP91^{phox}-Expressionsanalyse bei P1. RT-PCR-Analyse auf die gesamt GP91^{phox}-Transkripte und die Spleiß-Transkripte (vgl. Abb. 3.8) FACS sortierter (GP91^{phox}) Granulozyten von P1 an Tag 472 nach Therapiebeginn. Zur Kontrolle wurden wildtyp-Zellen bzw. ein Zelllinien-Klon #4 mit zwei Kopien SF71^{phox} parallel analysiert. (Zahlen oben: Tage nach Transplantation; M: 100bp Ladder; wt: wildtyp; RT: Reverse Transkriptase)

3.2.4 Quantitative Analyse der mRNA-Expression von GP91^{phox}

Nachdem in semiquantitativen RT-PCR-Untersuchungen (vgl. 3.2.2), eine Reduktion der GP91^{phox}-Transgenexpression über die Zeit gemessen wurde, war im Weiteren eine genaue Quantifizierung der Transkriptmengen erforderlich. Hierzu wurde mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) die Gesamtheit der GP91^{phox}-Transkripte in Relation zu der Expression des Haushaltsgens GAPDH ausgewählt. Mit Hilfe der sogenannten relativen Quantifizierung ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) kann eine Veränderung einer Messgröße wie z.B. der Transgenexpression an unterschiedlichen Zeitpunkten in Relation zueinander gemessen und berechnet werden. Normalisiert wird hierbei durch Haushaltsgene wie z.B. GAPDH oder Aktin [153, 154]. Zur Detektion spezifischer Signale wurde eine FAM-markierte Sonde (Abb. 3.8) eingesetzt. Über Verdünnungsreihen wurde sichergestellt, dass die PCR-Effizienz von GP91^{phox} und GAPDH vergleichbar waren und die Signale jeweils im dynamischen Bereich der qRT-PCR gemessen wurden.

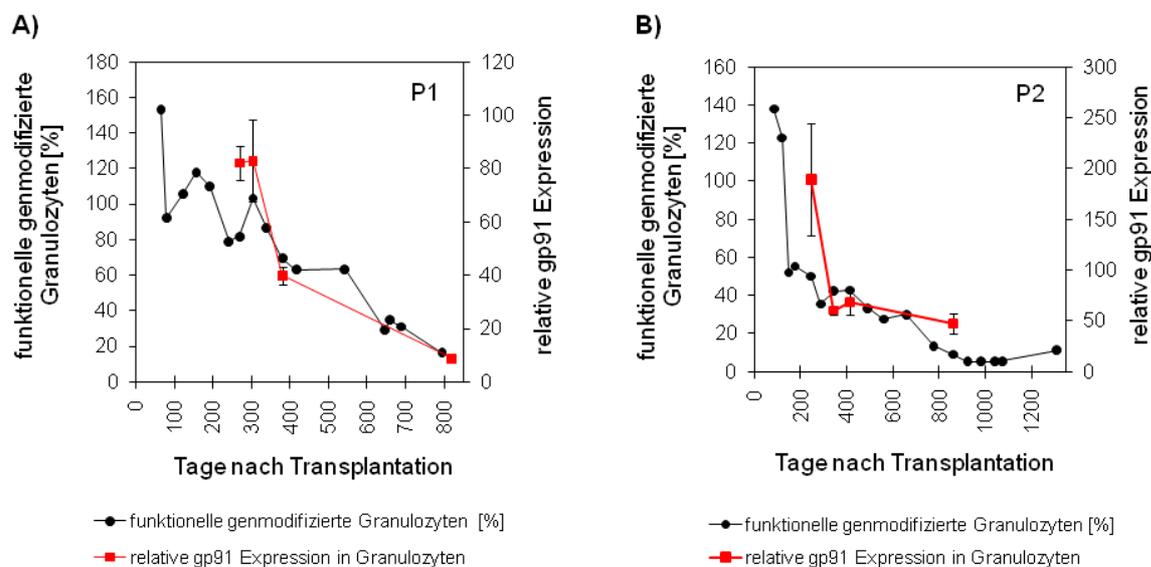


Abb. 3.12 Quantitative GP91^{phox}-Expressionsanalysen. RNA wurde aus Granulozyten von P1 (A) und P2 (B) an verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn bzw. von wildtyp-Zellen isoliert und RT-PCR zum Nachweis der gesamt GP91^{phox}-Transkripte (vgl. Abb. 3.9) durchgeführt. Die relativen GP91^{phox}-Transkriptmengen wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode im Vergleich zu wildtyp-Zellen berechnet (rote Linie). Der Anteil funktionell-genmodifizierter Granulozyten ist jeweils mit einer schwarzen Linie dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus zwei unabhängigen Versuchen berechnet.

Nach erfolgreicher Etablierung der GP91^{phox} qRT-PCR konnte in Granulozyten beider Patienten eine deutliche Reduktion der Transgenexpression über die Zeit nachgewiesen werden. Bei P1 konnte eine 9,3-fache Reduktion (vgl. Tag 269 zu Tag 820) und bei P2 eine 4-fache Reduktion (vgl. Tag 245 zu Tag 861) der GP91^{phox}-Expression gezeigt werden. Die Abnahme des prozentualen Anteils funktioneller Granulozyten korrelierte mit der Abnahme der Transgenexpression bei beiden Patienten recht gut (Abb. 3.12). Der quantitative Nachweis der GP91^{phox}-RNA-Transkripte hat somit die Ergebnisse der semiquantitativen Analysen bestätigt. Der Verlust der Superoxidproduktion in den Patientenzellen korrelierte mit dem Verlust der Transgenexpression und deutete somit auf eine Abschaltung der proviralen Promotoraktivität hin.

3.3 Analyse der SFFV Promotor-CpG-Methylierung

Die Abnahme der Transgenexpression in den Patientenproben über die Zeit hat eine epigenetische Abschaltung des proviralen Promotors vermuten lassen, ähnlich wie es in Mausmodellen und embryonalen Stammzelllinien beschrieben wurde [155, 156]. Eine *in silico* Untersuchung mit Hilfe der Methprimer-Software [137] auf CpG-Inseln ergab, dass es zwei dieser CpG-reichen Regionen in der proviralen Sequenz gab. Zum einen war eine CpG-Insel im SFFV-Promotor vorhanden und zum anderen gab es noch eine weitere im Leaderbereich des Provirus (siehe blaue Markierungen in Abb. 3.13). Die Analyse des SFFV-Enhancers ergab 6 einzelne CpG-Dinukleotide, die sich innerhalb eines CpG-Clusters befanden, jedoch keine CpG-Insel bildete. Für den Nachweis der CpG-Methylierung mittels Bisulfit-Sequenzierung wurden sogenannte bisulfit-spezifische Primer gegen die SFFV-LTR ausgesucht, welche sowohl in der 5'LTR als auch in der 3'LTR des SFFV-Promotor- und Enhancerbereichs binden. Für den Nachweis der CpG-Methylierung wurde DNA aus Patientenproben von verschiedenen Zeitpunkten nach Gentherapie DNA isoliert und anschließend mit dem Bisulfit-Reagenz konvertiert. Hierbei wurden nicht methylierte Cytosine in Uracile umgewandelt, wohingegen diese Reaktion bei methylierten Cytosinen ausblieb (siehe Abb. 2.4). Nach PCR-Amplifikation, Subklonierung der Fragmente in den TOPO-Vektor und Sequenzierung einzelner Bakterienkolonien, war eine Unterscheidung zwischen Cytosinen und Thyminen möglich. [157]. Somit konnte anhand der Sequenzen bestimmt werden, ob die 6 CpGs im Enhancer und die 18 CpGs im Promotor an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapiebeginn methyliert oder nicht methyliert vorlagen.

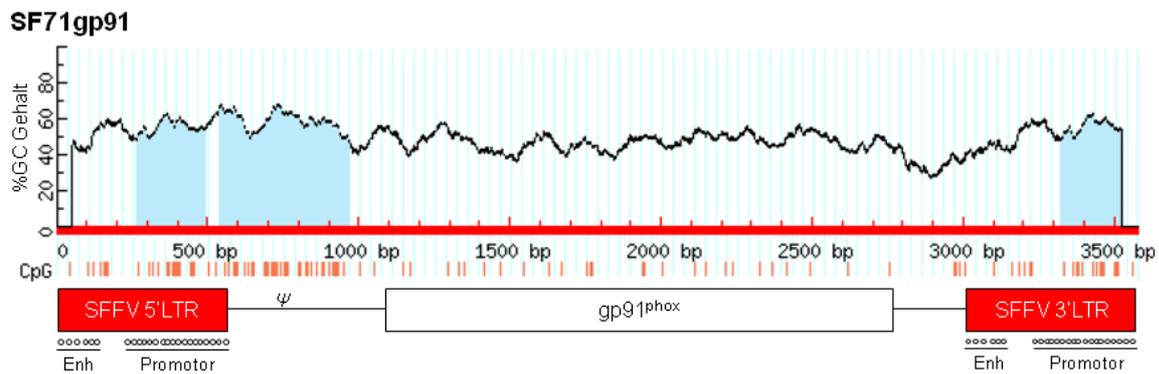


Abb. 3.13 Analyse des SF71^{phox}-Provirus auf CpG-Inseln. Der provirale CpG-Gehalt wurde mit der Methprimer-Software ermittelt [137]. CpG-Inseln sind blau eingefärbt und wurden entsprechend der Definition (GC > 50 %; GC Anteil vorhanden zu erwartet > 0,6; min. 100 bp Fragmentlänge) bestimmt. Kreise unterhalb der LTR-Bereiche geben einzelne CpGs an, welche in nachfolgenden Methylierungsanalysen untersucht wurden. (Enh: Enhancer)

3.3.1 CpG-Methylierung in peripheren Blutzellen von Patient 1 und Patient 2

Untersuchungen des Methylierungszustandes der CpG-Dinukleotide mittels Bisulfit-Sequenzierung in der proviralen LTR ergaben, dass ein Großteil der SFFV-Promotor-CpG-Insel kurz nach Beginn der Gentherapie überwiegend nicht methyliert war. Diese Beobachtung korrelierte mit der guten GP91^{phox}-Enzymaktivität in der Anfangszeit der Gentherapiebehandlung (vgl. Abb. 1.11). Allerdings zeigten die Analysen späterer Zeitpunkte, dass der SFFV-Promotor ab Tag 795 bei P1 und ab Tag 560 bei P2 fast vollständig methyliert war. Auffällig war hierbei, dass die CpG-Methylierung vom Transkriptionsstart ausgehend - am Beginn der R-Region in der LTR - konsistent in 3'-Richtung ausgeprägt war. Die Zunahme der Promotormethylierung korrelierte also mit der Abnahme der GP91^{phox}-Transgenexpression über die Zeit in beiden X-CGD-Patienten (vgl. 3.2.4). Dies lieferte den Hinweis auf eine epigenetische Abschaltung der proviralen Expressionskassette in den Patientenzellen. Interessanterweise wurden CpG-Dinukleotide im Enhancer zu keinem Zeitpunkt methyliert vorgefunden. Dieses Phänomen deutete auf einen Selektionsdruck im Enhancerbereich hin, welcher durch Trans-aktivierung benachbarter Gene am Integrationsort, transduzierten Patientenzellen einen Proliferationsvorteil verschaffen konnte.

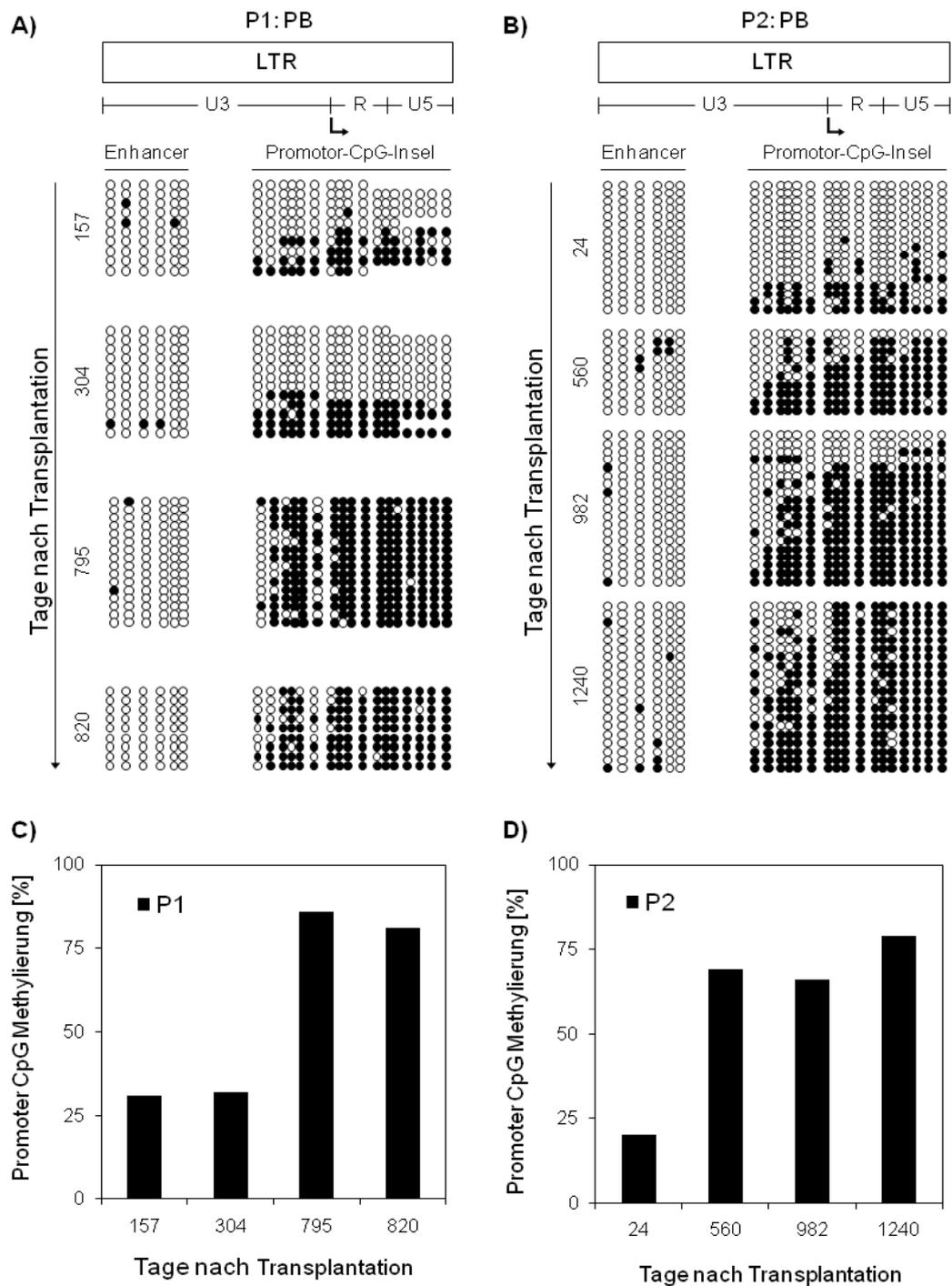


Abb. 3.14 CpG-Methylierungsanalyse des SF71^{phox}-Provirus. An verschiedenen Zeitpunkten nach Gentherapie wurde DNA aus peripheren Blutzellen von zwei X-CGD-Patienten isoliert und mittels Bisulfit-Sequenzierung der Methylierungszustand des viralen SFFV-Promotors und -Enhancers bestimmt. CpG-Dinukleotide sind in Form von Kreisen dargestellt (weiß: nicht methyliert; schwarz: methyliert) und repräsentieren innerhalb einer Reihe jeweils einen Bakterienklon. Die Methylierung ist für P1 in **A)** detailliert gezeigt und in **C)** quantifiziert, für P2 in **B)** detailliert gezeigt und in **D)** quantifiziert. In beiden Patienten konnte eine Zunahme der SFFV-Promotor-Methylierung im Therapieverlauf nachgewiesen werden. Der SFFV-Enhancerbereich wurde niemals methyliert vorgefunden.

3.3.2 CpG-Methylierung in hämatopoetischen Kolonien von Patient 2

Genauere Untersuchungen des Zusammenhanges zwischen der Abnahme der Superoxidproduktion und der Methylierung des SFFV-Promotors haben Analysen auf klonaler Ebene erforderlich gemacht. Hierzu wurden mononukleäre Zellen von P2 an Tag 1171 aus dem Knochenmark aufgereinigt, auf Methylcellulose ausplattiert und 14 Tage später mittels NBT-Assays (Nitrobluetetrazolium) untersucht. Durch Farbumschlag kann mit diesem Versuch die Entstehung von Superoxid (ROS) nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Einzelne hämatopoetische Kolonien wurden anschließend gepickt und isolierte DNA mit Hilfe von PCR auf GP91^{phox}-Signale analysiert. GP91^{phox}-positive Kolonien - also transduzierte Kolonien - wurden daraufhin mittels Bisulfit-Sequenzierung auf CpG-Methylierung untersucht.

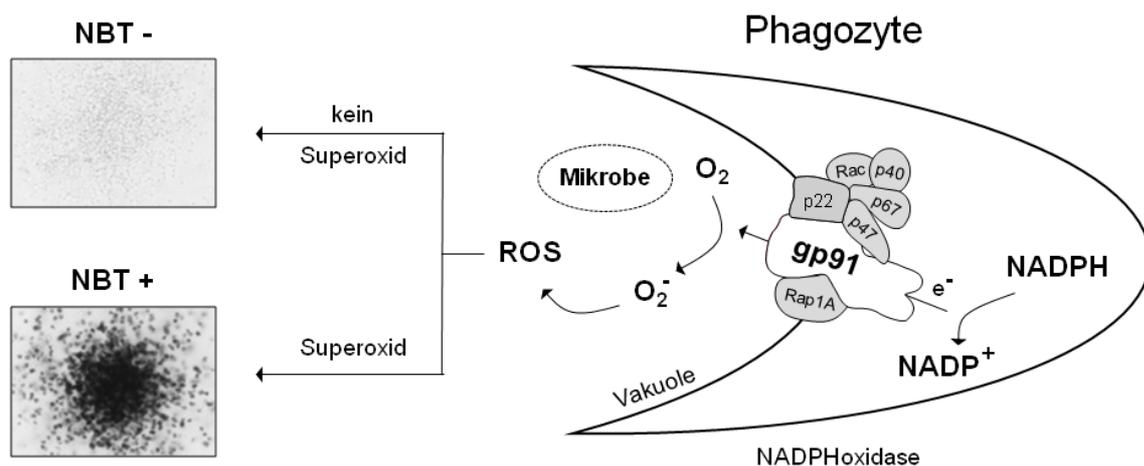


Abb. 3.15 Superoxid Nachweis bei Phagozyten mittels NBT-Färbung. Durch Aktivierung des NADPH-Oxidase Komplexes nach *in vitro* Zugabe von PMA kann Superoxid (ROS) in Granulozyten produziert werden. In Superoxid-positiven Zellen entsteht nach NBT-Zugabe ein blauer Farbumschlag. Auf diese Weise können hämatopoetische Kolonien auf NADPH-Oxidase- bzw. GP91^{phox}-Funktionalität untersucht werden. (ROS: *Reaktive Oxygen Species*; PMA: phorbol 12-myristate 13- acetate; NBT: Nitrobluetetrazolium)

Die Untersuchung der CpG-Methylierung NBT-positiver Patientenkolonien (K11, K13, K16, K17) zeigte keine Methylierung des viralen SFFV-Promotors. Im Gegensatz hierzu waren NBT-negative Kolonien (K2, K4, K9, K19) durchgehend im Promotor hypermethyliert (Abb. 3.16). Die selektive Methylierung des SFFV-Promotors konnte somit auf klonaler Ebene in direkten Zusammenhang mit der Abwesenheit der GP91^{phox}-Enzymaktivität bzw. der Superoxidproduktion gesetzt werden. Ursache für den Verlust

der Transgenexpression, welche zu einer Reduktion der Proteinbiosynthese und somit auch zur Abnahme der Enzymaktivität geführt hatte, war eine epigenetische Abschaltung des proviralen SFFV-Promotors durch CpG-Methylierung im Verlauf der Therapie beider X-CGD-Patienten. Die sehr homogenen Methylierungsmuster innerhalb einzelner Kolonien spiegeln den klonalen Ursprung analysierter Proben deutlich wieder. Einzelne Abweichungen (K9, K13, K16) sind vermutlich auf sogenannte Mosaikkolonien zurückzuführen [156]. Analog zu den Methylierungsanalysen der Misch-populationen (Abb. 3.14), wurde auch auf Kolonie-Ebene der SFFV-Enhancer niemals methyliert vorgefunden.

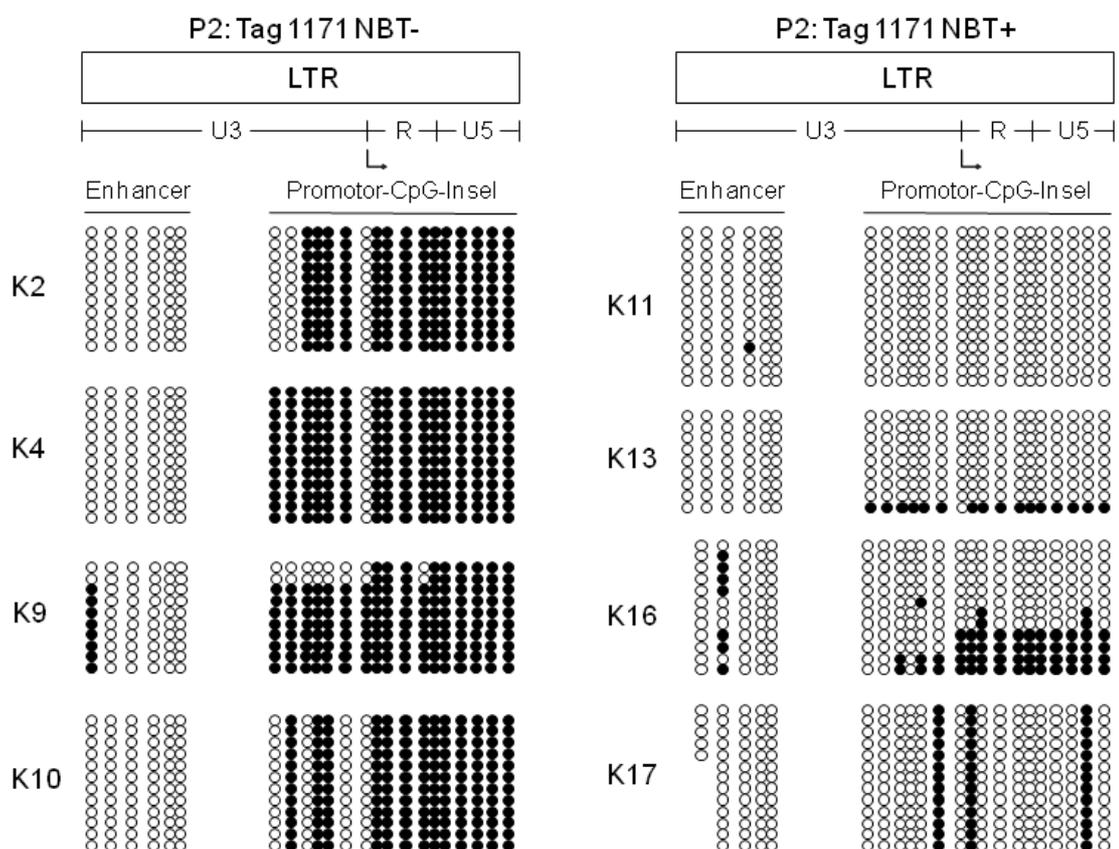


Abb. 3.16 CpG-Methylierungsanalyse des SF71^{phox}-Provirus hämatopoetischer Kolonien von Patient 2. Knochenmark wurde an Tag 1171 nach Therapie von P2 entnommen und mononukleäre Zellen aufgereinigt. Diese wurden anschließend auf Methylzellulose ausplattiert und hämatopoetische Kolonien nach 14 Tagen mit NBT-Lösung auf Superoxidproduktion gefärbt. Einzelne Kolonien wurden gepickt und DNA für den Nachweis von GP91 (PCR) und der CpG-Methylierung isoliert. Jeweils vier NBT-negative Kolonien (K2, K4, K9, K10) (A) sowie vier NBT-positive Kolonien (K11, K13, K16, K17) (B) wurden untersucht. Die direkte Korrelation zwischen Promotormethylierung und Abwesenheit der Superoxidproduktion konnte gezeigt werden. (K: Kolonie; LTR: *long terminal repeat*; weiße Kreise: nicht methyliert; schwarze Kreise: methyliert)

3.3.3 CpG-Methylierung des dominanten *Mds1*-Klons (F02) von Patient 2

Nachdem der Zusammenhang zwischen SFFV-Promotormethylierung und fehlender Superoxidproduktion aufgrund abgeschalteter Transgenexpression in hämatopoetischen Kolonien von P2 hergestellt werden konnte, wurde die Frage nach dem Methylierungsmuster spezifischer Klone in den Patientenzellen untersucht. Zunächst wurde der dominante Klon 87428 F02 (F02) sowohl an der 5'LTR als auch an der 3'LTR mittels lokusspezifischer-PCR nach Bisulfit-Konvertierung von DNA aus peripherem Blut des zweiten Patienten an verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn analysiert. Dieser Klon hatte eine provirale Integration im zweiten Intron des *Mds1*-Gens. Expressionsanalysen auf Kolonien in dieser Arbeit hatten ergeben, dass die benachbarten *Evi1*- und *Mds1-Evi1*-Gene durch das Provirus transkriptionell aktiviert wurden (Abb. 3.5). In der Folge dieser Protoonkogen-Aktivierung konnte dieser Klon besser als andere Zellen wachsen und ist im Anteil von allen detektierten Integrationen auf einen Anteil von ca. 55% an Tag 982 nach Transplantation angestiegen (Abb. 3.1). Da der Klon F02 den größten Beitrag an der transduzierten Population im Therapieverlauf des X-CGD-Patienten ausmachte, war es wichtig herauszufinden welchen Beitrag er zu der funktionellen GP91^{phox}-Rekonstitution geleistet hatte. Aufgrund des klonspezifischen Methylierungsmusters würden Rückschlüsse auf die Superoxidproduktion möglich.

Die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des dominanten Klons F02 zeigten eine ausgeprägte Hypermethylierung des Promotors an allen untersuchten Zeitpunkten, sowohl in der 5'LTR als auch in der 3'LTR (Abb. 3.17). Entsprechend war die Methylierung am Promotor schon 175 Tage nach Therapiebeginn vollständig ausgebildet, wodurch dieser Klon das Transgen (GP91^{phox}) nicht exprimierte und deshalb auch nicht zur funktionellen Enzymrekonstitution beim zweiten X-CGD-Patienten beigetragen hatte. Im Gegensatz hierzu konnte keine CpG-Methylierung des SFFV-Enhancers festgestellt werden, welches im Rückschluss eine uneingeschränkte Transaktivierungskapazität vermuten ließ. Dieser Zusammenhang konnte bestätigt werden, da Expressionsanalysen auf klonaler Ebene in dieser Arbeit die transkriptionelle Aktivierung des *Mds1-Evi1*-Genlokus gezeigt hatten (Abb. 3.5).

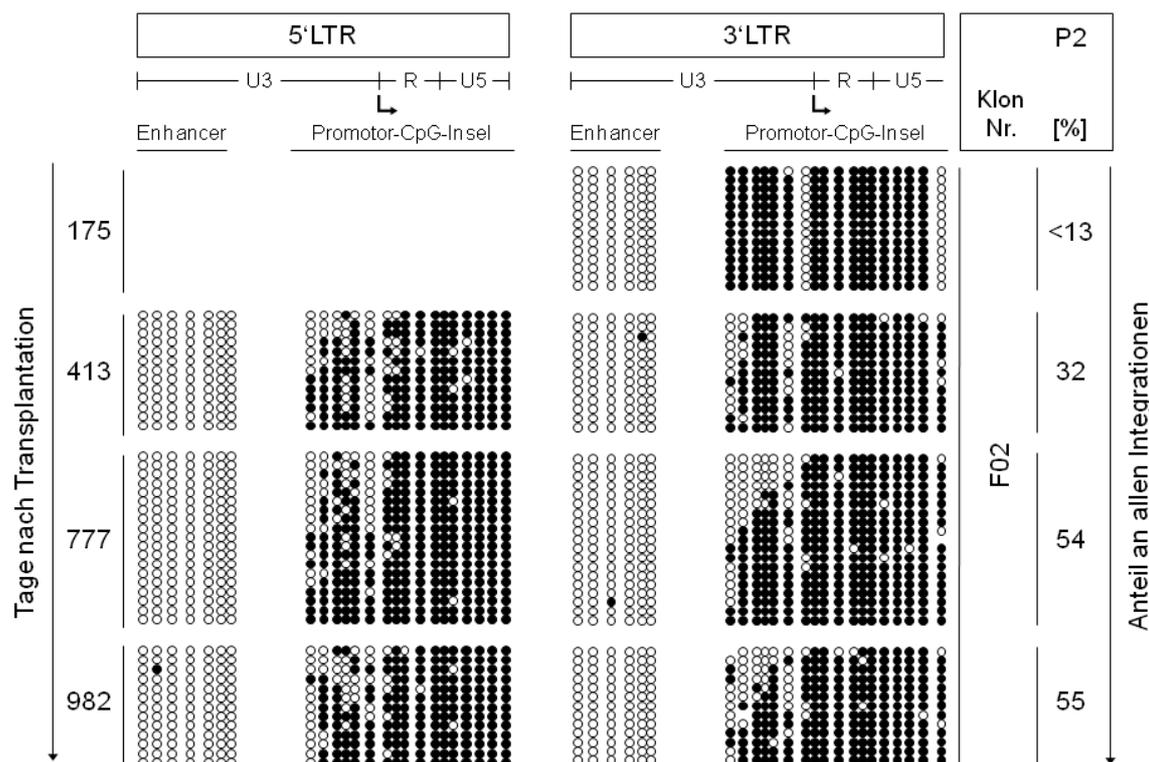


Abb. 3.17 Methylierungsanalyse des dominanten Klons 87429 F02 von Patient 2. DNA aus peripheren Blutzellen von Patient 2 wurde an angegebenen Tagen nach Therapiebeginn isoliert und die CpG-Methylierung des Provirus mittels lokusspezifischer Bisulfit-Sequenzierung des dominanten Klons 87429 F02 bestimmt. Sowohl 5'LTR als auch 3'LTR wurden spezifisch untersucht. An allen analysierten Zeitpunkten war eine Hypermethylierung des Promotors an beiden LTRs zu beobachten. Das CpG-Cluster im Enhancer war niemals methyliert. CpG-Dinukleotide sind in Form von Kreisen dargestellt (weiß: nicht methyliert; schwarz: methyliert) und repräsentieren innerhalb einer Reihe jeweils einen Bakterienklon. Der Anteil des dominanten Klons an allen nachweisbaren Integrationen ist auf der rechten Seite in Prozent angegeben (siehe auch Abb. 3.1).

Eine Zusammenfassung der Promotor-CpG-Methylierungsanalysen des dominanten Klons F02 von P2 am proviralen Integrationsort ist nachfolgend schematisch zusammengefasst (Abb. 3.18).

Dominanter *Mds1*-Klon 87429 F02

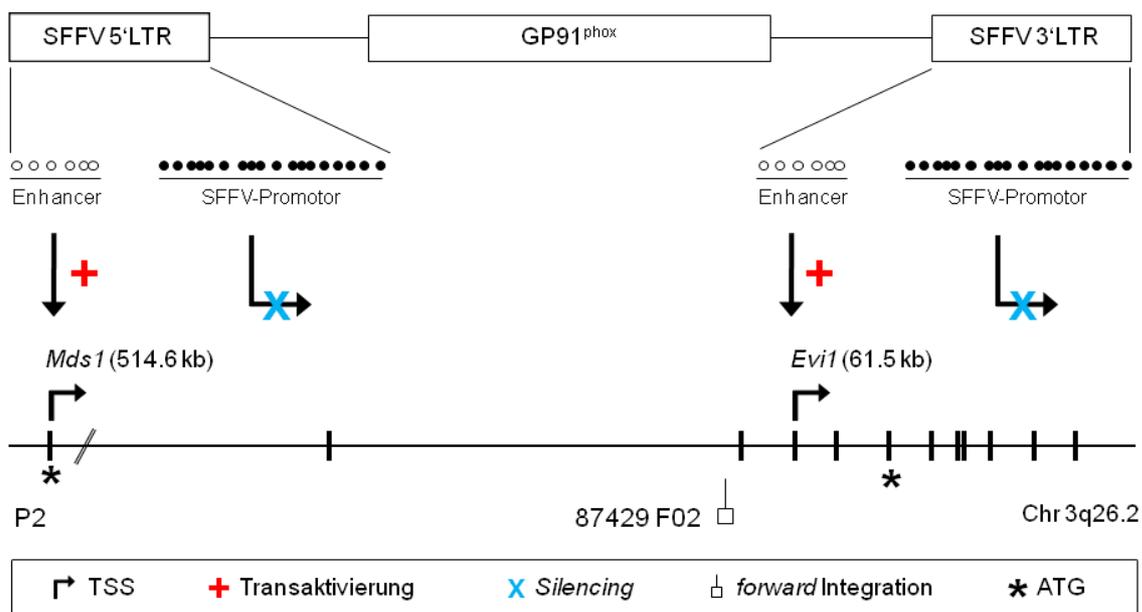


Abb. 3.18 Übersicht proviraler CpG-Methylierung und insertioneller Aktivierung am *Mds1-Evi1*-Integrationsloкус des dominanten Klons 87429 F02 von Patient 2. Der dominante Klon 87429 F02 ist in forward Orientierung im zweiten Intron von *Mds1* integriert. Aus RT-PCR-Analysen auf Kolonien (Abb. 3.5) und lokusspezifischen Methylierungsanalysen (Abb. 3.17) geht hervor, dass beim dominanten Klon (F02) der *Mds1-Evi1*-Genloкус insertionell aktiviert war, die GP91^{phox}-Transgenexpression jedoch durch epigenetisches *Silencing* abgeschaltet wurde.

3.3.4 Lokusspezifische CpG-Methylierungsanalysen bei Patient 2

Analog zu der spezifischen-Methylierungsanalyse des dominanten Klons F02, wurde für weitere individuelle Klone lokusspezifische-PCRs nach Bisulfit-Konvertierung von DNA aus peripherem Blut von P2 etabliert (in Zusammenarbeit mit Rolf Kramer). Da sich bei dem dominanten Klon keine Unterschiede in der CpG-Methylierung beider LTRs gezeigt hatten und die 3'LTR sensibler amplifizierbar war, wurde letztere für Folgeanalysen ausgewählt. Hierbei wurde der Fokus auf den Tag 982 nach Therapiebeginn von P2 gelegt und vor allem Integrationen im *Mds1*-Gen analysiert. Zusätzlich wurde die Integration B06 (*Glis1*) untersucht, welche zusammen mit der Integration A02 (*Mds1*) in einem doppeltransduzierten Klon aufgetreten war. Der Nachweis hierfür konnte anhand lokusspezifischer-PCRs auf hämatopoetischen Patientenkolonien erbracht werden, da jeweils beide Insertionen gleichzeitig nachweisbar waren (pers. Mitteilung Carolin Preiss). Dieser doppeltransduzierte Klon (B06/A02) machte an Tag 982 den zweitgrößten Anteil (11-16%) nach dem dominanten Klon F02 (55%) an allen detektierbaren

Integrationen aus CpG-Methylierungsanalysen an beiden Insertionsorten zu diesem Zeitpunkt ergaben eine vollständig Hypermethylierung im Promotorbereich (Abb. 3.19). Drei weitere Integrationen im *Mds1*-Gen (072, E06 und E02) ergaben ebenso eine vollständige Methylierung im Promotorbereich. Lediglich die Klone H03 und 079 (beide *Mds1*) waren im Promotorbereich nicht methyliert und konnten somit das Transgen GP91^{phox} exprimieren. Da beide Klone in *forward* Orientierung integriert waren, sind sie sehr wahrscheinlich für die Entstehung der 5'LTR-EVI1-Fusionstranskripte an Tag 982 verantwortlich (Abb. 3.3). Allerdings ist zu beachten, dass diese beiden nicht abgeschalteten Klone an Tag 982 mit 1-2% nur einen sehr geringen Anteil aller Insertionen ausmachten und daher vermutlich nur geringfügig zur Superoxidproduktion beigetragen hatten. Bemerkenswerterweise zeigten diese beiden Klone ein abweichendes Methylierungsmuster im Vergleich zu dem allgemeinen Trend aller Integrationen, ebenso wie im Vergleich zu den anderen Integrationen im *Mds1*-Genlokus. Zudem war auffällig, dass diese beiden Klone an den Tagen 658 bzw. 861 nach Therapie zum ersten Mal mittels LM-PCR nachgewiesen werden konnten, es sich also um relativ „junge“ Klone am Zeitpunkt 982 gehandelt haben musste.

Der provirale SFFV-Enhancer war auch bei allen klonspezifischen Methylierungsanalysen niemals methyliert vorgefunden worden. Dieses durchgängig auffällige Muster ließ einen Selektionsdruck vermuten, der diesen Bereich „aktiv“ gehalten haben musste. Hierdurch war die Transaktivierungskapazität auf benachbarte Gene durch den proviralen Enhancer niemals beeinträchtigt worden und somit konnten in der Folge einzelne Klone mit bestehendem Selektionsvorteil (in der Mehrheit Klone mit Integrationen in *Mds1-Evi1*) aus der Gesamtpopulation herauswachsen.

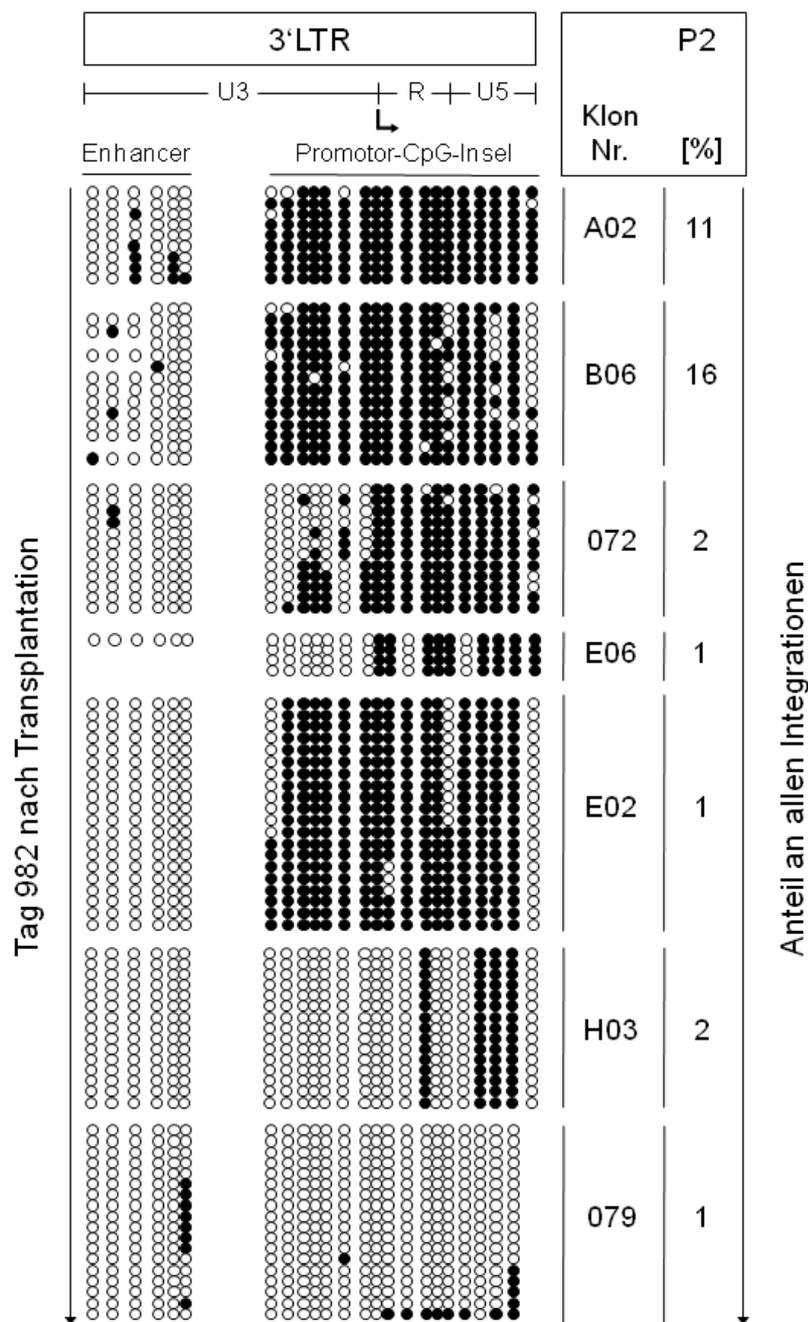


Abb. 3.19 CpG-Methylierungsanalyse individueller Integrationen von Patient 2. DNA aus peripheren Blutzellen wurde an Tag 982 nach Therapiebeginn von Patient 2 isoliert und mittels lokusspezifischer Bisulfit-Sequenzierung der CpG-Methylierungszustand des SFFV-Promotors und -Enhancers angegebener Integrationen bestimmt. Es wurde jeweils spezifisch die 3'LTR untersucht. CpG-Dinukleotide sind in Form von Kreisen dargestellt (weiß: nicht methyliert; schwarz: methyliert) und repräsentieren innerhalb einer Reihe jeweils einen Bakterienklon. Der Anteil der Klone von allen nachweisbaren Integrationen ist auf der rechten Seite in Prozent angegeben (siehe auch Abb. 3.1). Bis auf Klone H03 und 079 waren alle Klone im Promotor hypermethyliert. Der Enhancer war niemals methyliert. (A02: 87429 A02 (*Mds1*); B06: 81676 B06 (*Glis1*); 072: G2-0072 (*Mds1*); E06: 81841 E06 (*Mds1*); E02: 81675 E02 (*Mds1*); H03: 78166 H03 (*Mds1*); 079: G2-0079 (*Mds1*))

Promotor-CpG-Methylierungsanalysen individueller Klone im *Mds1*-Genlokus von P2 an Tag 982 der Frankfurter X-CGD-Gentherapiestudie sind nachfolgend schematisch zusammengefasst (Abb. 3.20).

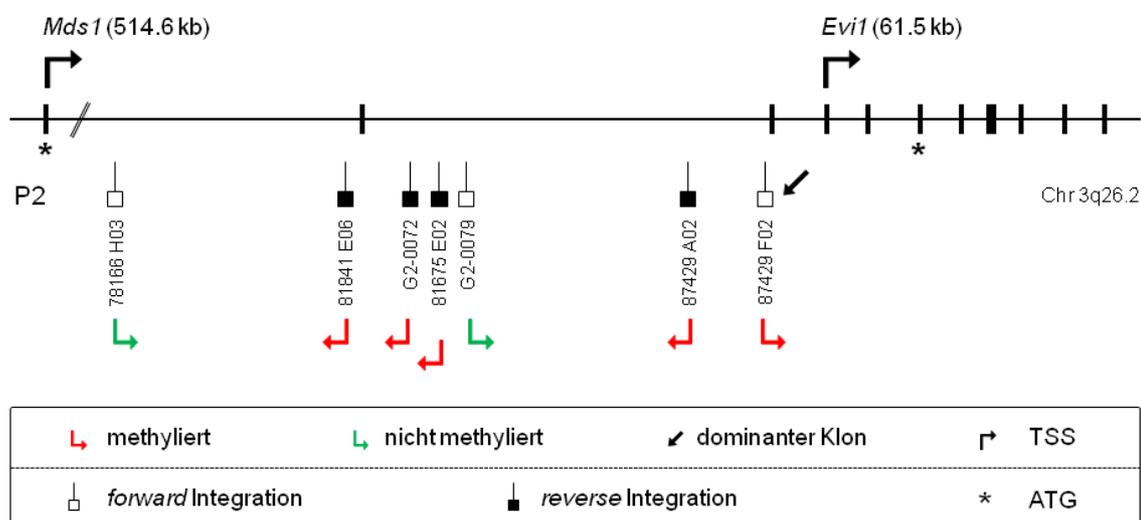


Abb. 3.20 Übersicht der Promotor-CpG-Methylierung individueller Integrationen von P2. Proviralen Integrationen von P2 an Tag 982 nach Gentherapie sind entsprechend der Orientierung und der Promotormethylierung (Abb. 3.18 und Abb. 3.20) am *Mds1-Evi1*-Genlokus zusammengefasst.

3.3.5 CpG-Methylierung des dominanten *Mds1*-Klons (G11) von Patient 1

Untersuchungen der klonalen Frequenz einzelner proviraler Integrationen innerhalb der Gesamtpopulation transduzierter Zellen von P1 ergaben, dass ebenso wie bei P2 ein *Mds1*-Klon die Hämatopoese dominierte. Die Analyse der Promotor-CpG-Methylierung sollte aufklären, ob dieser Klon im Verlauf der Therapie epigenetisch abgeschaltet wurde. Nachfolgende Methylierungsanalysen von G11 beziehen sich auf die 5'LTR, da sie in diesem Fall sensitiver zu amplifizieren war als die 3'LTR. Die lokusspezifische Bisulfit-Sequenzierung des dominanten Klons G11 auf DNA aus dem peripheren Blut von P1 ergab, dass insgesamt nur wenige CpG-Dinukleotide im Promotorbereich an den untersuchten Zeitpunkten nicht methyliert waren. Schon 45 Tage nach Therapiebeginn war dieser Klon an SFFV-Promotor-CpGs deutlich methyliert. Die epigenetische Abschaltung des Promotors nahm im Verlauf der Therapie immer weiter zu. An Tag 820 nach Therapiebeginn war der Promotor vollständig methyliert (Abb. 3.21). Entsprechend hatte G11 nur einen kleinen Beitrag an der funktionellen Rekonstitution des behandelten X-CGD-Patienten bis an Tag 542, bzw. an späteren Zeitpunkten vermutlich keinen

Beitrag mehr. Konsistent mit vorherigen Beobachtungen war auch G11 im Enhancerbereich niemals methyliert vorgefunden worden, was einen positiven Selektionsdruck auf diesen transaktivierenden Bereich vermuten lässt und somit eine klonale Expansion durch Insertionsmutagenese am *Mds1-Evi1*-Genlokus ermöglicht hatte.

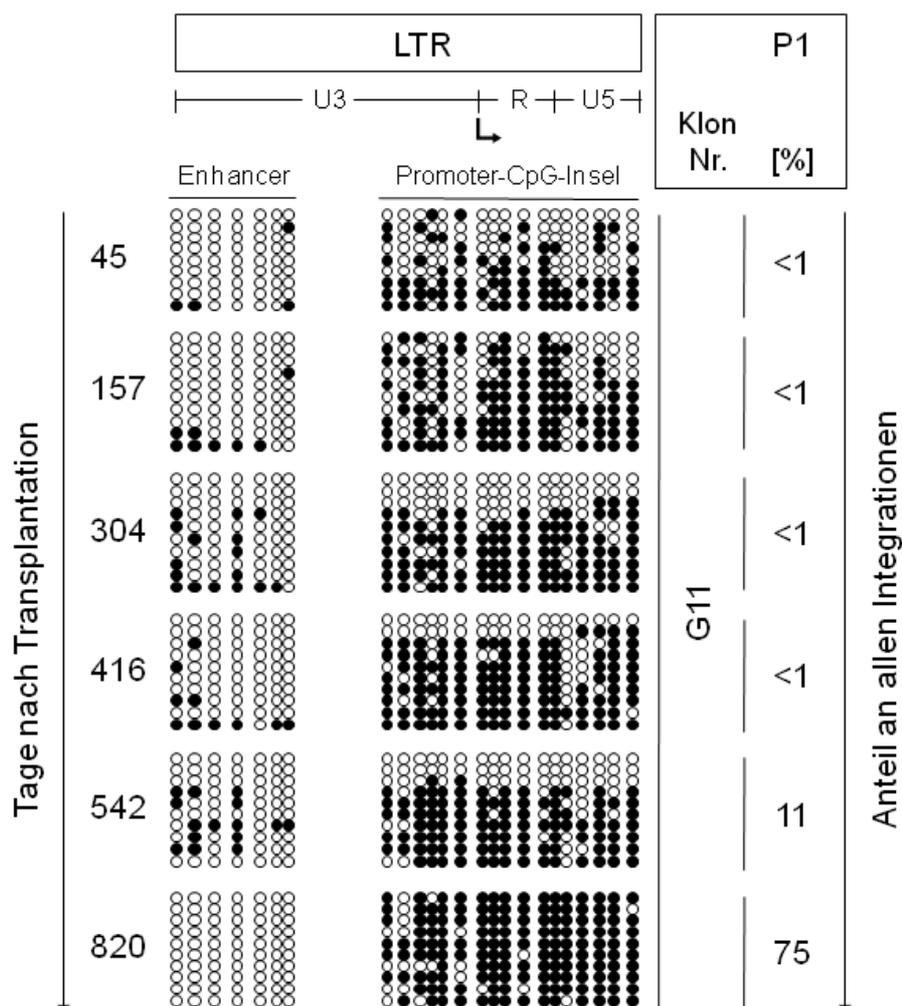


Abb. 3.21 Methylierungsanalyse des dominanten Klon 76776 G11 von Patient 1. DNA aus peripheren Blutzellen von Patient 1 wurde an angegebenen Tagen nach Therapiebeginn isoliert und mittels lokusspezifischer Bisulfit-Sequenzierung der Methylierungszustand des SFFV-Promotors und -Enhancers des dominanten Klon 76776 G11 (*Mds1*) bestimmt. Hier wurde die 5'LTR spezifisch untersucht. Von Tag 45 bis Tag 542 war die Mehrheit der CpGs methyliert und an Tag 820 war der Promotor vollständig methyliert. Der Enhancer war nie methyliert. CpG-Dinukleotide sind in Form von Kreisen dargestellt (weiß: nicht methyliert; schwarz: methyliert) und repräsentieren innerhalb einer Reihe jeweils einen Bakterienklon. Der Anteil des dominanten Klon an allen nachweisbaren Integrationen ist auf der rechten Seite in Prozent angegeben (siehe auch Abb. 3.1).

3.3.6 Lokusspezifische CpG-Methylierungsanalyse bei Patient 1

Weitere provirale Insertionen bei P1 wurden neben dem dominanten Klon G11 auf ihren Methylierungszustand in der LTR untersucht. Einen vollkommen nicht methylierten Promotor zeigte die provirale Insertion A08 während dem ganzen Therapieverlauf (Abb. 3.22). Dieser Klon hatte eine provirale Integration 17403 bp *downstream* vom *Prkra*-Gen, die weniger als 100 bp neben einer CpG-Insel in *forward* Orientierung der Transkriptionseinheit von AC009948.5 (Ensemble) lag. Da Klon A08 einen bedeutenden Anteil innerhalb der transduzierten Population bis etwa Tag 542 ausmachte (bis zu 33 % Anteil; persönliche Mitteilung von Manfred Schmidt; siehe Abb. 3.22), ist die rekonstituierte Superoxidproduktion in der Anfangszeit der Gentherapie bei P1 maßgeblich auf diesen Klon zurückzuführen. Vermutlich war die klonale Expansion dieses Klons nicht auf die Transaktivierung des *Prkra*-Genlokus zurückzuführen, vielmehr ist wahrscheinlich, dass die zweite Integration in diesem Klon A09 (*Mds1*) - wiederum durch Aktivierung von *Evi1* - die Ursache für die klonale Expansion war.

Die Untersuchungen der Integration A09 (*Mds1*) zeigte, dass dieser Klon im Promotorbereich von dem Tag 157 bis zu dem Tag 416 vollständig methyliert war (Abb. 3.22). Dieser Klon hatte somit keinen Beitrag zur funktionellen Rekonstitution des behandelten Patienten an den analysierten Zeitpunkten. Wiederum war im Enhancerbereich niemals eine Methylierung bei Klon A09 detektierbar, was einmal mehr den positiven Selektionsdruck auf diesen transaktivierenden Bereich widerspiegelte.

Ein zweiter nicht methylierter Klon 80484 A02 war zudem an den Tagen 416 und 472 nach Therapiebeginn nachweisbar. Diese provirale Integration hatte etwa 8189bp *upstream* des *Prkce*-Gens direkt in eine CpG-Insel stattgefunden. Nach Analyse sowohl der 5'LTR sowie der 3'LTR konnte eine besondere Beobachtung gemacht werden. Die provirale 5'LTR war nicht methyliert, ganz im Gegensatz zu der vollständig methylierten 3'LTR (Abb. 3.23). Darüber hinaus konnten in diesem Ansatz benachbarte CpGs der genomischen CpG-Insel am Integrationsort amplifiziert werden, die im Methylierungsmuster identisch zu der jeweils benachbarten viralen LTR waren. Zusätzliche Untersuchungen benachbarter genomischer CpGs bei Methylierungsanalysen von spezifischen *Mds1*-Klonen bei P1 zeigten ebenfalls die gleiche Tendenz. Bei mehreren methylierten Klonen wurden jeweils einige benachbarte genomische CpGs methyliert vorgefunden (Diplom Arbeit von Rolf Kramer). Diese Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass sich endogene epigenetische Methylierungsmuster auf einge-

brachte, in diesem Fall virale Sequenzen überträgt bzw. ausweitet und somit die provirale Transgenexpression beeinflusst.

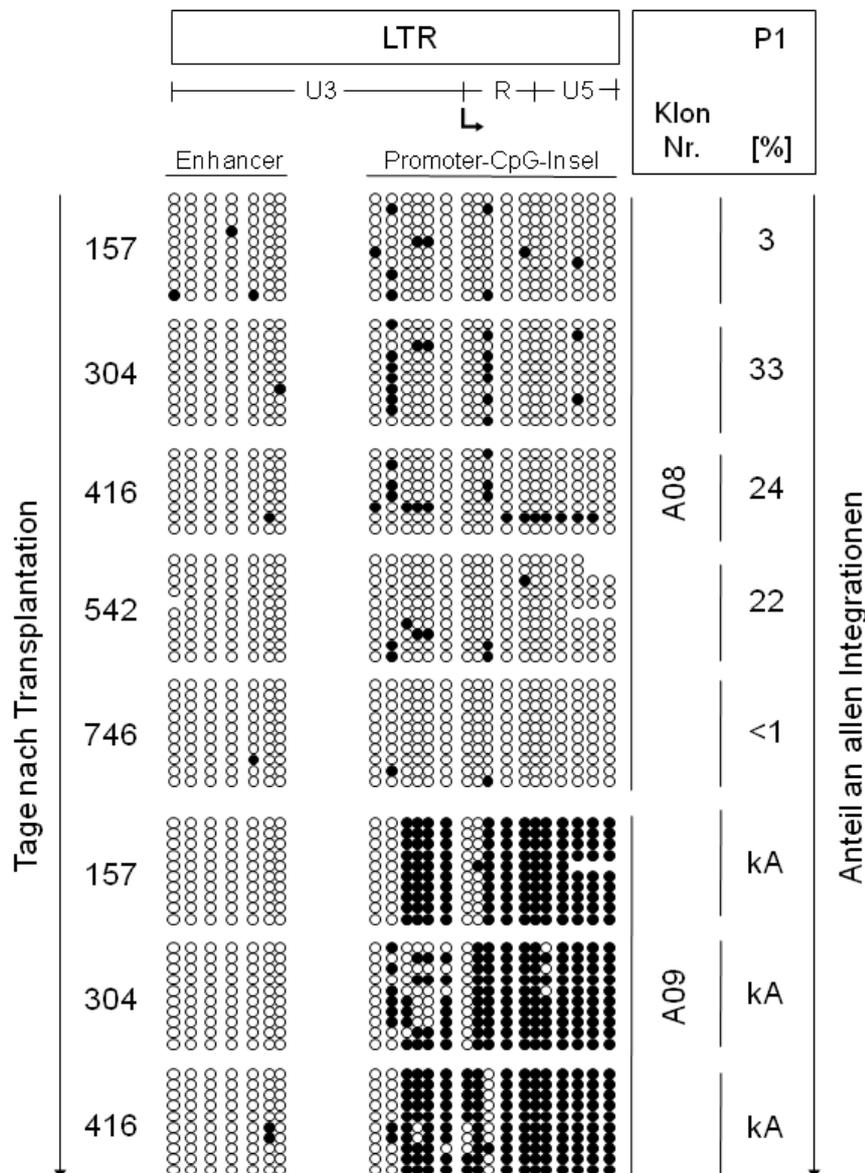


Abb. 3.22 CpG-Methylierungsanalyse individueller proviraler Integrationen von Patient 1. DNA aus peripheren Blutzellen von Patient 1 wurde an verschiedenen Tagen nach Therapiebeginn isoliert und mittels lokusspezifischer Bisulfit-Sequenzierung der Methylierungszustand des SFFV-Promotors und -Enhancers angegebener proviraler Integrationen bestimmt. Es wurde jeweils spezifisch die 5'LTR untersucht. Klon A08 war zu keinem Zeitpunkt der Therapie methyliert, wohingegen Klon A09 an den untersuchten Zeitpunkten vollständig methyliert war. Enhancer CpG-Dinukleotide waren auch hier niemals methyliert. CpG-Dinukleotide sind in Form von Kreisen dargestellt (weiß: nicht methyliert; schwarz: methyliert) und repräsentieren innerhalb einer Reihe jeweils einen Bakterienklon. Der Anteil der Klone von allen nachweisbaren Integrationen ist für A08 auf der rechten Seite angegeben. (A08: 75916 A08 (*Prkra*); A09: 77110 A09 (*Mds1*); kA: keine Angabe)

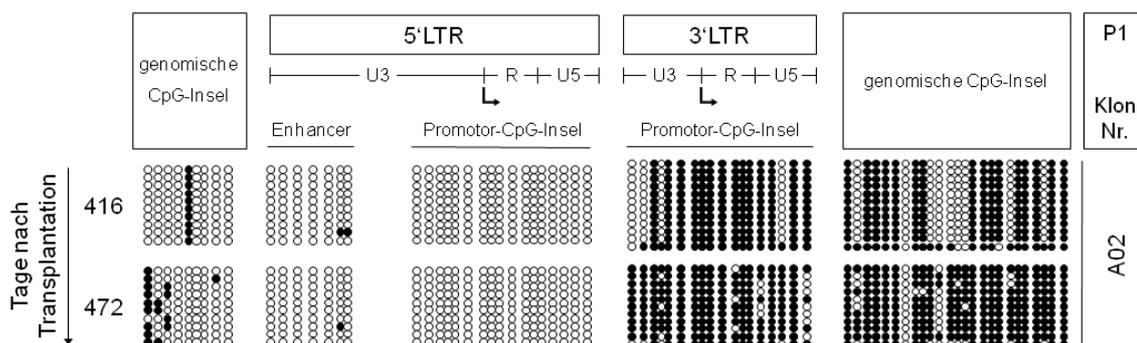


Abb. 3.23 CpG-Methylierungsanalyse der proviralen Integration 80484 A02 von Patient 1. DNA aus peripheren Blutzellen von Patient 1 wurde an den Tagen 416 und 472 nach Therapiebeginn isoliert und mittels lokusspezifischer Bisulfit-Sequenzierung der Methylierungszustand des SFFV-Promotors und -Enhancers bestimmt. Es wurde sowohl die 5'LTR als auch die 3'LTR mit den jeweils flankierenden Bereichen im Genom untersucht. Hier zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der LTR-Methylierung und der jeweils benachbarten genomischen CpG-Insel. CpG-Dinukleotide sind in Form von Kreisen dargestellt (weiß: nicht methyliert; schwarz: methyliert) und repräsentieren innerhalb einer Reihe jeweils einen Bakterienklon. (A02: 80484 A02 (*Prkra*))

3.4 *In vitro* Behandlung von X-CGD-Patientenzellen mit Aza-D/TSA

Durch selektive Methylierung der CpG-Insel im proviralen SFFV-Promotor im Verlauf der Frankfurter Gentherapiestudie bei zwei X-CGD-Patienten wurde die Transgenexpression epigenetisch abgeschaltet und somit der Langzeittherapieeffekt deutlich vermindert. Eine Umkehrung der transkriptionellen Repression durch einen Methyltransferase-Inhibitor (Aza-D: 5-Aza-2'-Deoxycytidin) in Kombination mit einem Histondeacetylase-Inhibitor (TSA: Trichostatin A) ließen eine Reaktivierung der proviralen Transgen-expression und somit der therapeutischen Superoxidproduktion bei den behandelten X-CGD-Patienten möglich erscheinen. Sowohl in murinen Zelllinien als auch in humanen CD34⁺ Zellen konnte durch Kombination von Aza-D und TSA eine abgeschaltete Transgenexpression zumindest teilweise wiehergestellt werden [142, 156, 158]. Basierend auf dieser Beobachtung wurden mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark von P2 an Tag 1240 nach Therapiebeginn entnommen, aufgereinigt und *in vitro* zuerst 6 Tage in einem Expansionsmedium kultiviert. Hierdurch wurde eine Vermehrung von CD34⁺ Zellen angestrebt, ohne jedoch eine Differenzierung der Vorläuferzellen zu begünstigen. Anschließend wurde 2 Tage mit Aza-D und danach 7 Tage mit TSA behandelt, bevor eine Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung der viralen LTR durchgeführt

wurde. Parallel wurde ein Teil dieser behandelten Zellen auf Kollagen ausplattiert, um hämatopoetische Kolonien auf die Reaktivierung der Superoxidproduktion in einem NBT-Assay zu überprüfen (Abb. 3.24).

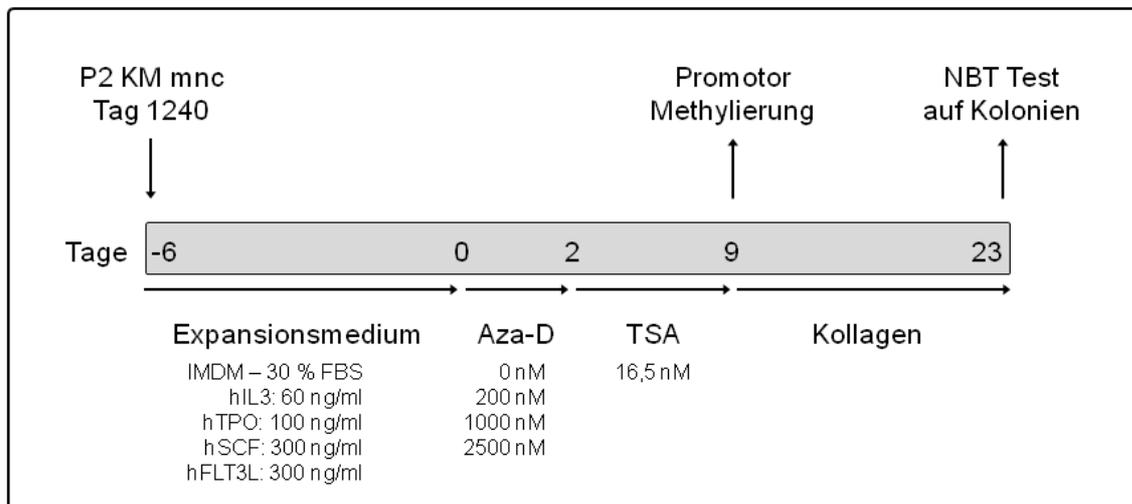


Abb. 3.24 Übersicht der Aza-D/TSA-Behandlung zur Dereprimierung der proviralen Transkription in Knochenmarkszellen von P2. An Tag 1240 nach Gentherapiebehandlung wurden mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark von P2 isoliert und 6 Tage *in vitro* in einem Expansionsmedium kultiviert. Anschließend wurde 2 Tage mit Aza-D (Methyltransferase-Inhibitor) und dann 7 Tage mit TSA (HDAC-Inhibitor) behandelt. Ein Teil der Zellen wurde für Bisulfit-Sequenzierung eingesetzt, der Rest wurde auf Kollagen ausplattiert, Kolonien nach 14 Tagen ausgezählt und mit einem NBT-Test auf Superoxidproduktion getestet. (KM: Knochenmark; mnc: mononukleäre Zellen; Aza-D: 5-Aza-2'-deoxycytidine; TSA: Trichostatin A; NBT; Nitrobluetetrazolium)

3.4.1 Kultivierung primärer X-CGD Knochenmarkszellen

Die angestrebte Expansion der CD34⁺ Vorläuferzellen von P2 in einem Expansionsmedium (siehe Abb. 3.24) wurde anhand der Zellzahl und der Vitalität überprüft. An beiden Parametern war erkennbar, dass es zu einem Verlust der Patientenzellen mit reduzierter Vitalität gekommen war (Abb. 3.25). Nach 6 Tagen wurde mit der Aza-D-Behandlung begonnen.

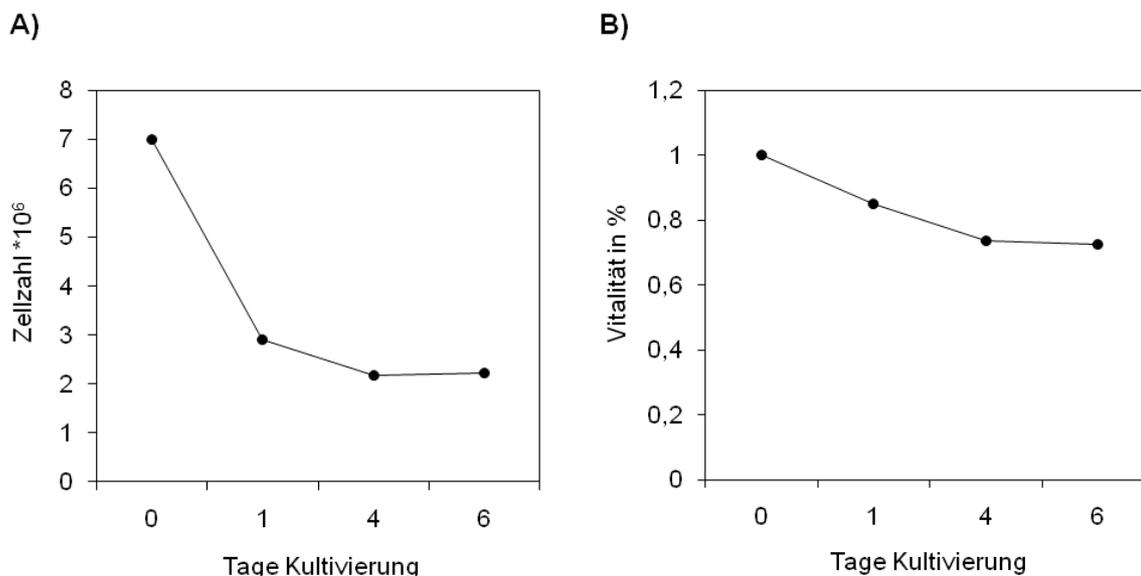


Abb. 3.25 Kultivierung mononukleärer Knochenmarkzellen von P2 an Tag 1240 nach Gentherapie. (A) Verlauf der Zellzahl über sechs Tage *in vitro* Kultivierung im Expansionsmedium (vgl. Abb. 3.24). **(B)** Verlauf der Zellvitalität während der Kultivierung. Zellzahl und Vitalität wurde mit Trypanblaufärbung bestimmt.

3.4.2 *In vitro* Behandlung mit Aza-D/TSA

Grundvoraussetzung für die demethylierende Wirkung von Aza-D ist die Zellproliferation. Durch Einbau dieses Cytidin-Analoga in die DNA einer Zelle wird eine *de novo* Methylierung verhindert. Zu hohe Dosierungen von Aza-D können jedoch toxisch wirken [159]. Daher wurden während der 2-tägigen Aza-D und anschließender TSA-Behandlung Zell-Wachstum und -Vitalität mit Trypanblaufärbung überprüft. Kontroll-Zellen (ohne Aza-D-Behandlung, mit TSA-Behandlung) konnten sich bis Tag 4 recht gut vermehren, fielen dann bis Tag 7 in der Zellzahl ab. Alle drei mit verschiedenen Konzentrationen von Aza-D behandelten Zellpopulationen teilten sich deutlich schlechter. Die Probe mit 1000 nM zeigte zumindest eine geringe Proliferation bis Tag 4, danach reduzierte sich die Zellzahl auch hier deutlich. Die Vitalität aller Proben war bis zum zweiten Tag konstant geblieben, fiel dann aber sehr stark ab. Die Kontroll-Zellen, welche auch mit TSA behandelt wurden, zeigten erst nach dem vierten Tag einen ähnlich deutlichen Abfall in der Zellzahl und Vitalität wie die behandelten Proben (Abb. 3.26).

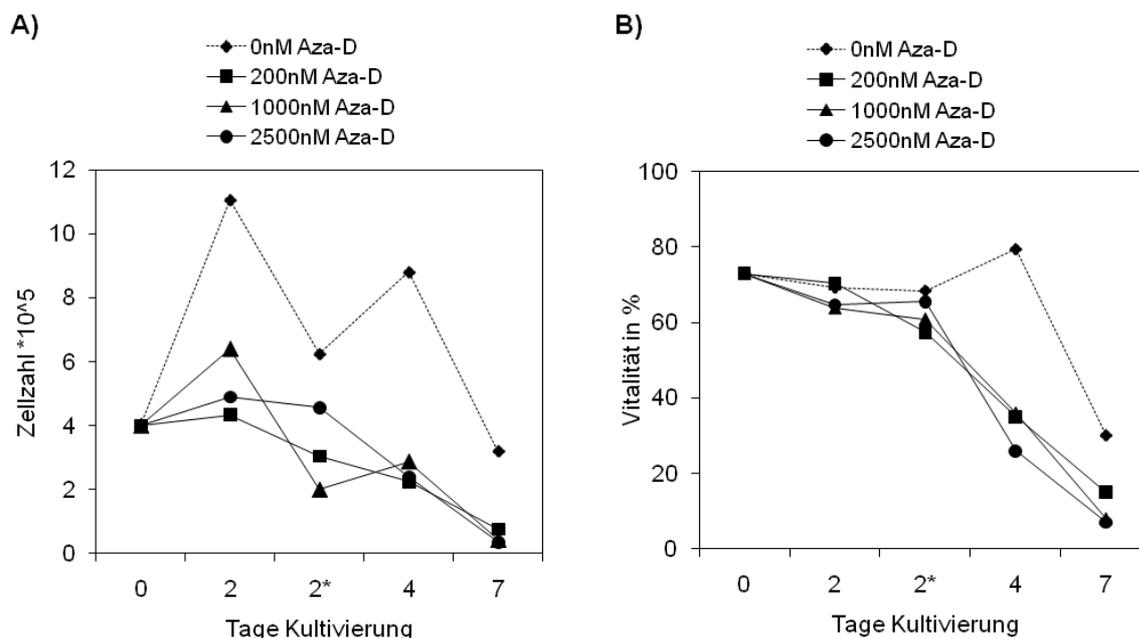


Abb. 3.26 *In vitro* Behandlung der Knochenmarkszellen von P2 an Tag 1240 nach Genterapie mit Aza-D/TSA. (A) Verlauf der Zellzahl während der Aza-D/TSA-Behandlung. **(B)** Verlauf der Zellvitalität während der Aza-D/TSA-Behandlung. Bei allen Proben kam es zu einem Abfall der Zellzahl und Vitalität während der Behandlung. Kontrollzellen und Aza-D (1000 nM) behandelte Zellen proliferierten geringfügig bis Tag vier. (* gibt Werte nach dem Waschen der Zellen an)

3.4.3 Analyse der CpG-Demethylierung

Nach Behandlung der Patientenzellen mit Aza-D/TSA wurde an Tag 7 ein Teil der Zellen (1×10^4) für Methylierungsanalysen entnommen und restliche Zellen ($2,6 \times 10^4 - 2 \times 10^5$) für weiterführende Analysen auf Collagen ausplattiert (vgl. Abb. 3.24). Die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung spiegelten den für die Wirksamkeit von Aza-D vorausgesetzten Wachstumsverlauf wieder. Kontroll-Zellen waren an der Promotor-CpG-Insel vollständig methyliert. Bei den Ansätzen mit 200 nM und 2500 nM Aza-D war jeweils nur eine von zwanzig Sequenzen vollständig nicht methyliert. Ein Teilerfolg konnte jedoch bei der Probe mit 1000 nM Aza-D erzielt werden, da hier knapp 30 % demethylierte Promotor Sequenzen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.27).

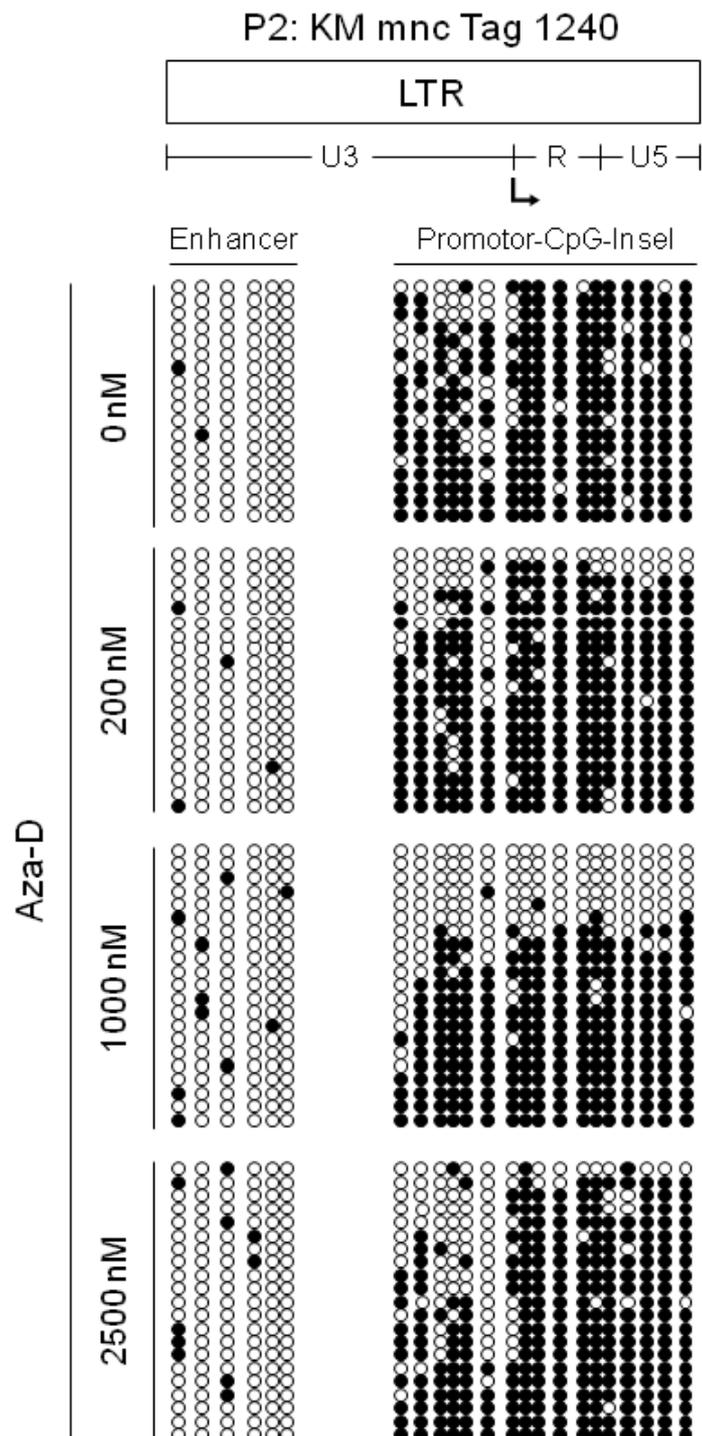


Abb. 3.27 CpG-Methylierungsanalyse *in vitro* Aza-D/TSA behandelter Knochenmarkzellen von P2 an Tag 1240 nach Therapiebeginn. Nach neun Tagen Behandlung mit Aza-D/TSA (vgl. Abb. 3.24) wurde mittels Bisulfit-Sequenzierung der Methylierungszustand der proviralen SFFV-LTR untersucht. Bei der Konzentration 1000 nM Aza-D konnten etwa 30% demethylierte Promotor-CpGs nachgewiesen werden. Der Enhancer war in allen Ansätzen nicht methyliert. CpG-Dinukleotide sind in Form von Kreisen dargestellt (weiß: nicht methyliert; schwarz: methyliert) und repräsentieren innerhalb einer Reihe jeweils einen Bakterienklon.

3.4.4 Analyse der Superoxidproduktion

Weitere Untersuchungen auf Rekonstitution der GP91^{phox}-Enzymaktivität nach Aza-D/TSA-Behandlung von Patientenkolonien ergaben keine messbare Superoxidproduktion nach NBT-Färbung (Tab. 10). Anhand der Anzahl gebildeter Kolonien bzw. Cluster war erkennbar, dass die Aza-D/TSA-Behandlung insgesamt toxisch für die Zellen war, da hier deutlich weniger Kolonien als in dem Kontroll-Ansatz gewachsen waren. Insgesamt waren in diesem Versuch die Zellzahlen und die Zellvitalität nicht optimal, so dass kein deutlich messbarer Effekt zu erwarten war.

NBT-Test auf Kolonien nach AzaD/TSA-Behandlung (P2 KM mnc Tag 1240)					
Aza-D	Zellen/ 2 Platten	Kolonien/ 1x10 ⁵ Zellen	Kolonien >50 Zellen	Cluster <50 Zellen	NBT+
0 nM	2 x 10 ⁵	32	64	186	0
200 nM	6,5 x 10 ⁴	12	8	25	0
1000 nM	3,3 x 10 ⁴	18	6	4	0
2500 nM	2,6 x 10 ⁴	0	0	12	0

Tab. 10 Auswertung des NBT-Testes auf Knochenmark Kolonien von P2 an Tag 1240 nach Aza-D/TSA-Behandlung. *In vitro* Aza-D/TSA behandelte Zellen wurden auf Collagen ausplattiert und Kolonien nach 14 Tagen mittels NBT-Färbung auf Superoxidproduktion untersucht (Abb. 3.23). Es konnte keine Superoxidproduktion in den Patientenkolonien nach Aza-D/TSA-Behandlung, ebenso wie in dem Kontroll-Ansatz gemessen werden. (KM. Knochenmark; Aza: 5-Aza-2'-deoxycytidine; NBT; Nitrobluetetrazolium)

3.5 Bestimmung der Anfälligkeit viraler Vektoren gegenüber *Silencing*

Mit Hilfe des molekularen Monitoring von zwei X-CGD-Patienten nach Behandlung mit Gentherapie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Langzeithapieeffekt durch epigenetisches Transgen-*Silencing* sehr stark reduziert wurde (Abb. 3.12 und Abb. 3.14). Hieraus ergab sich der Bedarf nach einem „*Silencing*-Test-System“, welches weiterentwickelte Vektoren auf ihre Anfälligkeit gegenüber proviraler Transgen-Abschaltung in Wirtszellen überprüfen kann. Hierzu wurde zum einen die murine embryonale karzinoma Zelllinie P19 (DSMZ: Acc 316) ausgewählt, welche die provirale Expression innerhalb von zwei Wochen durch *Silencing* abschalten kann [156]. Zudem wurden in hämatopoetischen Kolonien aus Maus-Transplantationsexperimenten die Superoxidproduktion und die CpG-Methylierung analysiert.

3.5.1 *In silico* Analyse optimierter γ -retroviraler Vektoren auf CpG-Inseln

Die Transgenexpression zwei weiterentwickelter γ -retroviraler Vektoren wurde jeweils von einem internen Promotor gesteuert, da diese Vektoren in den LTR-Bereichen durch SIN-Konfiguration in der proviralen Form keinen Promotor oder Enhancer mehr enthielten. Der zelluläre c-fes-Promotor hatte sich hierbei als besonders geeignet erwiesen, da er bevorzugt in myeloischen Zellen exprimiert [160, 161]. Die Konstrukte kodierten für GP91^{phox} bzw. GFP und wurden im Vergleich zu dem klinischen Vektor mit dem SFFV-Promotor getestet. Alle Vektoren wurden zunächst auf CpG-Inseln mit Hilfe der Methprimer-Software [137] untersucht und Bisulfit-spezifische-Primer im Promotorbereich entworfen. Der c-fes-Promotor war hierbei auffällig CpG-reich. Durch die Codon-Optimierung von GP91^{phox} für eine erhöhte Expression in Säugerzellen [162] sind zudem 4 CpG-Inseln im Transgen entstanden. Ebenso konnte das Markergen GFP als CpG-Insel identifiziert werden. Auch die mutierte WPRE-Variante (ohne das X-Protein), die Vektortiter und Transgenexpression erhöht [163], hatte einen CpG-reichen Teil am 3' Ende (Abb. 3.28).

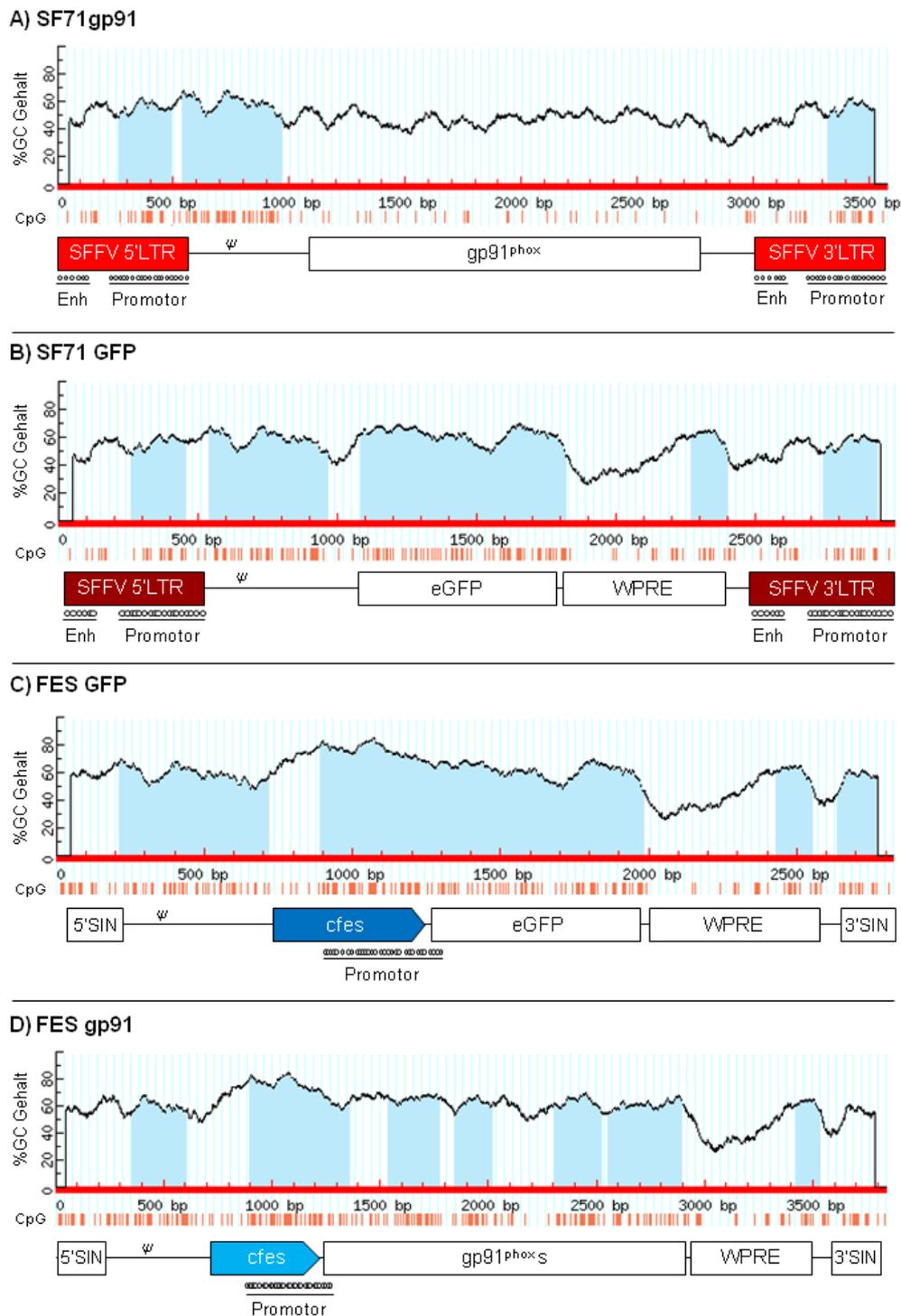


Abb. 3.28 Analyse von CpG-Inseln bei γ -retroviralen Vektoren. Der CpG-Gehalt angegebener proviraler Sequenzen wurde mit der Methprimer-Software ermittelt [137]. CpG-Inseln sind blau eingefärbt und wurden entsprechend der Definition (GC > 50%; GC Anteil vorhanden zu erwartet >0,6; min. 100bp Fragment-länge) bestimmt. Kreise in Promotor- bzw. Enhancerbereichen geben einzelne CpGs an, welche in nach-folgenden Methylierungsanalysen untersucht wurden. (Enh: Enhancer; GP91^{phox}S: synthetisches, Codon optimiertes GP91^{phox}; LTR: long terminal repeat; SIN: self inactivating; WPRE: woodchuck hepatitis posttranskriptional regulatory element)

3.5.2 *Silencing*-Assay mit γ -retroviralen Vektoren

Für die Ermittlung der Anfälligkeit optimierter γ -retroviraler Vektoren wurden P19-Zellen transduziert und die Transgenexpression über 3 Wochen mit dem FACS gemessen. Jeweils drei verschiedene MOIs wurden für SF71GFP und der FESGFP verwendet. Hier zeigte sich in allen Fällen eine Abnahme der GFP-Expression über die Zeit, unabhängig von der eingesetzten MOI (Abb. 3.29 A). Für alle weiteren Untersuchungen wurde jeweils der Ansatz mit MOI 2 detailliert untersucht, da hier der Anteil GFP-positiver Zellen zu Beginn des Versuchs mit 60 % bzw. 62 % nahezu identisch für den SFFV- bzw. dem FES-Vektor waren. Bei beiden Ansätzen konnte durch qPCR auf genomische DNA nachgewiesen werden, dass die Abnahme der Transgenexpression nicht durch einen Verlust an proviralen Kopien hervorgerufen wurde, da dieser über den Beobachtungszeitraum stabil geblieben war (Abb. 3.29 B). Weiterführende Analysen der Promotor-CpG-Methylierung ergaben eine unterschiedlich starke Zunahme über die Zeit (Abb. 3.29 C und D). Der virale SFFV-Promotor wurde sehr schnell und vollständig methyliert. Der Grad der Methylierung für den c-fes-Promotor lag mit etwa 70 % nach 20 Tagen etwas unter dem Wert von dem SFFV-Promotor. Das Maß der Promotor-Methylierung stimmte auffällig gut mit dem relativen Verlauf der Transgenexpression auf Protein-Ebene überein (Abb. 3.29 E). Anhand des Methylierungsgrades eingesetzter Promotoren konnte demzufolge das Maß für die Expression der Transgenkassette relativ gut abgeleitet werden.

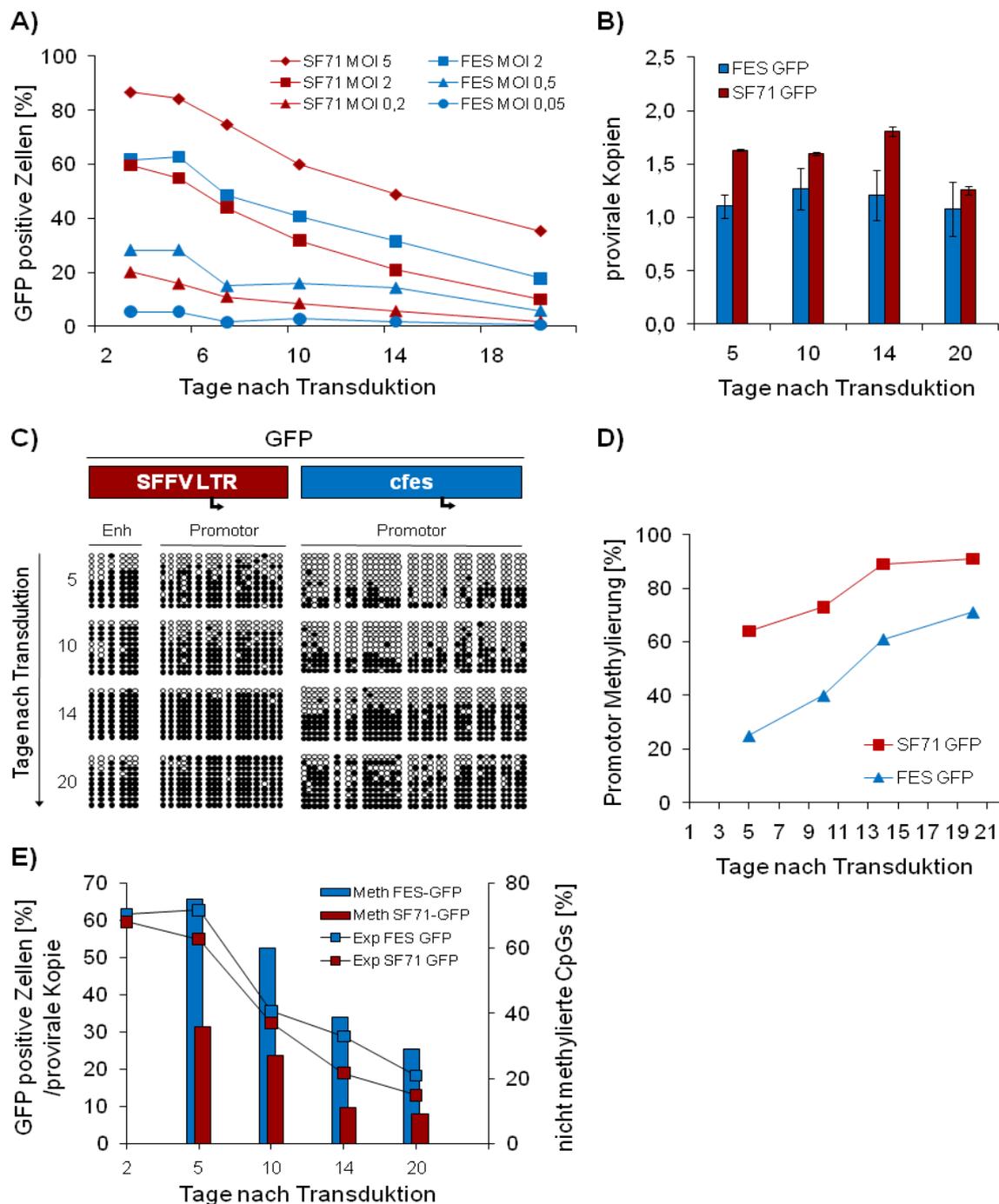


Abb. 3.29 Silencing-Assay mit γ -retroviralen GFP Vektoren in der murinen Stammzelllinie P19. P19-Zellen wurden mit den Vektoren SF71GFP oder FESGFP mit je drei MOIs transduziert. **(A)** Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde 20 Tage lang mit dem FACS gemessen. **(B)** Mit qPCR wurden absolute Menge proviraler Kopien für SF71GFP bzw. FESGFP mit der MOI 2 gemessen. Absolute Werte wurden in Relation zu Klonen mit einer proviralen Kopie berechnet. **(C)** Bisulfit-Sequenzierung der SFFV-LTR bzw. des c-fes-Promotors in P19-Zellen mit MOI 2. Schwarze Kreise geben methylierte CpGs, weiße Kreise nicht methylierte CpGs an. **(D)** Quantifizierung der in C) gezeigten Bisulfit-Sequenzierung. **(E)** Vergleich der GFP-Expression mit dem Anteil nicht methylierter CpGs im Promotor der Ansätze mit MOI 2. Der FESGFP-Vektor ist weniger anfällig gegenüber Silencing als der SFFVGFP-Vektor in P19-Zellen.

Bei dem Vergleich GP91^{phox}-kodierender γ -retroviraler Vektoren wurden P19-Zellen mit einer MOI 5 transduziert und die RNA-Expression, die proviralen Kopien und der Grad der Promotor-Methylierung über einen Zeitraum von 3 Wochen gemessen. Für den Nachweis der Transgenexpression des SF71GP91- und des FESGP91-Konstrukts wurde eine transgenspezifische RT-qPCR ausgewählt, da GP91^{phox} in dieser murinen Stammzelllinie auf Proteinebene mit dem FACS weder extrazellulär noch intrazellulär nachweisbar war (Daten hier nicht gezeigt). Auch hier zeigte sich für beide Konstrukte eine Abnahme der RNA-Expression über die Zeit, die beim FESGP91-Vektor weniger dramatisch als beim SF71GP91-Vektor aus der klinischen Studie war (Abb. 3.30 A). Auch hier konnte der Verlust proviraler Kopien mittels qPCR gegen die provirale DNA ausgeschlossen werden, da beide Ansätze einen stabilen oder leicht steigenden Anteil an Vektor-Kopien zeigten (Abb. 3.30 B). Die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung zeigten einen sehr deutlichen Unterschied in der Methylierungskinetik beider Konstrukte im GP91^{phox}-Kontext. Nach 20 Tagen wurde der c-fes-Promotor nur zu etwa 40 % methyliert, wohingegen der klinische Vergleichsvektor mit dem SFFV-Promotor fast zu 100% methyliert war (Abb. 3.30 C und D). Vergleichbar zu dem vorhergehenden Experiment mit dem Transgen GFP wurde auch hier eine gute Korrelation zwischen der RNA-Transgenexpression und der Promotor-CpG-Methylierung festgestellt. Im GP91^{phox}-Kontext konnte dementsprechend eine deutlich geringere Anfälligkeit des c-fes-Promotors gegenüber *Silencing* beobachtet werden als bei dem SFFV-Promotor in P19-Zellen.

Der Vergleich der *Silencing*-Assays mit den Transgenen GFP bzw. GP91^{phox} zeigte deutlich, dass der virale SFFV-Promotor sehr schnell und vollständig - unabhängig von dem eingesetzten Transgen und dem WPRE Element - methyliert wird. Der c-fes-Promotor hingegen wird mit der synthetischen GP91^{phox}-Variante weniger stark methyliert, als im GFP-Kontext. Hieraus ergab sich ein Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit des Promotors methyliert zu werden und dem Transgen an sich. Die GP91^{phox}s-Transgen-Variante wurde im FES-Vektor für erhöhte Expression Codon-optimiert [162] und so treten im Vergleich zu der ursprünglichen GP91^{phox} Variante im SF71phox-Vektor insgesamt vier CpG-Inseln auf. Dieser erhöhte intragenische GC-Gehalt wirkte scheinbar hemmend gegenüber *Silencing*.

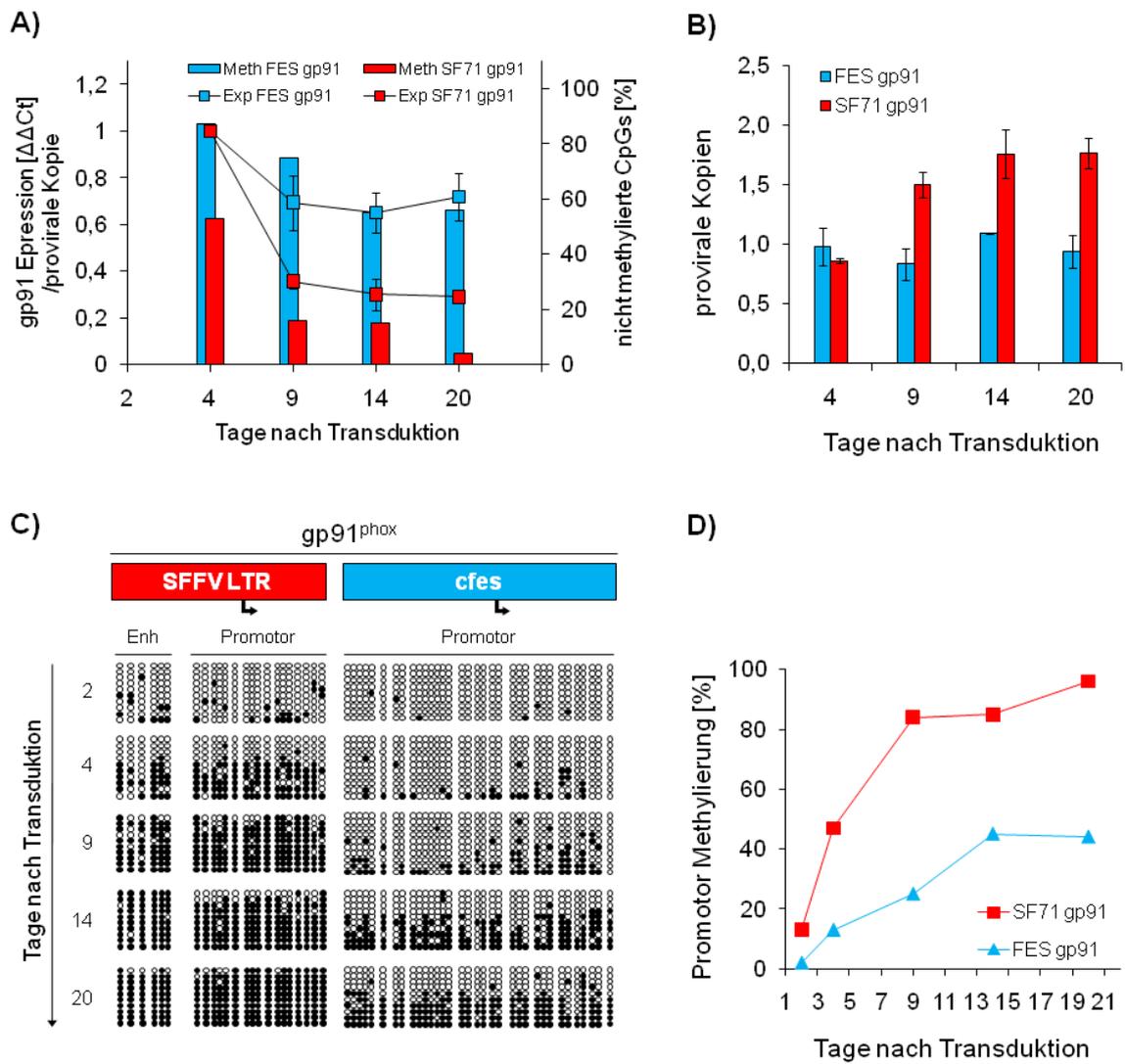


Abb. 3.30 Silencing-Assay mit γ -retroviralen GP91^{phox}-Vektoren in der murinen Stammzelllinie P19. P19-Zellen wurden mit SF71GP91 oder FESGP91 mit einer MOI 5 transduziert. **(A)** Vergleich der GP91^{phox} RNA-Expression (qRT-PCR) normalisiert über die Anzahl proviraler Kopien mit dem Anteil nicht methylierter CpGs im Promotor aus C). **(B)** Absolute Mengen proviraler Kopien für SF71GP91 bzw. FESGP91 (qPCR). Absolute Werte wurden in Relation zu Klonen mit einer proviralen Kopie berechnet. **(C)** Bisulfite-Sequenzierung der SFFV-LTR bzw. des c-fes-Promotors in P19-Zellen. Schwarze Kreise geben methylierte CpGs, weiße Kreise nicht methylierte CpGs an. **(D)** Quantifizierung der in C) gezeigten Bisulfite-Sequenzierung. Der FESGP91-Vektor ist in P19-Zellen deutlich weniger anfällig gegenüber Silencing als der SF71GP91-Vektor.

3.5.3 CpG-Methylierung in murinen hämatopoetischen Kolonien

Aus *in vitro* Methylierungsanalysen in P19-Zellen konnte eine deutlich verminderte Anfälligkeit des c-fes-Promotors im Vergleich zu dem SFFV-Promotor nachgewiesen werden (siehe 3.5.2). Daher wurden weiterführende *in vivo* Untersuchungen an murinen hämatopoetischen Kolonien aus Maus-Transplantations-Experimenten durchgeführt. Im Rahmen einer präklinischen Evaluierung der Effizienz des FESGP91-Vektors (siehe 2.1.7.4) wurden *lineage* negative Stammzellen aus dem Knochenmark von X-CGD-Knockout-Mäusen isoliert und entweder 2 x mit einer MOI 3 (M3-LM: *low* MOI) oder 4x mit MOI 10 (M3-HM: *high* MOI) *ex vivo* transduziert (Versuchsreihe wurde von Stefan Stein, Linping Chen-Wichmann, Hana Kunkel und Eva Rudolf durchgeführt). Je 9×10^5 Zellen wurden in subletal bestrahlte (2 x 550 cGy) X-CGD-Empfängermäuse transplantiert. Aus diesen Empfängermäusen wurden nach 19 Wochen Knochenmarkszellen isoliert und je $3 - 6 \times 10^5$ *lineage*-negative Zellen aus der Versuchsreihe mit der niedrigen MOI (M3-LM) in bestrahlte (2 x 550 cGy) sekundäre X-CGD-Knockout-Mäuse transplantiert. Diese Versuchsreihe (M3-LM 2nd) wurde für weitere 13 Wochen detailliert untersucht. An Tag 4 nach der initiellen Transduktion und jeweils nach 19 Wochen bei M3-LM und M3-HM, sowie nach 13 Wochen bei M3-LM 2nd wurde ein Teil der Knochenmarkszellen auf Collagen (siehe 2.3.4.4) ausplattiert. Jeweils nach 10-14 Tagen wurde die Rekonstitution der Superoxidproduktion mit Hilfe eines NBT-Testes (siehe 2.3.4.5) auf den hämatopoetischen Kolonien überprüft. Ebenso wurde mit einer weiteren Versuchsreihe (GT03) verfahren, bei der *lineage*-negative Knochenmarkszellen von SJL-Mäusen (CD45.1) mit dem SF71phox-Konstrukt (siehe 2.1.7.4) transduziert und je 3×10^6 Zellen in letal bestrahlte *Black-6*-Empfängermäuse (CD45.2) transplantiert wurden. Hier wurden hämatopoetische Kolonien nach 30 Wochen auf Superoxidproduktion getestet. Bei allen Versuchsreihen wurden einzelne hämatopoetische Kolonien gepickt und anschließend DNA isoliert. Kolonien die keine NBT-Färbung zeigten (NBT-) wurden in Bezug auf *Silencing* genauer untersucht. Hierzu wurde zunächst eine PCR gegen das Provirus von Hana Kunkel durchgeführt. Positive Kolonien in dieser PCR waren entsprechend transduziert, produzierten jedoch kein Superoxid. Daher wurde in dieser Arbeit mittels Bisulfit-Sequenzierung der Methylierungszustand des c-fes- bzw. des SFFV-Promotors untersucht. Aus diesen Analysen ging deutlich hervor, dass keine der 13 untersuchten Kolonien mit dem FESGP91-Konstrukt im c-fes-Promotor methyliert waren, dagegen waren alle sechs SF71phox-Vektor transduzierten NBT negativen Kolonien im Promotor vollständig methyliert mit Ausnahme des Enhancers (Abb. 3.31) (SF71phox-Vektor Untersuchungen

von Uta Müller-Kuller durchgeführt). Somit gab es eine direkte Korrelation zwischen der Abwesenheit der SFFV-Promotor-Methylierung und der Abwesenheit der Superoxidproduktion. Dagegen konnte die fehlende Superoxidproduktion in den FESGP91-transduzierten Kolonien nicht auf ein Promotor-Hypermethylierung zurückgeführt werden. Die GP91^{phox}-Transgen-Aktivität muss demnach auf einem anderen Level reguliert worden sein. Vermutlich ist diese Situation vergleichbar mit der GP91^{phox}-Regulation in wildtyp-Zellen, da hier auch nur etwa 40% der Kolonien eine Superoxidproduktion nach NBT-Färbung zeigen (pers. Mitteilung Stefan Stein). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die Langzeit-Transgen-expression im Verlauf einer Gentherapie-Anwendung in Patienten mit dem FESGP91-Vektor eine deutliche Verbesserung gegenüber dem klinischen Vektor darstellt.

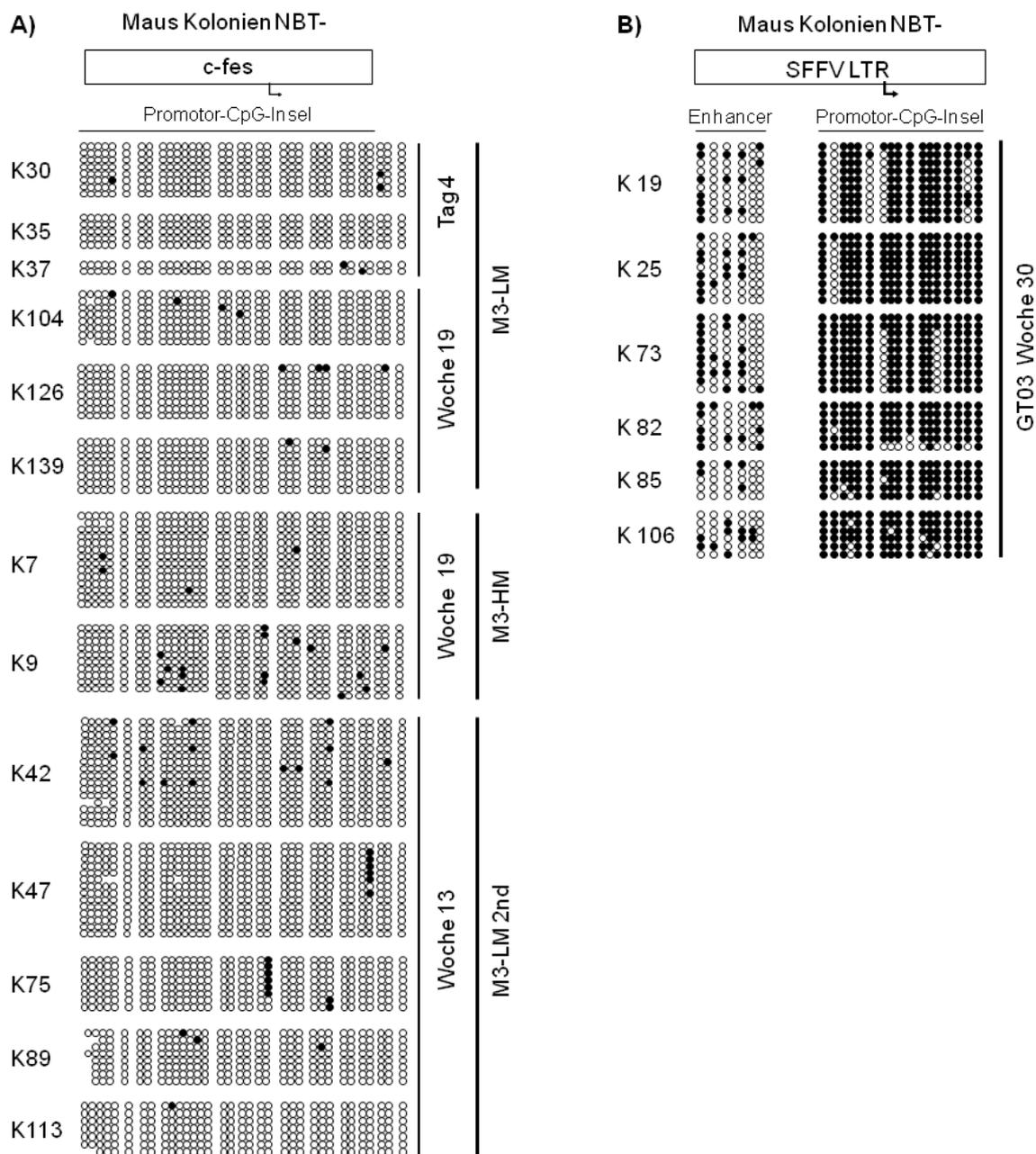
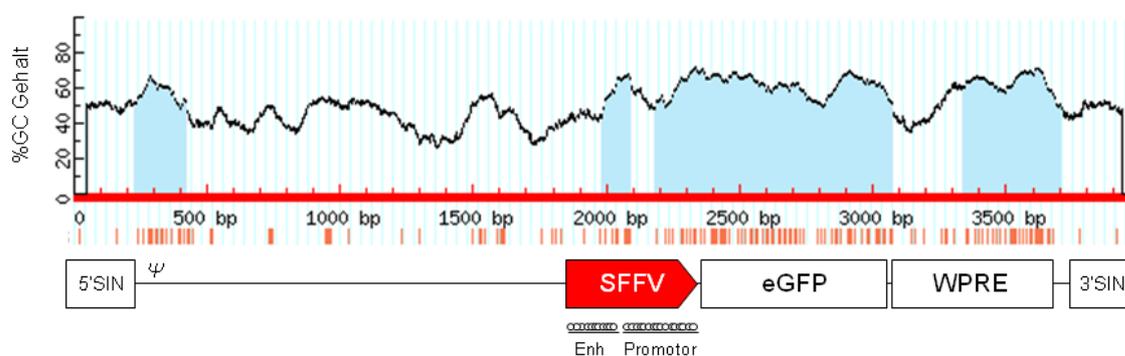


Abb. 3.31 Bisulfit-Sequenzierung transduzierter NBT-negativer hämatopoetischer Kolonien aus transplantierten Mäusen. A) Bisulfit-Sequenzierung des c-fes-Promotors einzelner Kolonien. Die Abwesenheit der Superoxidproduktion wird nicht durch Hypermethylierung der Promotor-CpG-Insel hervorgerufen. **B)** Bisulfit-Sequenzierung der SFFV-LTR einzelner Kolonien. Die Promotor-Hypermethylierung korreliert mit der Abwesenheit der Superoxidproduktion. Erklärungen des Versuchsaufbaus im Text. (NBT-: Nitroblue Tetrazolium negativ; K: Kolonie; M3: Effizienztest Nr.3; LM: low MOI; HM: high MOI; LM 2nd: low MOI sekundär transplantiert; GT03: Genotoxizitätstest Nr.3)

3.5.4 *In silico* Analyse optimierter lentiviraler Vektoren auf CpG-Inseln

Neben optimierten γ -retroviralen Vektoren wurden in dieser Arbeit auch optimierte lentivirale Vektoren gegenüber ihrer *Silencing*-Anfälligkeit getestet. Die untersuchten lentiviralen Vektoren steuerten die GFP-Expression von internen Promotoren, da sie beide SIN-Vektoren ohne Promotor oder Enhancer im LTR-Bereich waren. Der Referenz-Vektor enthielt den SFFV-Promotor aus der klinischen Studie und wurde mit dem URM-Vektor verglichen, welcher den myeloisch-spezifischen MRP8-Promotor (*myeloid related protein 8*) in Kombination mit einem vorgeschalteten A2- und CBX3-

A) SFFV GFP



B) URM GFP

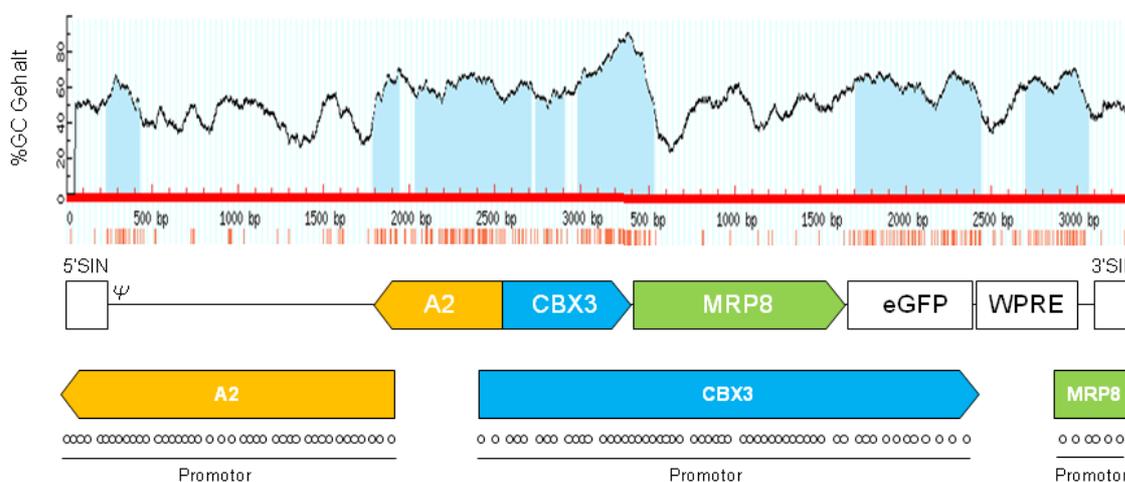


Abb. 3.32 Analyse von CpG-Inseln lentiviraler Vektoren. Der CpG-Gehalt angegebener proviraler Sequenzen wurde mit der Methprimer-Software ermittelt [137]. CpG-Inseln sind blau eingefärbt und wurden entsprechend der Definition (GC > 50%; GC Anteil vorhanden zu erwartet >0,6; min. 100bp Fragment-länge) bestimmt. Kreise in Promotor- bzw. Enhancerbereichen geben einzelne CpGs an, welche in nachfolgenden Methylierungsanalysen untersucht wurden. (Enh: Enhancer; SIN: *self inactivating*; URM: UCOE reverse MRP8; UCOE: *ubiquitous chromatin opening element*; A2/CBX: Elemente des bidirektionalen UCOE Promotors; MRP8: *myeloid related protein 8*; WPRE: *woodchuck hepatitis posttranskriptional regulatory element*)

Promotorbereich aus dem UCOE (*Ubiquitous Chromatin Opening Element*) in reverser Orientierung enthält. Untersuchung auf CpG-Inseln mit Hilfe der Methprimer-Software [137] zeigten bei dem SFFV-Promotor 5 zusätzliche CpG-Dinukleotide im Enhancer im Vergleich zu der Variante in den γ -retroviralen Konstrukten (vgl. Abb. 3.28). Die provirale Sequenz des URM-Konstrukts hatte einen auffällig hohen CpG-Anteil im A2 und CBX3 von UCOE, wohingegen der MRP8-Promotor nur wenige vereinzelt CpGs aufwies (Abb. 3.32).

3.5.5 *Silencing*-Assay mit lentiviralen Vektoren

Neben γ -retroviralen Vektoren lassen sich Zielzellen auch mit lentiviralen Vektoren transduzieren. Diese von HIV-1 abgeleiteten Vektoren haben den Vorteil auch ruhende Vorläufer - also echte Stammzellen - infizieren zu können [88, 164]. Zusammen mit der Eigenschaft bevorzugt in Gene und nicht im Bereich \pm 5kb um den Transkriptionsstart im Genom zu inserieren [105], könnten diese Vektoren weniger genotoxisch wirken. Daher wurden von Christian Brendel verschiedene lentivirale Vektoren *in vitro* und *in vivo* exzessiv im Hinblick auf die Behandlung von X-CGD-Patienten mit Gentherapie getestet und optimiert. Als vielversprechender Kandidat hat sich der URM-Vektor (UCOE reverse MRP8) herausgestellt, da dieser aufgrund des MRP8-Promotors weitestgehend zellspezifisch exprimiert und durch das UCOE-Element jedes integrierte Provirus zur Transgenexpression beiträgt und nicht von Chromatin-Positions-Effekten im komplexen Genom betroffen ist [165, 166].

Um die Anfälligkeit lentiviraler Vektorsysteme gegenüber *Silencing* testen zu können, wurde auch hier ein *Silencing*-Assay in der P19-Stammzelllinie ausgewählt. Hierbei zeigte der lentivirale Kontroll-Vektor mit internem SFFV-Promotor ab dem Tag 6 nach Transduktion einen kontinuierlichen Abfall der GFP-Expression. Im Vergleich zeigte der URM-Vektor ein erstaunlich stabiles Expressionsprofil über den Beobachtungszeitraum von 36 Tagen. Dieses Phänomen konnte sowohl für niedrig transduzierte als auch für höher transduzierte Mischpopulationen gezeigt werden (Abb. 3.33 A). Die stabile Anzahl proviraler Kopien wurde ab dem Tag 6 mit qPCR nachgewiesen (pers. Mitteilung Christian Brendel, Abb. 3.33 B)

Untersuchungen der Promotormethylierung mit Bisulfit-Sequenzierungen ergaben für den internen SFFV-Promotor im lentiviralen Kontext eine sehr schnelle Zunahme der CpG-Methylierung auf fast 100 % innerhalb der ersten 21 Tage. Ähnlich schnell wurden

die 8 CpGs des zellspezifischen MRP8-Promotors des URM-Konstrukts methyliert. Der A2-Promotor, welcher *reverse* gegen die Expressionskassette orientiert war, zeigte nach 21 Tagen etwa 50% methylierte CpG-Sequenzen. Ganz im Gegensatz dazu war der CBX-Anteil des UCOE-Elementes auch nach 21 Tagen vollständig nicht methyliert (Abb. 3.33 C und D). Dies korrelierte mit der stabilen Transgenexpression in der Stammzelllinie P19 über den Beobachtungszeitraum (Abb. 3.33). Die Resistenz des URM-Vektors gegenüber *Silencing*, machte dieses lentivirale System zu einem attraktiven Kandidaten für eine dauerhafte funktionelle Rekonstitution von X-CGD-Patientenzellen bei einer Gentherapie Behandlung.

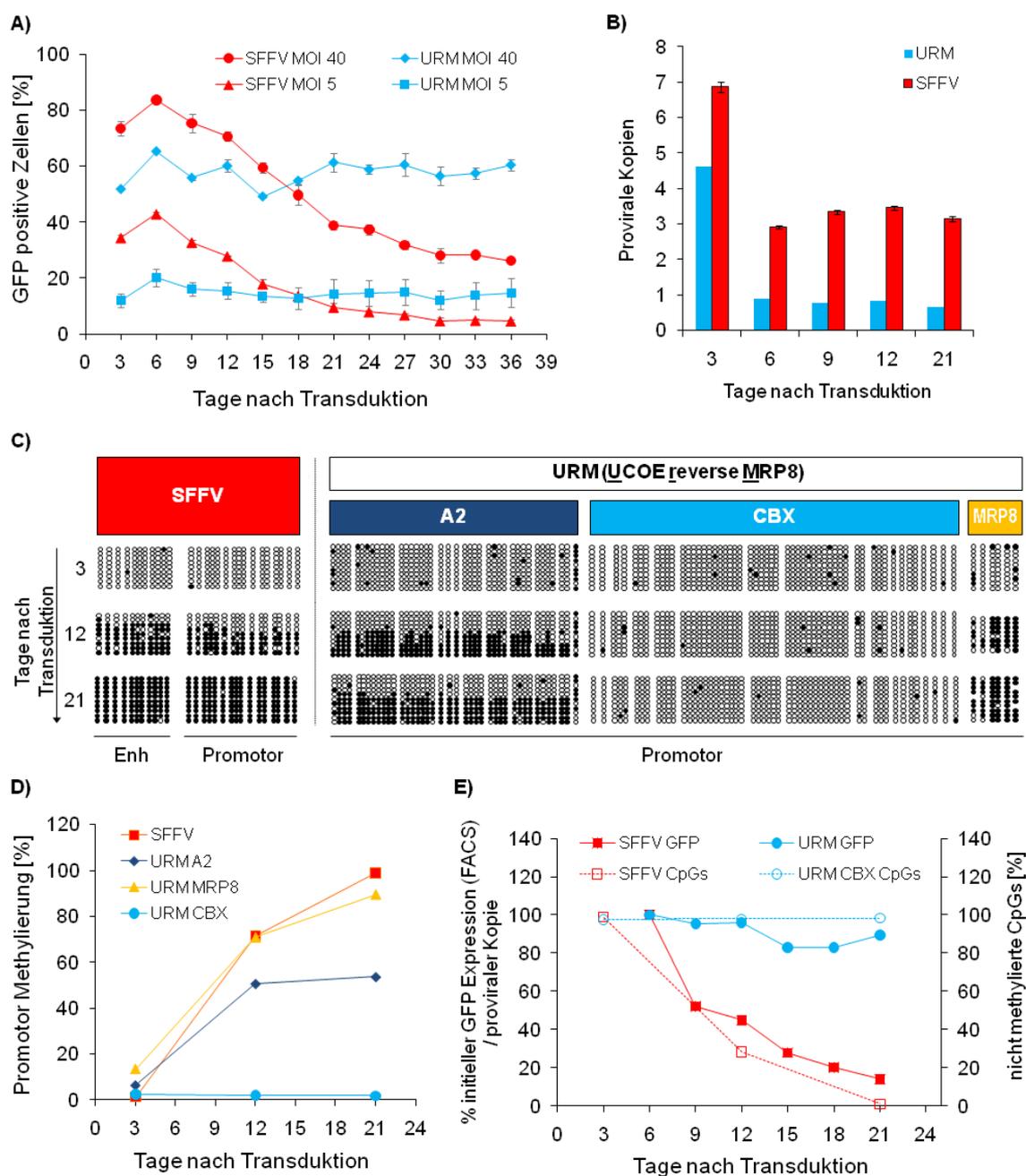


Abb. 3.33 Silencing-Assay mit lentiviralen GFP Vektoren in der murinen Stammzelllinie P19. (A) Der Anteil GFP-positiver Zellen nach Transduktion wurde 36 Tage lang mit dem FACS gemessen. Es wurden jeweils die MOI 5 bzw. MOI 40 für Transduktionen mit den Vektoren SFFVGFP bzw. URMGFP eingesetzt. (B) Absolute Mengen proviraler Kopien für SFFVGFP bzw. URMGFP mit der MOI 40 wurden mit qPCR bestimmt und in Relation zu Zellklonen mit einer proviralen Kopie berechnet. (C) Bisulfit-Sequenzierung der SFFV-LTR bzw. der A2-, CBX- und MRP8-Promotoren in P19-Zellen mit MOI 40. Schwarze Kreise geben methylierte CpGs, weiße Kreise nicht methylierte CpGs an. (D) Quantifizierung der in C) gezeigten Bisulfit-Sequenzierung. (E) Vergleich der GFP-Expression normalisiert über die Anzahl proviraler Kopien aus B) mit dem Anteil nicht methylierter CpGs im Promotor der Ansätze mit MOI 40. URM ist aufgrund des CBX-Promotors resistent gegen Silencing in P19-Zellen.

4. Diskussion

Im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie mit genmodifizierten Stammzellen für die Behandlung der Chronischen Granulomatose in Frankfurt, wurden zwei grundlegende Beobachtungen gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Grundlagen zum einen für die Abschaltung der Transgenexpression mit Verlust der therapeutischen Funktion genkorrigierter Zellen und zum anderen die Entwicklung einer klonalen Dominanz durch Insertionsmutagenese analysiert.

4.1 Reduzierte Superoxidproduktion durch epigenetisches *Silencing*

Der initiale Therapieerfolg bei zwei X-CGD-Patienten durch die Behandlung mit Gentherapie in Frankfurt am Main wurde im Laufe der Zeit abgeschwächt. Trotz nachweisbar hoher Anzahl genmodifizierter Zellen im Blut beider Patienten ist ein kontinuierlicher Abfall der Superoxidproduktion zu beobachten gewesen. Die Ursachen hierfür waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, da dieses Phänomen bis zu diesem Zeitpunkt bei keiner anderen Gentherapiestudie aufgetreten war. Bei anderen Immundefekten wie z.B. SCID-X1 hat vermutlich der positive Selektionsdruck genmodifizierter Zellen dieses Phänomen verdeckt. Dort sind Vorläuferzellen ohne funktionelle Genkorrektur nicht in der Lage in reife Immunzellen zu differenzieren und können somit nicht entstehen. Bei Immundefekten ohne Selektionsdruck wie bei X-CGD sind theoretisch zahlreiche Ursachen für den Verlust der Proteinfunktion möglich: klonale Schwankungen, Mutationen in der proviralen DNA-Sequenz, Immunreaktionen, toxische Effekte der Transgenexpression, ebenso wie epigenetische Ursachen. Da keine der erstgenannten Möglichkeiten experimentell bestätigt wurde (siehe 1.3.5.2), lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Analyse der epigenetischen Regulation der proviralen Transgenexpression.

Die Epigenetik befasst sich mit allen vererbbaaren Veränderungen der Genexpression und der Genregulation, welche nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind [167]. Eine entscheidende Rolle bei dieser Regulation spielt die Methylierung von Cytosinen innerhalb von CpG-Inseln sowie die Veränderung der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationen. Die bekanntesten Prozesse, welche durch eine methylierungsabhängige Repression gesteuert werden, sind die X-Chromosomen Inaktivierung, das genetische

Imprinting von Genen und das *Gen-Silencing* von Retroelementen [168-170]. Diese epigenetischen Prozesse spielen bei der strengen Regulation der Transkription eine wichtige Rolle, daher sind sie auch bei der evolutionären Entwicklung, der Krebsentstehung und klinischen Anwendungen wie der Gentherapie von besonderer Bedeutung [171-175].

Die DNA-Methylierung ist ein natürlicher Prozess in Zellen, bei der eine Enzymvermittelte Abwandlung der DNA-Bausteine erfolgt, ohne jedoch den genetischen Code dabei zu verändern. Diese DNA-Methylierung findet hauptsächlich an der 5'-C-Position von Cytosinen innerhalb von CpG-Dinukleotiden (CpGs) statt. Außerhalb der klassischen CpG-Motive finden Methylierungsprozesse weitaus weniger häufig statt [176]. CpGs kommen im Genom entweder vereinzelt oder mit sehr hoher Dichte in sogenannten CpG-Inseln vor. Diese CpG-Inseln sind meist regulatorische Bereiche der Transkription, und liegen vor allem in Promotorbereichen von Genen. Neben der Lokalisation am 5'-Ende von Genen wurden im geringeren Maße auch CpG-Inseln am 3'-Ende von Genen nachgewiesen [177]. Insgesamt treten sie bei allen Haushaltsgenen und auch bei vielen zellspezifischen Genen auf. Untersuchungen haben ergeben, dass etwa 55% aller humanen Gene und etwa 45% aller murinen Gene eine Promoter-assoziierte CpG-Insel aufweisen [178].

Man kann drei biologische Funktionen der DNA-Methylierung unterscheiden. Zum einen erlaubt die Methylierung einzelner CpGs die Unterscheidung von zelleigener und zellfremder DNA von Eindringlingen wie z.B. Viren, da letztere nicht methyliert vorliegt. Die zellfremde DNA kann bei Prokaryoten durch Restriktionsenzyme und Nukleasen spezifisch abgebaut werden. Wird die Fremd-DNA dennoch in das Wirtsgenom eingebaut, wie im Fall von Retroelementen (z.B. Transposons, LINES oder SINES), kann durch spezifische Methylierung die Transkription solcher Elemente abgeschaltet werden und dient den Wirtszellen somit als Abwehrmechanismus [179]. Ein weiterer Nutzen der DNA-Methylierung liegt in der Erkennung von Fehlern durch Mutationen bei der Replikation der DNA. Hierbei wird der methylierte Mutterstrang bei der Fehlerkorrektur der Polymerasen als Vorlage genutzt. Mit Hilfe der DNA-Methylierung können hierbei Mutter- und Tochterstrang unterschieden werden [180]. Als dritte Eigenschaft erlaubt die Methylierung von Promotor-CpG-Inseln die Steuerung der transkriptionellen Aktivität von Genen. Aktive Gene sind in der Regel hypomethyliert, während inaktive Gene hypermethyliert vorliegen. In der Folge der DNA-Methylierung von Promotor-CpG-Inseln können Gene transkriptionell abgeschaltet werden [181].

Die DNA-Methylierung wird durch spezifische Enzyme, den DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. Hierbei wird von S-Adenosyl-L-Methionin die Methylgruppe auf das Cytosin übertragen. Es entstehen S-Adenosyl-L-Homocystein und m^5 -Cytosin. Verschiedene Klassen von DNMTs sind in Säugerzellen bekannt. DNMT3a und DNMT3b sind für die *de novo* DNA-Methylierung und DNMT1 für die Erhaltung der DNA-Methylierung verantwortlich [182-184].

Die Abschaltung der Transkription geht mit der Ausbildung von Heterochromatin-Strukturen der DNA einher. Dies kann Folge der DNA-Methylierung in CpG-Inseln von Promotorbereichen durch DNMTs sein. Durch Bindung CpG-methylierungssensitiver Repressoren wie z.B. MBD im Komplex mit HDACs (HDAC1 und HDAC2) wird Histon H3 deacetyliert und schließlich methyliert. Hierdurch kann HP1 binden, seinerseits mit DNMTs wechselwirken und so die grundlegende Veränderung der Chromatinstruktur verstärken [185]. Letztlich initiiert die CpG-DNA-Methylierung die Deacetylierung der Histone, was die Kondensation des transkriptionell aktiven Euchromatins zum transkriptionell abgeschalteten Heterochromatin zur Folge hat (siehe Abb. 4.1) [173, 186, 187].

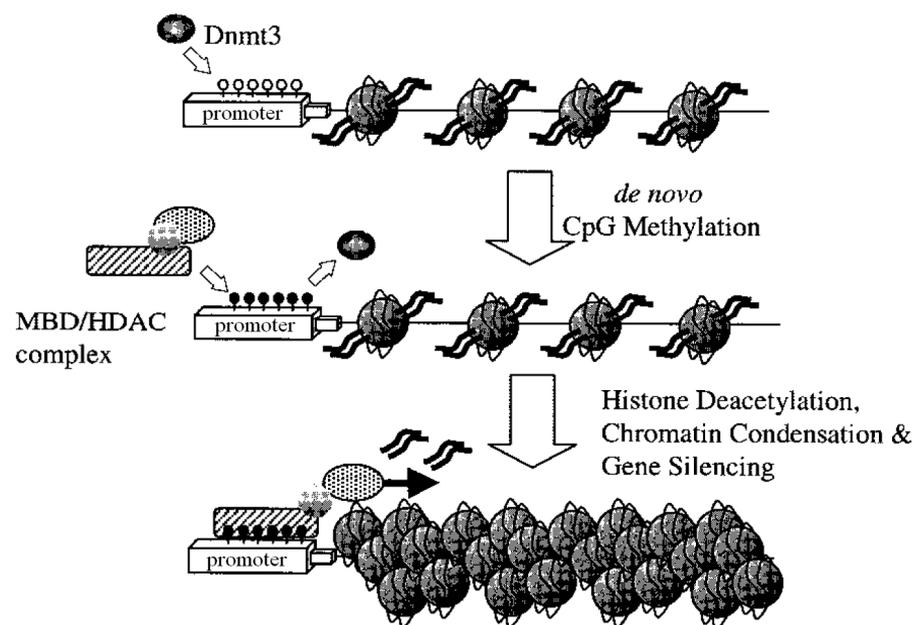


Abb. 4.1 Repression der Transkription. CpG-Inseln von Promotoren werden durch DNMT3a/b *de novo* methyliert. Im Zusammenspiel von DNMTs und methylierten CpGs werden MBD (*methyl-CpG binding domain protein*) in einem Komplex mit HDACs (*histone deacetylases*) rekrutiert. Durch Histondeacetylierung kondensiert das Chromatin und es kommt zum vollständigen Gen-Silencing im ausgebildeten Heterochromatin (Abb. modifiziert nach [186]).

Der therapeutische Effekt retroviraler Vektoren basiert auf ihrer Eigenschaft als transkriptionelle Einheit. Sie finden eine breite Anwendung in der genetischen Veränderung von Zellen und werden bei der Gensatztherapie von hämatologischen Erkrankungen in der Klinik eingesetzt. Neben dem unerwünschten Nebeneffekt einer potentiellen Insertionsmutagenese (siehe 1.3.2) besteht eine weitere Limitierung in Bezug auf die angestrebte Langzeitwirkung dieser Anwendung. Die epigenetische Steuerung der Transgenexpression durch die Wirtszelle kann in Systemen ohne Selektionsvorteil zum Gen-*Silencing* führen. Diese Anfälligkeit gegenüber der Abschaltung der Transgenexpression retroviraler Vektoren wurde in embryonalen Stammzellen bzw. embryonalen Karzinoma-Zelllinien mit MoMLV bereits erkannt. Trotz nachweisbarer proviraler Integration in diesen Zellen war keine Transgenexpression zu beobachten [188, 189]. Später konnte dieses Phänomen des Transgen-*Silencings* ebenso in hämatopoetischen Stammzellen für MoMLV gezeigt werden [133, 134]. Ursache hierfür ist ein Zusammenspiel zwischen der Chromatinstruktur am Insertionsort, vorhandenen oder eingebrachten Enhancer- und Promotor-Elementen sowie der PBS des eingesetzten Virus. Überlappend mit der 18bp langen PBS, welche für den Anfang der DNA-Synthese bei der Reversen Transkription der Retroviren notwendig ist [190], liegt die konservierte 17bp lange Repressor-Bindedomäne (RBS). An diese RBS können in *trans* agierende Faktoren binden und zur transkriptionellen Repression führen [191, 192]. Schon seit längerem ist bekannt, dass das RBS vermittelte *Silencing* durch Mutation einer einzelnen Base in dieser Sequenz (sog. B2 Mutation) aufgehoben werden kann [191]. Die in *trans* agierenden Faktoren sind jedoch erst seit kurzer Zeit identifiziert worden. Das Zinkfinger-Protein ZFP809 bindet an die RBS und dient als Adapter für die TRIM28-Bindung [193-195]. TRIM28 (auch Kap-1 bzw. Tifl-beta genannt) ist ein bekannter transkriptioneller Co-Repressor, welcher durch ein sequenzspezifisches KRAB Zinkfinger-Protein (ZFP809) rekrutiert wird [195]. Seinerseits rekrutiert TRIM28 in der Folge einen Histon Deacetylasekomplex (NuRD), eine H3-K9-Methyltransferase (ESET) und das Heterochromatin assoziierte Protein 1 (HP1), welche zum transkriptionellen *Silencing* und letztlich zur Ausbildung von Heterochromatin führen [196, 197] (siehe Abb. 4.2).

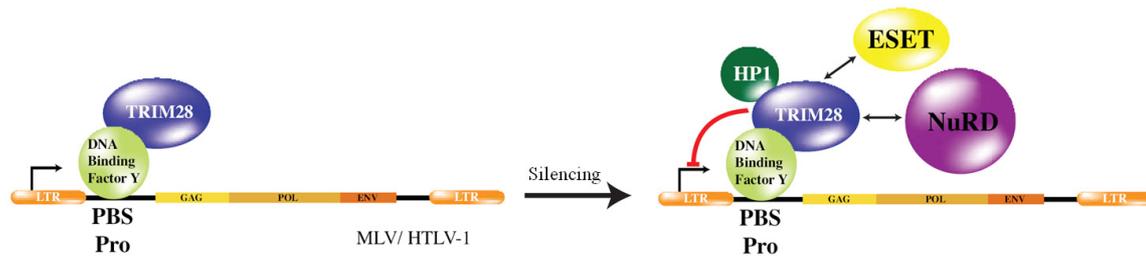


Abb. 4.2 TRIM28 vermittelte Repression proviraler Transkription. Die provirale PBS (*primer binding site*) für Prolin wird durch das sequenzspezifische KRAB (*Krüppel associated box*) Zinkfinger-Protein ZFP809 (hier *DNA binding factor Y* benannt) erkannt und rekrutiert dann TRIM28 (linke Seite) [195]. TRIM28 bindet in der Folge NuRD (Histon Deacetylase Komplex), ESET (H3 K9 Methyltransferase) und HP1 (*heterochromatin-associated protein 1*), welche zum transkriptionellen *Silencing* des Provirus und der Ausbildung des Heterochromatins führen (rechte Seite). (Abb modifiziert nach [194])

Der auffällige Verlust der Superoxidproduktion genkorrigierter Zellen beider X-CGD-Patienten im Verlauf der Gentherapiebehandlung konnte zu Beginn der vorliegenden Arbeit mit einer Reduktion der GP91^{phox}-Transgenexpression korreliert werden (siehe Abb. 3.12). Neben einer generellen Reduktion der Menge der Transgenexpression, gab es vermutlich noch ein untergeordnetes Phänomen des alternativen Spleißings, welches nicht zu funktionellem GP91^{phox}-Protein in den Patientenzellen geführt hatte. Anhand spezifischer RT-PCR-Analysen FACS sortierter GP91^{phox}-Protein exprimierender bzw. nicht exprimierender Patientenzellen konnte deutlich gezeigt werden, dass in der GP91^{phox}-negativen Fraktion untypische Spleißtranskripte nachzuweisen waren, die korrekt gespleißte Variante jedoch nur in der GP91^{phox}-positiven Fraktion vorhanden war (siehe Abb. 3.11).

Nachfolgende CpG-Methylierungsanalysen zur Aufklärung der Ursache für die Reduktion der Gesamt-Transgenexpression, ließen eine klare Zunahme der Promotor-Methylierung im Therapieverlauf erkennen (siehe Abb. 3.14). Durch weiterführende klonale Methylierungsanalysen an Patientenzellen aus dem Knochenmark wurde eine Übereinstimmung zwischen der Promotor-CpG-Methylierung und der Abwesenheit der Superoxidproduktion nachgewiesen (siehe Abb. 3.16). Das Maß der Promotor-CpG-Methylierung spiegelte somit die transkriptionelle Aktivität und die davon abhängige Superoxidproduktion eingesetzter Genfähren in den Patientenzellen wieder. Unter dieser Voraussetzung konnte in weiterführenden klonenspezifischen Methylierungsanalysen der Beitrag zum therapeutischen Nutzen einzelner Klone über den Therapieverlauf nachgewiesen werden. Die dominanten Klone A08 G11 (*Mds1*), A08 (*Prkra*), A09 (*Mds1*) von P1 und F02 (*Mds1*), A02 (*Mds1*), B06 (*Glis1*) von P2 waren abgesehen von A08 an

allen analysierten Zeitpunkten im SFFV-Promotorbereich nahezu vollständig methyliert (siehe Abb. 3.17, Abb. 3.19, Abb. 3.21, Abb. 3.22). Über die Zunahme des Anteils dieser nicht superoxidproduzierender Klone in der gesamten hämatopoetischen Population (siehe Abb. 3.1), konnte die Abnahme des therapeutischen Nutzens über den Therapieverlauf erklärt werden. Im Gegensatz hierzu hat wahrscheinlich der nicht methylierte *Prkra*-Klon (A08) in der Anfangszeit der Therapie den größten Anteil der Superoxidproduktion bei P1 ausgemacht. Die Expansion dieser dominanten Klone wurde großteils durch die transaktivierenden Eigenschaften des proviralen SFFV-Enhancers verursacht, welche an keinem Zeitpunkt methyliert wurden (siehe Abb. 3.14). Da aus Methylierungs-Experimenten in dem P19 *in vitro Silencing*-System im Rahmen dieser Arbeit bekannt ist, dass die CpGs im SFFV-Enhancer allgemein methylierbar sind (siehe Abb. 3.29 und Abb. 3.30), könnte ein positiver Selektionsdruck auf die Proliferation die Ursache für die Erhaltung der Enhancer-Eigenschaften in den Patientenzellen gewesen sein.

Der mangelnde Selektionsdruck GP91^{phox}-genkorrigierter Zellen für eine anhaltende Transgenexpression bei CGD stellt eine Hürde für gentherapeutische Anwendungen dar. Immundefekte die über einen Differenzierungsblock nicht-korrigierter bzw. nicht-exprimierender Zellen charakterisiert sind, profitieren von dem *in vivo* Selektionsvorteil funktionell-genmodifizierter Zellen. Ein Beispiel hierfür ist SCID-X11. Hier entstehen T-Zellen nur wenn sie das Transgen korrekt exprimieren, dagegen entstehen T-Zellen nicht wenn Transgen nicht exprimiert wird. Interessanterweise wurden nach Bekanntwerden des *Silencing*-Phänomens in der Frankfurter X-CGD-Studie bei der erfolgreichen ADA-SCID-Studie in London (UCL) bis zu 40% methylierter SFFV-Promotor-Sequenzen trotz positivem Selektionsdruck in Patientenzellen nachgewiesen (pers. Mitteilung A. Thrasher). Die generelle Entgiftung der Patienten nach Gentherapiebehandlung ähnlich einem *Bystander*-Effekt, könnte hier das Überleben nicht-exprimierender Zellklone mit methylierter SFFV-LTR ermöglicht haben.

Die Aufhebung der epigenetischen Repression der proviralen Transkription kann durch Applikation von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und HDAC-Inhibitoren erreicht werden [158]. Ein Teilerfolg der Demethylierung zuvor vollständig methylierter proviraler Promotor-Sequenzen aus Knochenmark-Kolonien eines X-CGD-Patienten konnte in dieser Arbeit *in vitro* demonstriert werden (bis zu 30% nicht methylierte SFFV-Promotor-CpGs, siehe Abb. 3.27). Eine *in vivo* Anwendung im Falle einer Reprimierung der Transgen-expression ist somit in Zukunft durchaus denkbar. Demethylierende Agenzien und HDAC-Inhibitoren werden für die Behandlung von MDS-Patienten ohne Option auf

eine allogene KM-Transplantation bereits in klinischen Phase III Studien mit signifikantem Erfolg getestet [198, 199]. Daher wäre eine Anwendung im Rahmen einer Gentherapie bei entsprechender Indikation möglich.

Der Einfluss endogener DNA-Methylierungsmuster auf die Transgenexpression γ -retroviraler Vektoren ist aufgrund der Integrationspräferenz in der Nähe von CpG-Inseln grundsätzlich vorhanden [106]. Das endogene epigenetische Methylierungsmuster wird sehr wahrscheinlich auf eingebrachte provirale Sequenzen in der Nachbarschaft ausgeweitet (siehe Abb. 3.23). Daher ist für die angestrebte stabile Langzeitexpression in einer Gentherapie die Verwendung methylierungs- bzw. *silencing*-resistenter Promotoren sinnvoll. Eine gute Möglichkeit ist der Einsatz zellulärer Promotoren wie z.B. cFES (siehe Abb. 3.31) und/oder Chromatin öffnende Elemente wie z.B. das UCOE-Element (siehe Abb. 3.33). Zudem kann durch die Verwendung lentiviraler Vektoren die Insertion in der Nähe von CpG-Inseln stark reduziert werden, wodurch eine potentielle *Silencing*-Gefahr reduziert werden könnte. Lentivirale Vektoren zeigen keine Präferenz für CpG-Inseln, welche meist in der 5'UTR bzw. der 3'UTR eines Genes lokalisiert sind, dagegen integrieren sie bevorzugt in aktive Genbereiche an sich [108]. Die Kombination aus stabiler Transgenexpression mit sehr hohem Sicherheitsprofil werden die grundlegenden Charakteristika zukünftiger Gentherapiefahren sein (siehe 4.3).

4.2 Insertionsmutagenese und klonale Dominanz

Die ungerichtete Gensatztherapie ist *per se* ein mutagener Eingriff in das Genom von Patientenzellen. Durch den Einbau therapeutischer Moleküle in proviraler Form findet eine Veränderung der Basenabfolge am Insertionsort statt. Die resultierenden Folgen für die jeweiligen Zellen können sehr vielfältig sein. Im besten Fall hat die provirale Insertion an einem genleeren Ort stattgefunden, so dass der Nutzen der therapeutischen Transgenexpression keine Deregulation endogener Genloci mit sich bringt. Findet die provirale Integration dagegen in oder in der Nähe eines Gens statt, so kann es zu Wechselwirkungen zwischen den proviralen Steuerelementen der Transgenexpression (wie z.B. Promotoren oder Enhancern) mit den endogenen Steuerelementen sowie transgener und endogener Transkripte (Antisense-Effekt) an sich kommen. Hieraus kann sowohl eine Reduzierung oder Abschaltung als auch eine zusätzliche Förderung durch Aktivierung endogener Transkripte entstehen.

Die Abschaltung endogener Transkripte birgt in der Regel weniger hohe Risiken für das weitere Schicksal transduzierter Zellen im Patientenorganismus. Im Fall des Verlustes eines rezessiven Tumorsuppressorgens kann das zweite Allel die Funktion meist kompensieren. Eine Ausnahme bildet hier der Verlust des zweiten Allels (LOH). Bei trunkierten Transkripten oder Fusionstranskripten ist es ebenso möglich, dass negative regulatorische Bereiche fehlen und es somit zu einem Funktionsgewinn auf Proteinebene kommt (*gain of function mutation*). Dieses Phänomen ist jedoch eher selten und erstmals in einer Gentherapiestudie zur Behandlung von β -Thalassämie um die Gruppe von Philippe Leboulch für das Onkogen *Hmg2a* diskutiert worden (pers. Mitteilung P. Leboulch, ESGCT 2009).

Deutlich häufiger und auch schwerwiegender sind die Folgen einer insertionellen Aktivierung von Onkogenen. Dies konnte für die ersten Generationen LTR-getriebener γ -retroviraler Vektoren *in vitro* und *in vivo* in murinen sowie humanen Zellen gezeigt werden [129, 145, 149, 200-203]. Die Folgen dieser Insertionsmutagenese haben bei der ersten erfolgreichen Behandlung von SCID-X1 mit Gentherapie in der französischen Studie am Necker Hospital für großes Aufsehen sowohl in der wissenschaftlichen als auch in der öffentlichen Wahrnehmung geführt. Die verwendeten Genfähren hatten zu der Aktivierung des *Lmo-2*-Onkogens in mehreren Patienten geführt, welche in der Folge T-Zell-Leukämien entwickelten [60, 113]. Mit einer Ausnahme konnten alle Leukämien durch nachfolgende SZT erfolgreich behandelt werden und diese Patienten somit geheilt werden.

Der Einsatz stabil integrierender Nukleinsäuren bei Patienten für therapeutische Zwecke verlangt nach einem sehr guten Verständnis des Insertionsvorganges an sich. Die provirale Insertion retroviraler Genfähren erfolgt nicht nach dem Zufallsprinzip. Obwohl keine allgemeinen Konsensus-Motive für provirale Insertionsorte nachgewiesen werden konnten, gibt es dennoch bestimmte Präferenzen im Genom. So findet man γ -retrovirale Vektoren bevorzugt in einem Fenster von +/- 5 kb um den TSS von Genen und lentivirale Vektoren eher in aktive Gene an sich (siehe 1.3.3.2). Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Verwendung dieser Vektorsysteme einen Genlokus potentiell dereguliert wird höher, als die früher angenommene zufällige Wahrscheinlichkeit der Integration im Genom. Dieses Wissen konnte erst durch aufwendige Integrationsanalysen entstehen. Die Amplifikation spezifischer Insertionsorte wird mit LM- bzw. LAM-PCR-Analysen ermöglicht. Mit Hilfe der heutigen Hochdurchsatz-Sequenzierungen (454 Technik) können daraus statistisch sinnvolle Auswertungen erfolgen [204-206]. Dieses sehr komplexe Verfahren der Bestimmung proviraler Integrationen wurde erst kürzlich in der

Gruppe um Manfred Schmidt noch weiter verfeinert, da mit der sog. NR-LAM-PCR mittlerweile eine Methode zur Verfügung steht, welche keine technische Limitierung aufgrund der Verteilung von Restriktions-schnittstellen im Genom mit sich bringt [207]. Dies wird quantitative und vergleichbare Erhebungen zum Monitoring transduzierter Zellpopulationen in zukünftigen klinischen Studien ermöglichen.

Die Frage der klonalen Verteilung transduzierter Klone in der Frankfurter Gentherapie-studie zur Behandlung von X-CGD wurde mit dem Vorwissen der SCID-X1-Studie sehr genau untersucht. Integrationsanalysen mittels LAM-PCR von der Gruppe um Christof von Kalle und Manfred Schmidt in Heidelberg, konnten eine Korrelation zwischen der beobachteten Zunahme transduzierter Zellen im peripheren Blut der Patientenzellen (siehe Abb. 1.11) mit einer Zunahme der Häufigkeit von Insertionen an drei proliferationsfördernden Genloci feststellen. Die insertionelle Aktivierung von drei Proto-Onkogenen (*Mds1-Evi1*, *Setbp1* und *Prdm16*) konnte in RT-PCR-Untersuchungen in Proben aus dem peripheren Blut von P1 bzw. P2 nachgewiesen werden [59]. Der *Mds1-Evi1*-Genlocus hat sich über den gesamten Therapiezeitraum als wichtigster von oben genannten drei Genen herausgestellt. Klone mit Insertionen in den anderen beiden Genloci machten zeitweise einen hohen Anteil aus, waren zuletzt jedoch nicht mehr nachweisbar. Sowohl bei P1 als auch bei P2 setzten sich dominante Klone mit Insertionen in *Mds1-Evi1* durch (siehe Abb. 3.1). Dieser Genlocus ist einer der häufigsten Treffer proviraler Integrationen *in vitro* und *in vivo*, welche in der Folge die Hämatopoese dominieren [129]. Da dieser komplexe Genlocus hauptsächlich für zwei verschiedene Genprodukte kodiert, zum einen das Proto-Onkogen *Evi1* und zum anderen den negativen Regulator der Tumorgenese *Mds1-Evi1* (siehe Abb. 3.2), war zu Beginn dieser Arbeit die entscheidende Fragestellung, welches dieser beiden Transkripte aktiviert wurde. In vorhergehenden Untersuchungen wurden bei RT-PCR-Untersuchungen Primer-Paare zur Detektion von Transkripten verwendet, welche nicht in der Lage waren EVI1 als alleiniges Transkript nachzuweisen. Dies war erst nach Identifizierung der in den Patientenzellen exprimierten EVI1-Spleißvariante durch 5'RACE-Untersuchungen in Rahmen dieser Arbeit möglich. Von den drei alternativen ersten Exons konnte Exon 1b als überexprimierte Form in Zellen beider Patienten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.2 und Daten hier nicht gezeigt). Die spezifische Überexpression von EVI1- bzw. MDS1-EVI1-Fusionstranskripten in Proben aus peripherem Blut beider Patienten war etwa ein Jahr nach Therapiebeginn erstmals nachweisbar (siehe Abb. 3.3). Ebenso konnte in Kolonien dominanter Klone (F02, A02 und B06) aus dem Knochenmark des zweiten Patienten die Überexpression von EVI1

bzw. MDS1-EVI1 eindeutig gezeigt werden (siehe Abb. 3.5). Der Proliferationsvorteil individueller dominanter Klone stand daher im direkten Zusammenhang mit der proviralen Aktivierung des *Mds1-Evi1*-Genlokus. Quantitative Analysen zeigten weiterhin, dass sich bei dem ersten Patienten ein Klon (G11) mit mindestens 100-fach höherer EVI1-Expression im Vergleich zu der MDS1-EVI1-Expression durchgesetzte hatte [132]. Das hohe Maß der EVI1-Expression in den Patientenzellen korrelierte dementsprechend mit der klonalen Fitness einzelner Klone und zeigt die bedeutende Rolle dieses Genproduktes der Hämatopoese.

Evi1 ist ein Protoonkogen, welches erstmals 1988 im AKXD Mausmodell mit myeloischen Leukämien identifiziert wurde [208]. Im humanen Genom wurde *Evi1* auf dem Chromosom 3q26 lokalisiert. Die Überexpression von *Evi1* kann durch Inversion dieses Lokus (*inv(3)(q21q26)*) entstehen und die Ursache für die Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie (AML) oder eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) sein [209]. Die Überexpression von *Evi1* kann nach Inversion durch transkriptionelle Steuerung von dem Ribophorin-1-Promotor entstehen [210]. In anderen Fällen wurde die *Evi1*-Überexpression in AML Patienten auch ohne 3q26 Inversion nachgewiesen. In allen Fällen einer transkriptionellen Hochregulierung von *Evi1* besteht jedoch eine Korrelation mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf und dient daher als prognostischer Marker [211, 212].

EVI1 ist ein komplexer Transkriptionsfaktor, der über seine verschiedenen funktionellen Domänen mit zahlreichen Co-Aktivatoren und Co-Repressoren interagieren kann (siehe Abb. 4.3). Der Zellzyklus wird zelllinienabhängig von EVI1 gesteuert. In Überexpressionsstudien an Fibroblasten aus Ratten konnte eine verkürzte G1-Phase mit Zyklin A, Zyklin E und Cdk2 Hochregulierung, RB Hyperphosphorylierung und p27 (Zellzyklus Inhibitor) Herunterregulierung beobachtet werden [213]. Erhöhte Proliferationsraten konnten ebenso nach EVI1-Überexpression in murinen myeloischen 32D-Zellen sowie murinen embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden [214, 215]. Im Gegensatz hierzu konnte keine Aktivierung der Zellproliferation nach EVI1-Überexpression in humanen erythroleukämischen Zellen festgestellt werden. Im Kontrast zu den Studien in Fibroblasten aus Ratten konnte hier eine Absenkung von Zyklin A und der Cdk2 Aktivität nach 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) - Gabe gezeigt werden. Nach TPA-Gabe stoppt in diesen Zellen normalerweise die Proliferation und ein alternativer Zellzyklus führt zur Ausbildung polyploider Zellen der megakaryozytären Linie über den Endomitoseweg [216]. Dieses zelltypspezifische Verhalten könnte durch die Interaktion von EVI1 mit der ATP-abhängigen Helikase

BRG1 (auch SMARCA4) erklärt werden. BRG1 gehört zu der Familie der SWI/SNF-Proteine und ist an der transkriptionellen Regulierung einiger Zielgene wie z.B. *E2f1* und *Zyclin A* nach Assoziation mit phosphoryliertem RB durch Chromatin-Remodulierung verantwortlich [129]. In Zellen die BRG1 nicht exprimieren (z.B. SW13), konnte konsistenter Weise keine Erhöhung der Proliferation durch eine EVI1-Überexpression beobachtet werden. Nach exogener BRG1-Expression war dies wieder der Fall [217].

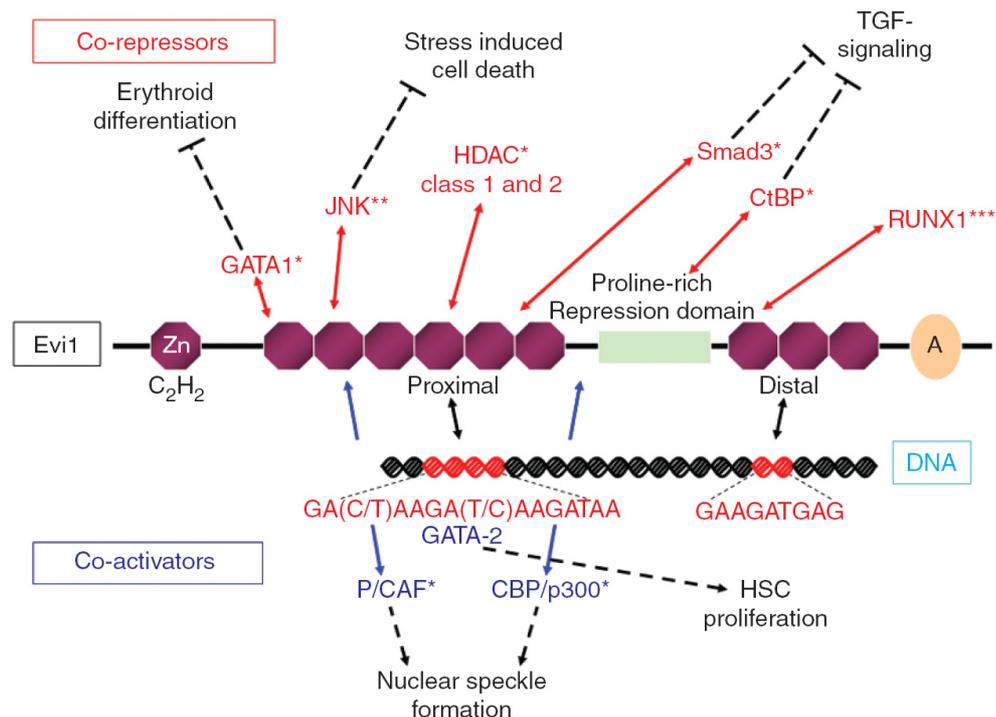


Abb. 4.3 Übersicht der Interaktionen von EVI1. EVI1 ist ein komplexer Transkriptionsfaktor, der über 7 Zinkfinger am proximalen N-Terminus und 3 Zinkfinger-DNA-Bindedomänen vom Typ C_2H_2 am distalen C-Terminus verfügt. Zwischen diesen Zinkfingern gibt es eine prolinreiche Repressionsdomäne (grüner Bereich) und eine saure Domäne am C-terminalen Ende (A: acidic). Über die Zinkfinger-Domänen interagiert EVI1 mit Co-Aktivatoren wie GATA-2, P/CAF und CBP/p300, welche zur Proliferation von HSC bzw. zur *nuclear Speckle*-Bildung beitragen. Ebenso interagiert EVI1 mit zahlreichen Co-Repressoren wie Gata1, JNK, HDAC (Klasse I und II), Smad3, CtBP und Runx1, welche ihre hemmende Funktion in der erythroiden Differenzierung, dem Stress induzierten Zelltod, dem Chromatin-Remodelling und der TGF- β Signaltransduktion haben. (*) Interaktionen durch Überexpression in Fibroblasten nachgewiesen. (**) Interaktion von endogenem Protein in Epithelzellen nachgewiesen. (***) Interaktion von endogenem Protein in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen. *Evi1*: *Ecotropic viral integration site 1*; Gata 1 und 2: GATA 1 und 2 bindendes Protein; JNK: c-Jun N-terminale Kinase; HDAC: Histondeacetylasen; Smad3: *Mothers against decapentaplegic homolog 3*; CtBP: *C-terminal-binding protein 1*; P/CAF: P300/CBP-associated factor; CBP/p300: CREB binding protein/p300; RUNX1: *runt-related transcription factor*. [129]

Einen weiteren wichtigen Effekt hat EVI1 auf die Signaltransduktion vom *transforming growth factor-β* (TGF-β). In den meisten Zelltypen wie z.B. in hämatopoetischen Zellen und Vorläuferzellen reguliert TGF-β den Wachstumsarrest und die Apoptoserate [218]. EVI1 hebt den Effekt von TGF-β durch Wechselwirkung mit Smad3 auf [219]. Ebenso interagiert EVI1 über die Repressionsdomäne mit dem Co-Repressor CtBP (*C-terminal binding protein*) und verhindert mit diesem alternativen Signalweg die apoptotische Wirkung von TGF-β (siehe Abb. 4.3) [220]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei dem MDS1-EVI1-Fusionsprotein durch die zusätzliche PR-Domäne die Interaktion mit CtBP verhindert wird, die mit Smad3 jedoch unbeeinflusst bleibt, wodurch in der Summe der TGF-β-Signaltransduktionsweg weniger gehemmt wird [221]. Da TGF-β bei der Limitierung der Proliferation und somit der Erhaltung von primitiven HSZ beteiligt zu sein scheint [222], könnte dieser Signalweg bei der *in vitro* sowie der *in vivo* Expansion transduzierter HSZ mit resultierender klonaler Dominanz bei der Gentherapiestudie für X-CGD eine entscheidende Rolle gespielt haben.

Die Wirkung von EVI1 auf die Regulation der Hämatopoese erfolgt auch über Aktivierung von GATA-2 durch Bindung an dessen Promotor. Der Transkriptionsfaktor GATA-2 stellt einen wichtigen Regulator für die Proliferation und Erhaltung von HSZ dar. Interessanterweise stimmen die Defekte in der Hämatopoese von *Gata* *-/-* und *Evi1* *-/-* Knockout-Mäusen stark überein. In beiden Modellsystemen wurde eine starke Veränderung der Zellzahlen, der Expansion und der Repopulierungskapazität embryonaler HSZ festgestellt. Durch exogene Expression von GATA-2 in *Evi1* *-/-* P-SP-Zellen konnte der Defekt in der Proliferation *in vitro* jedoch wieder aufgehoben werden [129]. Somit ist ein Teil der Auswirkungen in *Evi1* *-/-* Zellen auf den GATA-2-Signaltransduktionsweg zurückzuführen. Der beschriebene Effekt von EVI1 auf die Erythropoese kann durch den Einfluss auf den für die Erythropoese essentiellen Transkriptionsfaktor GATA-1 erklärt werden. Indem EVI1 um die DNA-Bindestellen des GATA-1-Promotors kompetiert wird dessen Aktivität reduziert [223].

Zusätzlich ist EVI1 in Lage den stressinduzierten Zelltod über die Hemmung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) zu verhindern [224]. Die EVI1 vermittelte Steigerung der Expression von c-Jun und c-fos führt zu der Aktivierung von AP-1 und auch zum Differenzierungsblock myeloischer Zellen in Richtung der Granulozyten [225, 226].

Die enorm wichtige Rolle von EVI1 in der Entwicklung von Säugetieren wurde durch Knockout-Studien in der Maus deutlich. Homozygote *Evi1* *-/-* Embryos sterben bereits an Tag E10.5 nach der Befruchtung im Uterus. Die Defekte betreffen die Somiten sowie

zahlreiche Organe wie Herz, Niere, Leber, Lunge und das Gehirn durch Hypozellularität, Hämorrhagie und Defekten im paraxialen Mesenchym [227]. Konsistent hierzu wird EVI1 vor allem bei der Entwicklung exprimiert und wurde im murinen Modell in vielen Organen und HSZ nachgewiesen [228]. Überexpression des *Evi1*-Onkogens in primären murinen KM-Zellen durch aktivierende Insertionsmutagenese replikations-inkompetenter γ -Retroviren mit Markergenen brachten immortalisierte myeloische Zelllinien schon innerhalb von 3-4 Wochen *ex vivo* Kultivierung hervor. Nach Transplantation in Empfängermäuse entstanden jedoch keine Leukämien. Die forcierte Überexpression von EVI1 in dem gleichen System durch γ -retrovirale Konstrukte, mit *Evi1*-Expressions-kassette, erhöhte die Frequenz immortalisierter myeloischer Zellklone [109]. Dies zeigt, dass eine hohe Expressionsrate von EVI1 notwendig aber auch ausreichend für den myeloischen Immortalisierungsprozess ist. In einer weiteren Studie mit SIN- γ -Retroviren konnte zudem gezeigt werden, dass einzelne Insertionen in *Evi1* nach seriellen Transplantationen zur Leukämogenese führen [149]. Diese Untersuchungen untermauern das hochgradig transformierende Potential von EVI1, welches jedoch erst durch zusätzliche Mutationen in der Maus zur Leukämie führt.

Ähnliche Studien zur Evaluierung der Genotoxizität von MLV-Vektoren im Rhesus Makaken Tiermodell zeigten eine deutliche Überrepräsentierung des *Mds1-Evi1*-Genlokus. Die Analyse von 702 proviralen Integrationen mit einem G1Na-Vektorsystem nach Transplantation transduzierter autologer CD34⁺ Zellen ergab insgesamt 14 Integrationen im ersten und zweiten Exon des *Mds1*-Gens. Die Autoren kamen zu der Hypothese, dass die Aktivierung des *Mds1-Evi1*-Genlokus die Selbsterneuerung und das Anwachsen der CD34⁺ Zellen beeinflusst. Das Blutbild aller Primaten war in dieser Studie über den gesamten Beobachtungszeitraum von 7 Jahren normal geblieben und somit auch keine Leukämie aufgetreten [229]. Interessanterweise konnte in derselben Studie in Rhesus Makaken mit SIV-Vektoren keine Anreicherung von Insertionen im *Mds1*-Genlokus gezeigt werden, jedoch zu einem geringen Maße in anderen Genloci [230].

Im humanen System ist EVI1 in CD34⁺ Vorläuferzellen jedoch nicht in CD34⁻ Zellen exprimiert [231]. Die hochregulierte EVI1-Expression wurde jedoch häufig in leukämischen Zellen, wie bei einem MDS oder einer AML beobachtet [212, 232-234]. Die insertionelle Aktivierung von *Evi1* mit klonaler Dominanz und resultierender MDS bei zwei X-CGD-Patienten nach Gentherapiebehandlung ist erstmals in der Frankfurter Studie aufgetreten [59]. Bei einem MDS liegen häufig neben Neuarrangements des 3q26 *Evi1*-Genlokus zusätzliche chromosomale Aberrationen wie z.B. eine Monosomie des

Chromosoms 5 oder 7 vor [235-237]. Der direkte Zusammenhang zwischen einer EVI1-Überexpression und chromosomalen Aberrationen ist bisher aus keiner Studie bekannt. Ebenso war bisher unklar, welches dieser Phänomene zuerst auftritt und möglicherweise das andere in der Folge verursacht. Die engmaschige Überwachung der Zellen in den X-CGD-Patienten nach Gentherapie zeigte in den ersten Monaten neben einem normalen Karyotyp keine Veränderungen in der Morphologie der Knochenmarkzellen und keine Abweichungen in der Anzahl der Blutzellen. Der Anstieg genmarkierter Zellen konnte jedoch schon nach etwa 5 Monaten beobachtet werden [59]. Somit führte in den X-CGD-Patienten höchst wahrscheinlich zunächst die *Evi1*-Aktivierung zur klonalen Dominanz. Das zusätzliche Ereignis des Verlustes des Chromosoms 7 (Monosomie 7) ab Monat 21 bei P1 und ab Monat 33 bei P2 hat möglicherweise einzelnen *Evi1* überexprimierenden Klonen im Verlauf der Therapie einen zusätzlichen Proliferationsvorteil verschafft [132]. Der Link zwischen der *Evi1*-Aktivierung und der Monosomie 7 könnte über die Chromatin-Organisation in den Patientenzellen erfolgt sein. EVI1 interagiert mit Proteinen wie G9a (H3K9-spezifischer Histon Methyltransferase-Hemmer) und SUV39H1 (Histon Methyltransferase), welche bei der Anordnung des Chromatins beteiligt sind. Somit könnte die normale Zentrosomen-Replikation, die Chromatin-Anordnung und die genomische Stabilität durch EVI1-Überexpression gestört worden sein [238-240]. Die korrekte Chromosomen-Segregation während der Mitose wird durch Spindelpole der Zentrosome gesteuert [241]. Eine Vermehrung der Zentrosomen kann zur genomischen Instabilität führen, welche häufig bei einem MDS oder einer AML auftreten [242]. In Proben beider X-CGD-Patienten konnte durch γ -H2AX Foci-Färbung eine 12- bzw. 8-fach erhöhte Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen 27 bzw. 33 Monate nach Therapiebeginn nachgewiesen werden [132]. Somit ist es möglich, dass die erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen zu einer erhöhten Anzahl an Zentromeren geführt hat. Die Entstehung vom MDS in beiden X-CGD-Patienten könnte zunächst durch die Aktivierung von *Evi1* begünstigt und später durch eine EVI1 induzierte genomische Instabilität zur Ausprägung einer Monosomie 7 geführt haben.

Bisher ist nicht bekannt welches der auf Chromosom 7 lokalisierten Tumorsuppressorgene bei der Entstehung von MDS oder AML beteiligt ist. Interessanterweise konnte das *Mll5*-Gen (*mixed-lineage leukemia 5 gene*) kürzlich dem Chr. 7q22 zugeordnet werden. Es ist ein Trithorax-Homolog mit einer zentralen Rolle in der adulten Hämatopoese, einer vermuteten Rolle in der Chromatin-Organisation und in der Regulation der Zellteilung [243-246]. Denkbar wäre ein regulierender Einfluss dieses *Mll5*-Gens auf die Erhöhung

der EVI1-Transkription nach Haploinsuffizienz durch die Monosomie 7 in den X-CGD-Patienten.

Eine Rolle vom Transgen *GP91^{phox}* bei der klonalen Dominanz und der Monosomie 7 in der X-CGD-Studie ist sehr unwahrscheinlich. *GP91^{phox}*-Expression ist weder notwendig für das Überleben von Zellen, noch ist ein proliferationsfördernder Effekt bislang beschrieben worden. Zudem hat mit zunehmender klonaler Dominanz in der X-CGD-Studie die Transgenexpression durch epigenetisches *Silencing* (siehe 3.2.4) stark abgenommen. In dominanten Klonen G11 und F02 mit Monosomie 7 konnte eine vollständige Abschaltung des Promotors in der LTR durch CpG-Methylierung schon 1 bzw. 5 Monate nach Gentherapiebeginn nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.17 und Abb. 3.21). Die proliferationsfördernden Effekte und die chromosomalen Aberrationen waren eher eine Folge LTR-vermittelter Aktivierung des *Evi1*-Genlokus, als der *GP91^{phox}*-Transgenexpression.

Ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von *Evi1* und daraus resultierenden zellulären Veränderungen mit der CpG-Methylierung der proviralen Promotoren wären in der X-CGD-Studie grundsätzlich denkbar gewesen. Dies würde EVI1 eine reprimierende Wirkung spezifisch für den SFFV-Promotor jedoch nicht für den Enhancer, welcher zu keinem Zeitpunkt in den Patientenzellen methyliert war, zu sprechen. Für die Aufklärung dieser Zusammenhänge wurde der Methylierungsstatus von *Mds1-Evi1*- und nicht *Mds1-Evi1*-Integrationen in Patientenzellen untersucht. Insgesamt konnte keine Korrelation zwischen der Überexpression von EVI1 mit dem Methylierungsstatus der proviralen LTR hergestellt werden. Das prominenteste Beispiel hierfür ist der dominante Klon der ersten 18 Monaten nach Therapiebeginn von P1 in. Dieser Klon hatte zwei Integrationen, eine in *Mds1* (A09) und eine stromabwärts von *Prkra* (A08). Eine ausgeprägte Promotor-Hypermethylierung des *Mds1*-Klons A09 konnte an allen drei untersuchten Zeitpunkten (Tag 157, Tag 304 und Tag 416) nachgewiesen werden. Dagegen war die LTR am *Prkra*-Genlokus an allen untersuchten Zeitpunkten nahezu vollständig hypomethyliert (siehe Abb. 3.22). Umgekehrt gab es ebenso *Mds1-Evi1*-Klone (H03 und 079) welche keine CpG-Methylierung in der LTR aufwiesen (siehe Abb. 3.19) und nicht *Mds1*-Klone wie B06 (*Glis1*) oder A02 (*Prkce*) welche methyliert vorgefunden wurden (siehe Abb. 3.19 und Abb. 3.23). Insgesamt bestand also keine Korrelation zwischen der EVI1-Überexpression mit der proviralen Promotor-CpG-Methylierung. Die Ursache der SFFV-Methylierung ist eher in der epigenetischen Organisation von benachbarten endogenen Sequenzen zum Insertionsort begründet (siehe Abb. 3.23).

Aufgrund der *severe adverse events* (SAE) in der klinischen X-CGD Gentherapiestudie mit dem SF71^{phox}-Vektor wurde dieses Protokoll Anfang 2010 für weitere Behandlungen gestoppt. Mit Hilfe der detaillierten molekularen Analysen der Patientenzellen konnte die Ursache für die SAE auf den eingesetzten Vektor zurückgeführt werden. Obwohl dieses Protokoll erstmals einen klinischen Therapieerfolg für die Behandlung von X-CGD-Patienten gezeigt hatte sind die Nebenwirkungen bislang sehr schwerwiegend. Für zukünftige Studien werden aktuell sicherheitsverbesserte Vektoren intensiv in präklinischen Maus-Transplantations-Versuchen evaluiert. Diese werden aller Voraussicht nach deutlich verbesserte Vektoren hervorbringen und das enorme Potential einer Gentherapie-Anwendung bestätigen.

4.3 Ausblick

Die effiziente Rekonstitution der Funktion defekter Gene ist das primäre Ziel einer Gensatztherapie und konnte in der Anfangszeit der Frankfurter Studie zur Behandlung von X-CGD erstmals erfolgreich gezeigt werden. Der Fokus zukünftiger Studien liegt auf der Vermeidung von Nebenwirkungen durch eine Insertionsmutagenese. Zudem ist eine stabile Transgenexpression Grundvoraussetzung für den angestrebten Langzeittherapie-Effekt. Hierzu sind eine Reihe sicherheitsverbesserter Vektoren *in vitro* und *in vivo* mit vielversprechenden Ergebnissen bereits getestet worden.

Der erste Schritt zur Vermeidung transaktivierender Elemente ist die sog. SIN (*self inactivating*) -Konfiguration eingesetzter Vektoren, durch Deletion von Promotor- bzw. Enhancer-Elementen in der U3 Region der LTR [247]. Ersetzt wird die Steuerung der Transgenexpression von internen, nach Möglichkeit zellspezifischen Promotoren. Diese sollten eine physiologische Expression therapeutischer Proteine, im besten Fall begrenzt auf die erforderliche Zellpopulation ermöglichen. Da die Leukämogenese auf Stammzell-Ebene beginnt [248-250], sollte ein in diesen Zellen transkriptionell inaktives Vektorsystem keine aktivierenden Ereignisse bedingen und somit ein gutes Sicherheitsprofil mit sich bringen.

Die Verwendung lentiviraler Vektoren für eine Gentherapie ist sehr vielversprechend, da in Mausversuchen eine Verringerung des genotoxischen Potentials um etwa eine log-Stufe im Vergleich zu γ -retroviralen Vektorsystemen aufgrund des unterschiedlichen Insertionsprofils gezeigt werden konnte [251, 252]. Auch wäre die Nutzung γ -retroviraler Vektorsysteme ohne eigene Promotoren, sog. Gene-Trap-Vektoren, denkbar. Diese

Vektoren nutzen die Transkription endogener Promotoren über einen Spleiß-Akzeptor vor der proviralen Expressionskassette [253]. Eine insertionelle Aktivierung von Onkogenen wäre in diesem Kontext unwahrscheinlich und somit ebenso eine gute Verbesserung der Sicherheitsproblematik in der angewandten Gentherapie. Der Einsatz von ASLV-Vektoren ist auch sehr vielversprechend, da sie nur eine sehr geringe Präferenz für aktiv transkribierte Genbereiche aufweisen [106, 254]. Darüber hinaus integrieren nicht alle für die Gentherapie nutzbare Systeme in genreiche Sequenzen, z.B. bevorzugt das Sleeping Beauty Transposon sog. AT-Repeats, welche meist in Genleeren Bereichen zu finden sind und somit eine weitere Alternative darstellen könnten [255]. Es besteht auch die Möglichkeit der zielgerichteten Genreparatur mit Hilfe von homologer Rekombination sowie unter Verwendung von Zinkfinger-Nukleasen [256, 257]. Der große Vorteil dieser Form der Gentherapie liegt in der weitestgehend gerichteten Integration der Nukleinsäuren im Genom der Patientenzellen. Allerdings konnten sogenannte „off Target“ Integrationen der Zinkfinger-Nukleasen bisher nicht vollständig ausgeschlossen werden [258]. Hierdurch könnten unerwünschte Nebeneffekte durch Insertionsmutagenese stark reduziert, jedoch noch nicht vollständig ausgeschlossen werden [259]. Limitierend für den Einsatz von homologer Rekombination und Zinkfinger-Nukleasen in klinischen Studien ist bislang die zu geringe Effizienz dieser Reparaturmechanismen. Ebenso ist der Einsatz dieser Gentherapieform nicht für alle Gendefekte möglich. Beispielsweise treten bei X-CGD-Patienten Mutationen in sehr heterogenen Bereichen des *GP91^{phox}*-Gens auf, so dass eine mögliche Reparatur auf jeden Patienten individuell angepasst und somit sehr aufwendig würde.

Neben der Wahl verschiedener Genfähren ist die Modifikation vorhandener Systeme von großer Bedeutung. So könnten abschirmende Elemente, wie z.B. Insulatoren vom *chS4* (*chicken hypersensitive site-4*) oder des *sns5* (*sea urchin*) Locus, in die LTRs eingefügt werden. Diese Elemente reduzieren Chromatin-Positions-Effekte sehr stark, also Wechselwirkungen des Provirus mit benachbarten Transkriptionselementen [260-263]. Somit könnten sowohl transaktivierende Ereignisse vom Provirus als auch epigenetische Einflüsse auf den Provirus reduziert oder sogar verhindert werden.

Alle oben genannten Vektorsysteme sind im Einzelnen für die Verwendung im X-CGD-Kontext zu evaluieren. Erfolgreiche Kandidaten müssen zunächst ihre Effizienz und Sicherheit im X-CGD-Knockout-Mausmodell demonstrieren. Bislang gibt es zwei sehr vielversprechende Kandidaten aus der Arbeitsgruppe von Manuel Grez, die unter anderem im Rahmen dieser Arbeit evaluiert wurden und in den nächsten Jahren für den Einsatz in einer klinischen X-CGD-Gentherapiestudie in Frage kommen.

Zum einen ist dies der γ -retrovirale SIN-Vektor FES mit einem zellulären internen Promotor. Dieser hat in präklinischen Mausversuchen mit seriellen Transplantationen keine Anzeichen für eine klonale Dominanz oder Leukämie-Entstehung gezeigt und somit die vielversprechenden Ergebnisse eines *in vitro* Leukämogenese-Screens von Ute Modlich bestätigt [202] (pers. Mitteilung von Manuel Grez). Zudem wurde *in vivo* keine Promotor-CpG-Methylierung dieses Vektors im Rahmen dieser Arbeit vorgefunden. Somit ist eine sichere und stabile Langzeitexpression des FES-Vektors in X-CGD-Patienten sehr gut möglich.

Der zweite vielversprechende Vektor basiert auf einem lentiviralen System mit SIN-Konfiguration und zellspezifischem myeloischen Promotor (MRP8) in Kombination mit einem Chromatin öffnenden Element (UCOE). Die gezeigte zellspezifische *in vivo* Expression lässt eine sichere Applikation im humanen System vermuten (pers. Mitteilung von Christian Brendel), muss jedoch erst in seriellen Maus-Transplantationsversuchen bestätigt werden. Darüber hinaus kann durch Resistenz gegenüber *Silencing* aufgrund des UCOE-Elementes eine erfolgreiche Gentherapie-Anwendung mit der gewünschten Langzeitexpression ermöglichen.

III. Literaturverzeichnis

1. Gunsilius, E., G. Gastl, and A.L. Petzer, *Hematopoietic stem cells*. Biomed Pharmacother, 2001. **55**(4): p. 186-94.
2. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010.
3. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hämatopoetische Stammzellen*. BIOSpektrum, 2007. **03**(13. Jahrgang): p. 254-256.
4. Berenson, R.J., et al., *Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma*. Blood, 1991. **77**(8): p. 1717-22.
5. Ogawa, M., *Changing phenotypes of hematopoietic stem cells*. Exp Hematol, 2002. **30**(1): p. 3-6.
6. Freund, D., et al., *Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34+ and CD133+ blood stem cells derived from a single donor*. Cell Prolif, 2006. **39**(4): p. 325-32.
7. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
8. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
9. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
10. Rudd, C.E., *Disabled receptor signaling and new primary immunodeficiency disorders*. N Engl J Med, 2006. **354**(18): p. 1874-7.
11. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans*. Cell 73: 147-157. 1993. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 5817-27.
12. Fischer, A. and M. Cavazzana-Calvo, *Gene therapy of inherited diseases*. Lancet, 2008. **371**(9629): p. 2044-7.
13. Hacein-Bey-Abina, S., A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo, *Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency*. Int J Hematol, 2002. **76**(4): p. 295-8.
14. Gaspar, H.B., et al., *How I treat ADA deficiency*. Blood, 2009. **114**(17): p. 3524-32.
15. Bosticardo, M., et al., *Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6288-95.
16. Ozsahin, H., et al., *Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European Group for Blood and Marrow Transplantation*. Blood, 2008. **111**(1): p. 439-45.
17. Aiuti, A. and M.G. Roncarolo, *Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 682-9.

18. Etzioni, A., *Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(5): p. 481-6.
19. Roos, D. and S.K. Law, *Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(6): p. 1000-4.
20. Bauer, T.R., Jr. and D.D. Hickstein, *Gene therapy for leukocyte adhesion deficiency*. Curr Opin Mol Ther, 2000. **2**(4): p. 383-8.
21. Seger, R.A., *Modern management of chronic granulomatous disease*. Br J Haematol, 2008. **140**(3): p. 255-66.
22. Winkelstein, J.A., et al., *Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients*. Medicine (Baltimore), 2000. **79**(3): p. 155-69.
23. Rosh, J.R., et al., *Treatment of intractable gastrointestinal manifestations of chronic granulomatous disease with cyclosporine*. J Pediatr, 1995. **126**(1): p. 143-5.
24. Segal, B.H., et al., *Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease*. Medicine (Baltimore), 2000. **79**(3): p. 170-200.
25. Assari, T., *Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD*. Med Immunol, 2006. **5**: p. 4.
26. Rae, J., et al., *X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(6): p. 1320-31.
27. Mills, E.L., K.S. Rholl, and P.G. Quie, *X-linked inheritance in females with chronic granulomatous disease*. J Clin Invest, 1980. **66**(2): p. 332-40.
28. Dinauer, M.C., J.A. Lekstrom-Himes, and D.C. Dale, *Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2000: p. 303-318.
29. Johnston, R.B., 3rd, R.J. Harbeck, and R.B. Johnston, Jr., *Recurrent severe infections in a girl with apparently variable expression of mosaicism for chronic granulomatous disease*. J Pediatr, 1985. **106**(1): p. 50-5.
30. Matute, J.D., et al., *A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity*. Blood, 2009. **114**(15): p. 3309-15.
31. Cathcart, M.K., *Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 23-8.
32. Borregaard, N., et al., *Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation*. J Cell Biol, 1983. **97**(1): p. 52-61.
33. Ginsel, L.A., et al., *Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy*. Blood, 1990. **76**(10): p. 2105-16.
34. Forman, H.J. and M. Torres, *Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(12 Pt 2): p. S4-8.

35. Decoursey, T.E. and E. Ligeti, *Regulation and termination of NADPH oxidase activity*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(19-20): p. 2173-93.
36. Gallin, J.I., et al., *Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease*. N Engl J Med, 2003. **348**(24): p. 2416-22.
37. Petropoulou, T., et al., *[Long-term treatment of patients with itraconazole for the prevention of Aspergillus infections in patients with chronic granulomatous disease (CGD)]*. Mycoses, 1994. **37 Suppl 2**: p. 64-9.
38. Gmunder, F.K. and R.A. Seger, *Chronic granulomatous disease: mode of action of sulfamethoxazole/trimethoprim*. Pediatr Res, 1981. **15**(12): p. 1533-7.
39. Weening, R.S., et al., *Continuous therapy with sulfamethoxazole-trimethoprim in patients with chronic granulomatous disease*. J Pediatr, 1983. **103**(1): p. 127-30.
40. Margolis, D.M., et al., *Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease*. J Infect Dis, 1990. **162**(3): p. 723-6.
41. Perfect, J.R., D.V. Savani, and D.T. Durack, *Uptake of itraconazole by alveolar macrophages*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(4): p. 903-4.
42. Mouy, R., et al., *Long-term itraconazole prophylaxis against Aspergillus infections in thirty-two patients with chronic granulomatous disease*. J Pediatr, 1994. **125**(6 Pt 1): p. 998-1003.
43. Condino-Neto, A. and P.E. Newburger, *Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3548-54.
44. Ishibashi, F., et al., *Improved superoxide-generating ability by interferon gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in CYBB gene*. Blood, 2001. **98**(2): p. 436-41.
45. Ezekowitz, R.A., et al., *Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma*. N Engl J Med, 1988. **319**(3): p. 146-51.
46. Ezekowitz, R.A., et al., *Restoration of phagocyte function by interferon-gamma in X-linked chronic granulomatous disease occurs at the level of a progenitor cell*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2443-8.
47. Hobbs, J.R., et al., *Chronic granulomatous disease 100% corrected by displacement bone marrow transplantation from a volunteer unrelated donor*. Eur J Pediatr, 1992. **151**(11): p. 806-10.
48. Ho, C.M., et al., *Successful bone marrow transplantation in a child with X-linked chronic granulomatous disease*. Bone Marrow Transplant, 1996. **18**(1): p. 213-5.
49. Seger, R.A., et al., *Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4344-50.
50. Horwitz, M.E., et al., *Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft*. N Engl J Med, 2001. **344**(12): p. 881-8.

51. Gungor, T., et al., *Successful low toxicity hematopoietic stem cell transplantation for high-risk adult chronic granulomatous disease patients*. Transplantation, 2005. **79**(11): p. 1596-606.
52. Suzuki, N., et al., *Treatment of McLeod phenotype chronic granulomatous disease with reduced-intensity conditioning and unrelated-donor umbilical cord blood transplantation*. Int J Hematol, 2007. **85**(1): p. 70-2.
53. Kikuta, A., et al., *Nonmyeloablative stem cell transplantation for nonmalignant diseases in children with severe organ dysfunction*. Bone Marrow Transplant, 2006. **38**(10): p. 665-9.
54. Mulligan, R.C., *The basic science of gene therapy*. Science, 1993. **260**(5110): p. 926-32.
55. Mountain, A., *Gene therapy: the first decade*. Trends Biotechnol, 2000. **18**(3): p. 119-28.
56. Pfeifer, A. and I.M. Verma, *Gene therapy: promises and problems*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 177-211.
57. Verma, I.M. and N. Somia, *Gene therapy -- promises, problems and prospects*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 239-42.
58. Robbins, P.D. and S.C. Ghivizzani, *Viral vectors for gene therapy*. Pharmacol Ther, 1998. **80**(1): p. 35-47.
59. Ott, M.G., et al., *Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1*. Nat Med, 2006. **12**(4): p. 401-9.
60. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science, 2003. **302**(5644): p. 415-9.
61. Aiuti, A., et al., *Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency*. N Engl J Med, 2009. **360**(5): p. 447-58.
62. Pearson, A.S., et al., *Gene therapy and pancreatic cancer*. Front Biosci, 1998. **3**: p. E230-7.
63. Cristiano, R.J., *Viral and non-viral vectors for cancer gene therapy*. Anticancer Res, 1998. **18**(5A): p. 3241-5.
64. Sharma, A., et al., *Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy*. Curr Drug ther, 2009. **4**(2): p. 117-138.
65. Cartier, N., et al., *Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy*. Science, 2009. **326**(5954): p. 818-23.
66. Manfredsson, F.P., M.S. Okun, and R.J. Mandel, *Gene therapy for neurological disorders: challenges and future prospects for the use of growth factors for the treatment of Parkinson's disease*. Curr Gene Ther, 2009. **9**(5): p. 375-88.
67. Siatskas, S. and C.C. Bernard, *Stem cell and gene therapeutic strategies for the treatment of multiple sclerosis*. Curr Mol Med, 2009. **9**(8): p. 992-1016.
68. Gupta, R., J. Tongers, and D.W. Losordo, *Human studies of angiogenic gene therapy*. Circ Res, 2009. **105**(8): p. 724-36.
69. Kalka, C. and J.M. Isner, *[Cardiac and vascular gene therapy in cardiology. Current status and future prospects]*. Internist (Berl), 2002. **43** Suppl 1: p. S66-75.

70. Isner, J.M., *Myocardial gene therapy*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 234-9.
71. Bashir, R., et al., *Angiogenic gene therapy: pre-clinical studies and phase I clinical data*. Kidney Int, 2002. **61**(1 Suppl): p. S110-4.
72. Mitsuyasu, R.T., et al., *Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 285-92.
73. Macpherson, J.L., et al., *Ribozymes in gene therapy of HIV-1*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D497-505.
74. Chuah, M.K., *Cutting through the obstacles and resurrecting the promise of gene therapy*. IDrugs, 2005. **8**(10): p. 818-21.
75. Bushman, F.D., *Retroviral integration and human gene therapy*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2083-6.
76. Raper, S.E., et al., *A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(1): p. 163-75.
77. Somia, N. and I.M. Verma, *Gene therapy: trials and tribulations*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(2): p. 91-9.
78. Selkirk, S.M., *Gene therapy in clinical medicine*. Postgrad Med J, 2004. **80**(948): p. 560-70.
79. Romano, G., C. Pacilio, and A. Giordano, *Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals*. Stem Cells, 1999. **17**(4): p. 191-202.
80. Wood, K.J. and J. Fry, *Gene therapy: potential applications in clinical transplantation*. Expert Rev Mol Med, 1999. **1999**: p. 1-20.
81. Herschhorn, A. and A. Hizi, *Retroviral reverse transcriptases*. Cell Mol Life Sci.
82. Nisole, S., J.P. Stoye, and A. Saib, *TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(10): p. 799-808.
83. Goff, S.P., *Host factors exploited by retroviruses*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(4): p. 253-63.
84. Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E., *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997.
85. Roe, T., et al., *Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis*. Embo J, 1993. **12**(5): p. 2099-108.
86. Miller, D.G., M.A. Adam, and A.D. Miller, *Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4239-42.
87. Fassati, A., *HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 74.
88. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
89. Bukrinsky, M.I., et al., *A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 666-9.

90. Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank, *A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids*. J Virol, 1988. **62**(4): p. 1120-4.
91. Schilz, A.J., et al., *Optimization of retroviral vector generation for clinical application*. J Gene Med, 2001. **3**(5): p. 427-36.
92. Przybylowski, M., et al., *Production scale-up and validation of packaging cell clearance of clinical-grade retroviral vector stocks produced in cell factories*. Gene Ther, 2006. **13**(1): p. 95-100.
93. Bauer, T.R., Jr., A.D. Miller, and D.D. Hickstein, *Improved transfer of the leukocyte integrin CD18 subunit into hematopoietic cell lines by using retroviral vectors having a gibbon ape leukemia virus envelope*. Blood, 1995. **86**(6): p. 2379-87.
94. Gatlin, J., et al., *Engraftment of NOD/SCID mice with human CD34(+) cells transduced by concentrated oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein*. J Virol, 2001. **75**(20): p. 9995-9.
95. Kelly, P.F., et al., *RD114-pseudotyped oncoretroviral vectors. Biological and physical properties*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **938**: p. 262-76; discussion 276-7.
96. Akkina, R.K., et al., *High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2581-5.
97. Farson, D., et al., *A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(8): p. 981-97.
98. Pacchia, A.L., et al., *An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins*. Virology, 2001. **282**(1): p. 77-86.
99. Dunbar, C.E., et al., *Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation*. Blood, 1995. **85**(11): p. 3048-57.
100. Nadali, G., E.A. de Wynter, and N.G. Testa, *CD34 cell separation: from basic research to clinical applications*. Int J Clin Lab Res, 1995. **25**(3): p. 121-7.
101. Case, S.S., et al., *Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2988-93.
102. Frecha, C., et al., *Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4843-52.
103. Shoemaker, C., et al., *Structure of a cloned circular Moloney murine leukemia virus DNA molecule containing an inverted segment: implications for retrovirus integration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(7): p. 3932-6.
104. Van Beveren, C., et al., *Structure of Moloney murine leukemia viral DNA: nucleotide sequence of the 5' long terminal repeat and adjacent cellular sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(6): p. 3307-11.
105. Wu, X., et al., *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration*. Science, 2003. **300**(5626): p. 1749-51.
106. Mitchell, R.S., et al., *Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences*. PLoS Biol, 2004. **2**(8): p. E234.

107. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
108. Bushman, F., et al., *Genome-wide analysis of retroviral DNA integration*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(11): p. 848-58.
109. Du, Y., N.A. Jenkins, and N.G. Copeland, *Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary bone marrow progenitor cells*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3932-9.
110. Hacein-Bey, H., et al., *gamma-c gene transfer into SCID X1 patients' B-cell lines restores normal high-affinity interleukin-2 receptor expression and function*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3108-16.
111. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy*. N Engl J Med, 2002. **346**(16): p. 1185-93.
112. Thrasher, A.J., et al., *Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity*. Nature, 2006. **443**(7109): p. E5-6; discussion E6-7.
113. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3132-42.
114. Gaspar, H.B., et al., *Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector*. Lancet, 2004. **364**(9452): p. 2181-7.
115. Qasim, W., H.B. Gaspar, and A.J. Thrasher, *Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies*. Gene Ther, 2009. **16**(11): p. 1285-91.
116. Howe, S.J., et al., *Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3143-50.
117. Sokolic, R., C. Kesserwan, and F. Candotti, *Recent advances in gene therapy for severe congenital immunodeficiency diseases*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(4): p. 375-80.
118. Aiuti, A., et al., *Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2410-3.
119. Aiuti, A., et al., *Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2233-40.
120. Aiuti, A., et al., *Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase deficient-SCID*. Immunol Res, 2009. **44**(1-3): p. 150-9.
121. Boztug, K., et al., *Successful hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome*. N Engl J Med, 2010 in press
122. Dinauer, M.C., et al., *Variable correction of host defense following gene transfer and bone marrow transplantation in murine X-linked chronic granulomatous disease*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3738-45.
123. Bjorgvinsdottir, H., et al., *Retroviral-mediated gene transfer of gp91phox into bone marrow cells rescues defect in host defense against Aspergillus fumigatus in murine X-linked chronic granulomatous disease*. Blood, 1997. **89**(1): p. 41-8.

124. Malech, H.L., et al., *Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12133-8.
125. Malech, H.L., U. Choi, and S. Brenner, *Progress toward effective gene therapy for chronic granulomatous disease*. Jpn J Infect Dis, 2004. **57**(5): p. S27-8.
126. Kang, E.M., et al., *Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils*. Blood, 2010. **115**(4): p. 783-91.
127. Stein, S., et al., *Gene therapy for chronic granulomatous disease*. Curr Opin Mol Ther, 2006. **8**(5): p. 415-22.
128. Perkins, A.S., et al., *Evi-1, a murine zinc finger proto-oncogene, encodes a sequence-specific DNA-binding protein*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(5): p. 2665-74.
129. Metais, J.Y. and C.E. Dunbar, *The MDS1-EVI1 gene complex as a retrovirus integration site: impact on behavior of hematopoietic cells and implications for gene therapy*. Mol Ther, 2008. **16**(3): p. 439-49.
130. Fears, S., et al., *Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(4): p. 1642-7.
131. Huang, S., *The retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene RIZ in 1p36-linked cancers*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D528-32.
132. Stein, S., et al., *Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease*. Nat Med, 2010. **16**(2): p. 198-204.
133. Challita, P.M. and D.B. Kohn, *Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2567-71.
134. Klug, C.A., S. Cheshier, and I.L. Weissman, *Inactivation of a GFP retrovirus occurs at multiple levels in long-term repopulating stem cells and their differentiated progeny*. Blood, 2000. **96**(3): p. 894-901.
135. Jones, P.A. and D. Takai, *The role of DNA methylation in mammalian epigenetics*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1068-70.
136. Sono, M., Y. Wataya, and H. Hayatsu, *Role of bisulfite in the deamination and the hydrogen isotope exchange of cytidylic acid*. J Am Chem Soc, 1973. **95**(14): p. 4745-9.
137. Li, L.C. and R. Dahiya, *MethPrimer: designing primers for methylation PCRs*. Bioinformatics, 2002. **18**(11): p. 1427-31.
138. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
139. DuBridge, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-87.
140. McBurney, M.W. and B.J. Rogers, *Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns*. Dev Biol, 1982. **89**(2): p. 503-8.

141. Rudnicki, M.A., et al., *Actin and myosin expression during development of cardiac muscle from cultured embryonal carcinoma cells*. Dev Biol, 1990. **138**(2): p. 348-58.
142. Shi, J., et al., *Effects of chromatin-modifying agents on CD34+ cells from patients with idiopathic myelofibrosis*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6417-24.
143. Segal, B.H., et al., *Posaconazole as salvage therapy in patients with chronic granulomatous disease and invasive filamentous fungal infection*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(11): p. 1684-8.
144. Kobayashi, S., et al., *Clinical features and prognoses of 23 patients with chronic granulomatous disease followed for 21 years by a single hospital in Japan*. Eur J Pediatr, 2008. **167**(12): p. 1389-94.
145. Staal, F.J., et al., *Sola dosis facit venenum. Leukemia in gene therapy trials: a question of vectors, inserts and dosage?* Leukemia, 2008. **22**(10): p. 1849-52.
146. von Kalle, C., et al., *Stem cell clonality and genotoxicity in hematopoietic cells: gene activation side effects should be avoidable*. Semin Hematol, 2004. **41**(4): p. 303-18.
147. Fehse, B., et al., *Pois(s)on--it's a question of dose*. Gene Ther, 2004. **11**(11): p. 879-81.
148. Baum, C., et al., *Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences*. Mol Ther, 2004. **9**(1): p. 5-13.
149. Modlich, U., et al., *Leukemia induction after a single retroviral vector insertion in Evi1 or Prdm16*. Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1519-28.
150. Walrand, S., et al., *Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes*. Clin Chim Acta, 2003. **331**(1-2): p. 103-10.
151. Vowells, S.J., et al., *Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes*. J Immunol Methods, 1995. **178**(1): p. 89-97.
152. Rezvani, Z., et al., *CYBB Gene Mutation Detection in an Iranian Patient with Chronic Granulomatous Disease*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2005. **4**(2): p. 103-6.
153. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
154. Fleige, S., et al., *Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR*. Biotechnol Lett, 2006. **28**(19): p. 1601-13.
155. Sadat, M.A., et al., *Long-term high-level reconstitution of NADPH oxidase activity in murine X-linked chronic granulomatous disease using a bicistronic vector expressing gp91phox and a Delta LNGFR cell surface marker*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(7): p. 651-66.
156. He, J., Q. Yang, and L.J. Chang, *Dynamic DNA methylation and histone modifications contribute to lentiviral transgene silencing in murine embryonic carcinoma cells*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13497-508.
157. Hajkova, P., et al., *DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method*. Methods Mol Biol, 2002. **200**: p. 143-54.
158. Lorincz, M.C., et al., *Dynamic analysis of proviral induction and De Novo methylation: implications for a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 842-50.

159. Juttermann, R., E. Li, and R. Jaenisch, *Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 11797-801.
160. Greer, P., et al., *Myeloid expression of the human c-fps/fes proto-oncogene in transgenic mice*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(6): p. 2521-7.
161. Heydemann, A., et al., *A minimal c-fes cassette directs myeloid-specific expression in transgenic mice*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3040-8.
162. Moreno-Carranza, B., et al., *Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells*. Gene Ther, 2009. **16**(1): p. 111-8.
163. Schambach, A., et al., *Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression*. Gene Ther, 2006. **13**(7): p. 641-5.
164. Vigna, E. and L. Naldini, *Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy*. J Gene Med, 2000. **2**(5): p. 308-16.
165. Antoniou, M., et al., *Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing*. Genomics, 2003. **82**(3): p. 269-79.
166. Zhang, F., et al., *Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1448-57.
167. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
168. Panning, B. and R. Jaenisch, *DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes*. Genes Dev, 1996. **10**(16): p. 1991-2002.
169. Li, E., C. Beard, and R. Jaenisch, *Role for DNA methylation in genomic imprinting*. Nature, 1993. **366**(6453): p. 362-5.
170. Schulz, W.A., C. Steinhoff, and A.R. Florl, *Methylation of endogenous human retroelements in health and disease*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **310**: p. 211-50.
171. Baylin, S.B., *DNA methylation and gene silencing in cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2** Suppl 1: p. S4-11.
172. Baylin, S.B. and W.Y. Chen, *Aberrant gene silencing in tumor progression: implications for control of cancer*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005. **70**: p. 427-33.
173. Rountree, M.R., et al., *DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3156-65.
174. Ubeda, F. and J.F. Wilkins, *Imprinted genes and human disease: an evolutionary perspective*. Adv Exp Med Biol, 2008. **626**: p. 101-15.
175. Bestor, T.H., *Gene silencing as a threat to the success of gene therapy*. J Clin Invest, 2000. **105**(4): p. 409-11.
176. Lorincz, M.C. and M. Groudine, *C(m)C(a/t)GG methylation: a new epigenetic mark in mammalian DNA?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10034-6.

177. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
178. Antequera, F. and A. Bird, *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11995-9.
179. Bestor, T.H., *The host defence function of genomic methylation patterns*. Novartis Found Symp, 1998. **214**: p. 187-95; discussion 195-9, 228-32.
180. Hare, J.T. and J.H. Taylor, *One role for DNA methylation in vertebrate cells is strand discrimination in mismatch repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(21): p. 7350-4.
181. Cross, S.H. and A.P. Bird, *CpG islands and genes*. Curr Opin Genet Dev, 1995. **5**(3): p. 309-14.
182. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
183. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
184. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 219-20.
185. Smallwood, A., et al., *Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing*. Genes Dev, 2007. **21**(10): p. 1169-78.
186. Pannell, D. and J. Ellis, *Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors*. Rev Med Virol, 2001. **11**(4): p. 205-17.
187. Burgers, W.A., F. Fuks, and T. Kouzarides, *DNA methyltransferases get connected to chromatin*. Trends Genet, 2002. **18**(6): p. 275-7.
188. Stewart, C.L., et al., *De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(13): p. 4098-102.
189. Jahner, D., et al., *De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis*. Nature, 1982. **298**(5875): p. 623-8.
190. Harada, F., G.G. Peters, and J.E. Dahlberg, *The primer tRNA for Moloney murine leukemia virus DNA synthesis. Nucleotide sequence and aminoacylation of tRNA^{Pro}*. J Biol Chem, 1979. **254**(21): p. 10979-85.
191. Barklis, E., R.C. Mulligan, and R. Jaenisch, *Chromosomal position or virus mutation permits retrovirus expression in embryonal carcinoma cells*. Cell, 1986. **47**(3): p. 391-9.
192. Petersen, R., G. Kempler, and E. Barklis, *A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1214-21.
193. Wolf, D. and S.P. Goff, *TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells*. Cell, 2007. **131**(1): p. 46-57.
194. Wolf, D., K. Hug, and S.P. Goff, *TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of Lys1,2 tRNA-utilizing retroviruses in embryonic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12521-6.

195. Wolf, D. and S.P. Goff, *Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1201-4.
196. Le Douarin, B., et al., *A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors*. Embo J, 1996. **15**(23): p. 6701-15.
197. Schultz, D.C., J.R. Friedman, and F.J. Rauscher, 3rd, *Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD*. Genes Dev, 2001. **15**(4): p. 428-43.
198. Garcia-Manero, G., *Demethylating agents in myeloid malignancies*. Curr Opin Oncol, 2008. **20**(6): p. 705-10.
199. Fenaux, P. and L. Ades, *Review of azacitidine trials in Intermediate-2-and High-risk myelodysplastic syndromes*. Leuk Res, 2009. **33 Suppl 2**: p. S7-11.
200. Baum, C., et al., *Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors*. Hum Gene Ther, 2006. **17**(3): p. 253-63.
201. Kustikova, O., et al., *Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking*. Science, 2005. **308**(5725): p. 1171-4.
202. Modlich, U., et al., *Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2545-53.
203. Modlich, U., et al., *Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4235-46.
204. Schmidt, M., et al., *Detection of retroviral integration sites by linear amplification-mediated PCR and tracking of individual integration clones in different samples*. Methods Mol Biol, 2009. **506**: p. 363-72.
205. Schmidt, M., et al., *High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR)*. Nat Methods, 2007. **4**(12): p. 1051-7.
206. Schmidt, M., et al., *Efficient characterization of retro-, lenti-, and foamyvector-transduced cell populations by high-accuracy insertion site sequencing*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **996**: p. 112-21.
207. Gabriel, R., et al., *Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy*. Nat Med, 2009. **15**(12): p. 1431-6.
208. Mucenski, M.L., et al., *Chromosomal location of Evi-1, a common site of ecotropic viral integration in AKXD murine myeloid tumors*. Oncogene Res, 1988. **2**(3): p. 219-33.
209. Ogawa, S., et al., *Abnormal expression of Evi-1 gene in human leukemias*. Hum Cell, 1996. **9**(4): p. 323-32.
210. Suzukawa, K., et al., *Identification of a breakpoint cluster region 3' of the ribophorin I gene at 3q21 associated with the transcriptional activation of the EVI1 gene in acute myelogenous leukemias with inv(3)(q21q26)*. Blood, 1994. **84**(8): p. 2681-8.
211. Valk, P.J., et al., *Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2004. **350**(16): p. 1617-28.

212. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., et al., *High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients*. Blood, 2003. **101**(3): p. 837-45.
213. Kilbey, A., V. Stephens, and C. Bartholomew, *Loss of cell cycle control by deregulation of cyclin-dependent kinase 2 kinase activity in Evi-1 transformed fibroblasts*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(9): p. 601-10.
214. Chakraborty, S., et al., *Interaction of EVI1 with cAMP-responsive element-binding protein-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor (P/CAF) results in reversible acetylation of EVI1 and in co-localization in nuclear speckles*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44936-43.
215. Sitailo, S., et al., *Forced expression of the leukemia-associated gene EVI1 in ES cells: a model for myeloid leukemia with 3q26 rearrangements*. Leukemia, 1999. **13**(11): p. 1639-45.
216. Kilbey, A., et al., *The Evi1 proto-oncoprotein blocks endomitosis in megakaryocytes by inhibiting sustained cyclin-dependent kinase 2 catalytic activity*. Br J Haematol, 2005. **130**(6): p. 902-11.
217. Chi, Y., et al., *EVI1 promotes cell proliferation by interacting with BRG1 and blocking the repression of BRG1 on E2F1 activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49806-11.
218. Kim, S.J. and J. Letterio, *Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis*. Leukemia, 2003. **17**(9): p. 1731-7.
219. Kurokawa, M., et al., *The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1, interacts with Smad3 and blocks transforming growth factor-beta-mediated growth inhibition of myeloid cells*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4003-12.
220. Izutsu, K., et al., *The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2815-22.
221. Nitta, E., et al., *Oligomerization of Evi-1 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP*. Oncogene, 2005. **24**(40): p. 6165-73.
222. Soma, T., J.M. Yu, and C.E. Dunbar, *Maintenance of murine long-term repopulating stem cells in ex vivo culture is affected by modulation of transforming growth factor-beta but not macrophage inflammatory protein-1 alpha activities*. Blood, 1996. **87**(11): p. 4561-7.
223. Laricchia-Robbio, L., et al., *Point mutations in two EVI1 Zn fingers abolish EVI1-GATA1 interaction and allow erythroid differentiation of murine bone marrow cells*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(20): p. 7658-66.
224. Kurokawa, M., et al., *The evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death*. Embo J, 2000. **19**(12): p. 2958-68.
225. Tanaka, T., et al., *Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain*. J Biol Chem, 1994. **269**(39): p. 24020-6.
226. Morishita, K., et al., *Expression of the Evi-1 zinc finger gene in 32Dc13 myeloid cells blocks granulocytic differentiation in response to granulocyte colony-stimulating factor*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(1): p. 183-9.
227. Hoyt, P.R., et al., *The Evi1 proto-oncogene is required at midgestation for neural, heart, and paraxial mesenchyme development*. Mech Dev, 1997. **65**(1-2): p. 55-70.

228. Park, I.K., et al., *Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells*. Blood, 2002. **99**(2): p. 488-98.
229. Calmels, B., et al., *Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2530-3.
230. Hematti, P., et al., *Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells*. PLoS Biol, 2004. **2**(12): p. e423.
231. Gerhardt, T.M., et al., *Expression of the Evi-1 gene in haemopoietic cells of children with juvenile myelomonocytic leukaemia and normal donors*. Br J Haematol, 1997. **99**(4): p. 882-7.
232. Pardanani, A., *Dysregulated EVI1 expression in myeloid malignancies*. Leuk Lymphoma, 2006. **47**(12): p. 2443-4.
233. Nucifora, G., *The EVI1 gene in myeloid leukemia*. Leukemia, 1997. **11**(12): p. 2022-31.
234. Dreyfus, F., et al., *Expression of the Evi-1 gene in myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 1995. **9**(1): p. 203-5.
235. Charrin, C., et al., *Structural rearrangements of chromosome 3 in 57 patients with acute myeloid leukemia: clinical, hematological and cytogenetic features*. Hematol J, 2002. **3**(1): p. 21-31.
236. Lin, P., et al., *Translocation (3;8)(q26;q24): a recurrent chromosomal abnormality in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **166**(1): p. 82-5.
237. Trubia, M., et al., *Characterization of a recurrent translocation t(2;3)(p15-22;q26) occurring in acute myeloid leukaemia*. Leukemia, 2006. **20**(1): p. 48-54.
238. Cattaneo, F. and G. Nucifora, *EVI1 recruits the histone methyltransferase SUV39H1 for transcription repression*. J Cell Biochem, 2008. **105**(2): p. 344-52.
239. Kondo, Y., et al., *Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2037.
240. Spensberger, D. and R. Delwel, *A novel interaction between the proto-oncogene Evi1 and histone methyltransferases, SUV39H1 and G9a*. FEBS Lett, 2008. **582**(18): p. 2761-7.
241. Kramer, A., K. Neben, and A.D. Ho, *Centrosome replication, genomic instability and cancer*. Leukemia, 2002. **16**(5): p. 767-75.
242. Neben, K., et al., *Centrosome aberrations in acute myeloid leukemia are correlated with cytogenetic risk profile*. Blood, 2003. **101**(1): p. 289-91.
243. Zhang, Y., et al., *MLL5 contributes to hematopoietic stem cell fitness and homeostasis*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1455-63.
244. Heuser, M., et al., *Loss of MLL5 results in pleiotropic hematopoietic defects, reduced neutrophil immune function, and extreme sensitivity to DNA demethylation*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1432-43.
245. Madan, V., et al., *Impaired function of primitive hematopoietic cells in mice lacking the Mixed-Lineage-Leukemia homolog MLL5*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1444-54.

246. Sebastian, S., et al., *MLL5, a trithorax homolog, indirectly regulates H3K4 methylation, represses cyclin A2 expression, and promotes myogenic differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4719-24.
247. Modlich, U., et al., *Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors*. Mol Ther, 2009. **17**(11): p. 1919-28.
248. Nolte, F. and W.K. Hofmann, *Molecular mechanisms involved in the progression of myelodysplastic syndrome*. Future Oncol. **6**(3): p. 445-55.
249. Nicholson, E. and T. Holyoake, *The chronic myeloid leukemia stem cell*. Clin Lymphoma Myeloma, 2009. **9 Suppl 4**: p. S376-81.
250. Lane, S.W., D.T. Scadden, and D.G. Gilliland, *The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities*. Blood, 2009. **114**(6): p. 1150-7.
251. Modlich, U. and C. Baum, *Preventing and exploiting the oncogenic potential of integrating gene vectors*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 755-8.
252. Montini, E., et al., *The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 964-75.
253. Schnutgen, F., et al., *Enhanced gene trapping in mouse embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(20): p. e133.
254. Narezkina, A., et al., *Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11656-63.
255. Ivics, Z., et al., *Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells*. Cell, 1997. **91**(4): p. 501-10.
256. Carroll, D., *Using nucleases to stimulate homologous recombination*. Methods Mol Biol, 2004. **262**: p. 195-207.
257. Carroll, D., *Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents*. Gene Ther, 2008. **15**(22): p. 1463-8.
258. Radecke, S., et al., *Zinc-finger Nuclease-induced Gene Repair With Oligodeoxynucleotides: Wanted and Unwanted Target Locus Modifications*. Mol Ther, 2010.
259. Bohne, J. and T. Cathomen, *Genotoxicity in gene therapy: an account of vector integration and designer nucleases*. Curr Opin Mol Ther, 2008. **10**(3): p. 214-23.
260. Arumugam, P.I., et al., *Improved human beta-globin expression from self-inactivating lentiviral vectors carrying the chicken hypersensitive site-4 (cHS4) insulator element*. Mol Ther, 2007. **15**(10): p. 1863-71.
261. Arumugam, P.I., et al., *The 3' region of the chicken hypersensitive site-4 insulator has properties similar to its core and is required for full insulator activity*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6995.
262. Desprat, R. and E.E. Bouhassira, *Gene specificity of suppression of transgene-mediated insertional transcriptional activation by the chicken HS4 insulator*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5956.

263. D'Apolito, D., et al., *The sea urchin sns5 insulator protects retroviral vectors from chromosomal position effects by maintaining active chromatin structure*. Mol Ther, 2009. **17**(8): p. 1434-41.

IV. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachnidonsäure
ADA-SCID	Adenosin Deaminase SCID
AIDS	<i>Aquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ALD	<i>X-linked Adrenoleukodystrophy</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
ASLV	<i>Avian sarcoma-leukosis virus</i>
Aza-D	5-Aza-2'-Deoxycytidin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BS	Bisulfit
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCND2	Cyclin D2
CD	<i>Clusters of differentiation</i>
cDNA	Complementäre DNA
CGD	Chronische Granulomatose
Chr.	Chromosom
CIS	<i>Common insertion site</i>
CMP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
cPLA ₂	Zytosolische Phospholipase A ₂
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CYBA	Cytochrome b-245, Alpha Polypeptid (p22 ^{phox})
CYBB	Cytochrome b-245, Beta Polypeptid (Synonym für GP91 ^{phox})
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnmt	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleotide Triphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiaminetetra-acetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Enh	Enhancer
env	<i>Envelope</i>
EV11	<i>Ecotropic viral integration site1</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FITC	Fluoreszinsocyanat
For	<i>Forward</i>
FRET	Fluoreszenz Resonanz Elektron Transfer
gag	Glykoprotein Antigen
gDNA	Genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLIS1	Gli-similar 1 (Krüppel like protein)

GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
GP91 ^{phox}	Untereinheit der NADPH-Phagozyten-Oxidase
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histon Deacetylase
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus I</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HP1	<i>heterochromatin protein1</i>
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
IL	Interleukin
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
iu	<i>Infectious units</i>
KRAB	<i>Krüppel associated box</i>
LAM-PCR	<i>Linear amplification mediated PCR</i>
LINES	<i>Long interspersed nuclear elements</i>
LMO-2	<i>LIM domain only 2</i>
LMPP	<i>Lymphoid multipotent progenitor</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LT-HSZ	<i>Long-Term HSZ</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M	Molar
MBD	<i>methyl-CpG binding domain protein</i>
MDS1	<i>Myelodysplastic syndrome 1</i>
MFI	Mediane Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Milliliter
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
mM	Millimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MoMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MPP	<i>multipotent progenitor</i>
MPSV	<i>Myeloproliferative sarcoma virus</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRP8	<i>Myeloid related protein 8</i>
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NCF1	Neutrophil Cytosolic Faktor 1 (p47 ^{phox})
NCF2	Neutrophil Cytosolic Faktor 1 (p67 ^{phox})
nm	Nanometer
NOX2	NADPH Phagozyten Oxidase Untereinheit 2 (Synonym für GP91 ^{phox})
NR-LAM-PCR	<i>Nonrestrictive LAM-PCR</i>
P1	Patient 1
P2	Patient 2
PB	Peripheres Blut
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS	<i>Primer binding site</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerytrin
PIC	<i>Preintegration complex</i>
PKC α	Ca ²⁺ abhängige Protein Kinase C
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
pol	Polymerase
PR	Positive Regulator Domäne
PRDM16	<i>PR domain containing 16</i>
PRKRA	<i>Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator</i>
qPCR	Quantitative PCR
Rac 1/2	Ras related C3 botulinum toxin substrate1/2
RBS	<i>Repressor binding site</i>
RBS	<i>repressor binding site</i>
Rev	<i>Reverse</i>
rhoGDI	<i>Rho-GDP dissociation inhibitor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reaktive Oxygen Species</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SA	Spleißakzeptor
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SD	Spleißdonor
SETBP1	<i>SET binding protein</i>
SFFV	<i>Spleen Focus Forming Virus</i>
SIN	<i>Self Inactivating</i>
SINES	<i>Small interspersed nuclear elements</i>
SIV	Semian immunodeficiency derived vector
Sog.	Sogenannte
SZT	Stammzelltransplantation
TBE	TRIS Borat EDTA Puffer
TSA	Trichostatin A
TSS	<i>Transcriptional Start Site</i>
U	<i>Unit</i>
WPRE	<i>Woodchuck posttranscriptional regulatory element</i>
X-CGD	X-Chromosomen gebundene Chronische Granulomatose
ZOP	Oponisiertes Zymosan
μ g	Microgramm
μ l	Microliter
μ M	Micromolar
Ψ	Verpackungssignal (PSI)

V. Publikation

Stefan Stein, Marion G Ott, **Stephan Schultze-Strasser**, Anna Jauch, Barbara Burwinkel, Andrea Kinner, Manfred Schmidt, Alwin Krämer, Joachim Schwäble, Hanno Glimm, Ulrike Koehl, Carolin Preiss, Claudia Ball, Hans Martin, Gudrun Göhring, Kerstin Schwarzwaelder, Wolf-Karsten Hofmann, Kadin Karakaya, Sandrine Tchatchou, Rongxi Yang, Petra Reinecke, Klaus Kühnlcke, Brigitte Schlegelberger, Adrian J Thrasher, Dieter Hoelzer, Reinhard Seger, Christof von Kalle und Manuel Grez. *Genomic instability and myelodysplasia with Monosomie 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease*. **Nature Medicine**, Vol. 16, 198-204. **Februar 2010**

VI. Kongressbeiträge

Stephan Schultze-Strasser, Rolf Kramer, Carolin Preiss, Stefan Stein und Manuel Grez. *Silencing of proviral transgene expression by CpG methylation in a gene therapy trial for X-linked form of CGD*. Vortrag mit Auszeichnung „**Best Presentation Award**“, 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (**DGGT**), **Juli 2007**, **Heidelberg**,

Stephan Schultze-Strasser, Rolf Kramer, Carolin Preiss, MG. Ott, Stefan Stein and Manuel Grez. *Silencing of proviral transgene expression by CpG methylation in a gene therapy trial for Chronic Granulomatous Disease*. Posterpräsentation, IVth Conference on Stem Cell Gene Therapy (**SCGT**), **September 2007**, **Chalkidiki** (Griechenland)

Stephan Schultze-Strasser, Rolf Kramer, Carolin Preiss, MG. Ott, Stefan Stein and Manuel Grez. *Silencing of proviral transgene expression by CpG methylation in a gene therapy trial for Chronic Granulomatous Disease*. Posterpräsentation, 15th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (**ESGCT**), **Oktober 2007**, **Rotterdam** (Niederlande)

Marion G. Ott, Stefan Stein, **Stephan Schultze-Strasser**, Anna Jauch, Barbara Burwinkel, Brigitte Schlegelberger, Gudrun Goehring, Carolin Preiss, Rolf Kramer, Kerstin Schwarzwaelder, Ulrike Koehl, Hanna Kunkel, Klaus Kuehlcke, Andrea Schilz, Manfred Schmidt, Christof von Kalle, Adrian Trasher, Dieter Hoelzer, Reinhard Seger und Manuel Grez. *Phase I/II Gene Therapy Study for Chronic Granulomatous Disease: Results, Lessons and Perspectives*. Posterpräsentation, 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology (**ASH**), **Dezember 2007**, **Atlanta** (USA)

Stephan Schultze-Strasser, Rolf Kramer, Carolin Preiss, MG. Ott, Stefan Stein and Manuel Grez. *Silencing of transgene expression in a gene therapy trial for X-CGD*. Vortrag, Drittes **CONSERT** Meeting, **Januar 2008 Leukerbad** (Schweiz)

Stephan Schultze-Strasser, Rolf Kramer, Carolin Preiss, Hana Kunkel, MG. Ott, Stefan Stein und Manuel Grez. *Silencing of proviral transgene expression by CpG methylation in a gene therapy trial for Chronic Granulomatous Disease*. Posterpräsentation, 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (**DGGT**), **Oktober 2008, Berlin**

Stephan Schultze-Strasser, Rolf Kramer, Carolin Preiss, MG. Ott, Stefan Stein and Manuel Grez. *X-CGD Gene Therapy Trial: Fate of Gene Transduced Cells Clonal Dominance, Monosomie 7 and Silencing*. Vortrag, Viertes **CONCERT** Meeting, **Januar 2009, Leukerbad** (Schweiz)

Stefan Stein, Eva Rudolf, Hana Kunkel, **Stephan Schultze-Strasser**, Margarita Haralambova, Ute Modlich, Linping Chen-Wichmann, Bibiana Moreno-Carranza, Axel Schambach, Christopher Baum und Manuel Grez. *SIN Gammaretroviral Vectors for the Gene Therapy of X-CGD*. Posterpräsentation, 12th Meeting der American Society of Gene Therapy (**ASGT**), **April 2009, San Diego** (USA)

Stephan Schultze-Strasser. *Molekulares follow-up einer Gentherapiestudie zur Behandlung von X-CGD*. Vortrag, **DFG Begutachtung** des Graduiertenkollegs 1172/ FIRST, **September 2009, Frankfurt am Main**

Stephan Schultze-Strasser, Christian Brendel, Rolf Kramer, Carolin Preiss, Hana Kunkel, Stefan Stein und Manuel Grez. *Vector silencing in a gene therapy trial for X-CGD and strategies to improve long-term transgene expression*. Posterpräsentation, Combined Meeting of the **ESGCT, GSZ, DGGT and ISCT**, **November 2009, Hannover**

Stefan Stein, Eva Rudolf, Hana Kunkel, **Stephan Schultze-Strasser**, Margarita Haralambova, Joachim Schwäble, Linping Chen-Wichmann, Axel Schambach, Christopher Baum und, Manuel Grez. *In vivo efficacy testing of a SIN gammaretroviral vector for the gene therapy of X-linked chronic granulomatous disease*. Posterpräsentation, Combined Meeting of the **ESGCT, GSZ, DGGT and ISCT**, **November 2009, Hannover**

Stefan Stein, Marion Ott, **Stephan Schultze-Strasser**, Andrea Kinner, Anna Jauch, Barbara Burwinkel, Manfred Schmidt, Alwin Krämer, Hans Martin, Hanno Glimm, Ulrike Koehl, Carolin Preiss, Eva Rudolf, Hana Kunkel, Gudrun Göhring, Kerstin Schwarzwäelder, Wolf-Karsten Hofmann, Klaus Kühlcke, Brigitte Schlegelberger, Adrian Thrasher, Dieter Hoelzer, Reinhard Seger, Christof von Kall und, Manuel Grez. *Gene therapy for chronic granulomatous disease: Ups and downs*. Posterpräsentation, Combined Meeting of the **ESGCT, GSZ, DGGT and ISCT**, **November 2009, Hannover**

Stephan Schultze-Strasser. *Molekulares Monitoring einer klinischen Studie im Rahmen der strukturierten Graduiertenausbildung*. Vortrag, **Eröffnungsfeier** der Frankfurter Graduiertenschule **GRADE**, **November 2009, Frankfurt am Main**

VII. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für angewandte Virologie in der Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez im chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Manuel Grez für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen, seiner steten Bereitschaft dieses Projekt mit fachlicher Betreuung voranzutreiben und den zahlreichen konstruktiven Diskussionen während der ganzen Zeit in seiner Arbeitsgruppe, sowie für die Möglichkeit der enormen persönlichen Förderung in allen wissenschaftlichen Bereichen.

Für die konstruktive Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs möchte ich meinen beiden Co-Betreuern PD Dr. Ulrike Köhl und Prof. Dr. Matthias Schweizer sehr herzlich danken. Ebenso geht mein Dank für die externe Betreuung dieser Arbeit an Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz, sowie für die interne Betreuung an Prof. Dr. Winfried Wels.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez ebenso wie den Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen des Georg-Speyer-Hauses und des Graduiertenkollegs danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hierbei Hana Kunkel, Christian Brendel, Stefan Stein, Isabel Vogler, Margarita Haralambova, Rolf Kramer, Eva Maria Rudolf, Uta Müller-Kuller, Christian und Linping Chen-Wichmann und Andrea Kinner.

Mein ganz besonderer Dank gilt all den Menschen, die mich während der Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet und gefördert haben. Allen voran meiner Frau Anke, die mir die nötige Kraft und Unterstützung gegeben hat. Meinen Eltern, die mir die Möglichkeit gegeben haben diesen Weg zu gehen und mich unermüdlich gefördert haben. Meiner Schwester für den Rückhalt in allen Lebenslagen sowie meiner gesamten Familie.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden danken, die immer wieder für Abwechslung und viel Lebensfreude gesorgt haben.

Mein Dank gilt außerdem der DFG und dem Graduiertenprogramm GRK *Biologicals* 1172/FIRST, ohne deren finanzielle Unterstützung die Durchführung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

VIII. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den

Stephan Schultze-Straßer