

**Genfallen-Vektoren als alternativer  
Gentherapieansatz zur Behandlung monogener  
Erkrankungen des hämatopoetischen Systems**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie,  
Chemie und Pharmazie (FB14) der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von Carolin Janina Nowak  
aus Mosbach

Frankfurt am Main 2015

(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14)

der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek

Prof. Dr. Harald von Melchner

Datum der Disputation:

*„Ich kann, weil ich will, was ich muss.“*

Immanuel Kant





2.11.1	Plasmid für Subklonierungen .....	37
2.11.2	Helfer-Plasmide.....	37
2.11.3	$\gamma$ -retrovirale Plasmide.....	37
2.12	Oligonukleotide.....	38
2.12.1	Primer für qPCR.....	38
2.12.2	Genspezifische Primer zum Nachweis von Fusionstranskripten (5'RACE) .....	38
2.12.3	Primer zum Nachweis des Provirus auf genomischer Ebene.....	38
2.12.4	Primer für Klonierung.....	38
2.12.5	Primer für Sequenzierung und Kolonie-PCR.....	39
2.12.6	Primer für Genotypisierung der X-SCID-Mäuse.....	39
3	Methoden.....	41
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	41
3.1.1	Arbeiten mit Bakterien .....	41
3.1.2	Arbeiten mit DNA.....	42
3.1.3	Arbeiten mit RNA.....	45
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	46
3.2	Zellbiologische und virologische Methoden .....	49
3.2.1	Arbeiten mit Zelllinien .....	49
3.2.2	Produktion $\gamma$ -retroviraler Partikel.....	51
3.2.3	Durchflusszytometrie.....	53
3.2.4	<i>In vitro</i> Proliferations-Assay mit primären T-Zellen aus der Maus.....	54
3.3	Tierexperimentelle Methoden.....	55
3.3.1	Arbeiten mit primären Mauszellen.....	55
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	57
3.4.1	Stimulation der Zellen und Herstellung von Zelllysaten .....	57
3.4.2	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	58
4	Ergebnisse .....	61
4.1	Evaluierung von Genfallen-Vektoren <i>in vitro</i> .....	61
4.1.1	Analyse unterschiedlicher Genfallen-Vektoren in murinen embryonalen Stammzellen .....	61

4.1.2	Validierung des GT-Vektors mit Hilfe eines artifiziell nachgebildeten Genfalleneignisses.....	64
4.1.3	Expansion genmodifizierter Zellen mit Hilfe eines induzierbaren Selektionssystems .....	66
4.1.4	Rekonstitution einer <i>IL2RG</i> <sup>-/-</sup> -Zelllinie.....	72
4.1.5	Re-Expression von IL2RG in <i>IL2RG</i> <sup>-/-</sup> -Zellen führt zu einem Wachstumsnachteil und Verlust der positiven Zellen .....	77
4.1.6	Molekulargenetische Untersuchung von GT-mIL2RG Genfallen-Integrationen .	78
4.2	Evaluierung von Genfallen-Vektoren <i>in vivo</i> .....	80
4.2.1	<i>Ex vivo</i> Gentherapie von <i>IL2RG</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	80
5	Diskussion .....	95
5.1	Das Effizienzproblem von Genfallen-Vektoren.....	95
5.1.1	Optimierungsvorschläge .....	98
5.2	Vermeiden von aberrantem Spleißen im Kontext der Gentherapie .....	101
5.3	Aussichtsreiche Alternativen für die Gentherapie.....	103
5.4	Weitere Möglichkeiten zur Überprüfung der Funktionalität von Genfallen-Vektoren .....	107
	Literaturverzeichnis.....	111
	Anhang.....	127
	Abkürzungsverzeichnis .....	129
	Kongressbeiträge .....	133
	Danksagung.....	135
	Eidesstaatliche Erklärung .....	137
	Lebenslauf .....	139





## Zusammenfassung

Eine Erkrankung wird als monogen bezeichnet, wenn sie auf einen Gendefekt eines einzelnen Gens zurückzuführen ist. Durch einen angeborenen Gendefekt kann bei den sog. primären Immundefekten (PIDs) das Immunsystem von asymptomatisch bis lebensbedrohlich mehr oder weniger stark beeinträchtigt werden. Für lebensbedrohliche Immundefekte gilt die allogene Stammzelltransplantation eines passenden Spenders als einzig kurative Therapie. Weil jedoch für etwa 30 % aller Patienten kein passender Spender verfügbar ist, bietet die Gentherapie in Kombination mit einer autologen Stammzelltransplantation eine häufig lebensrettende Alternative. Dabei werden patienteneigene CD34<sup>+</sup>-Blutstammzellen isoliert, *ex vivo* mit einer funktionalen Kopie des defekten Gens genetisch modifiziert und anschließend zurück in den Patienten infundiert. Die dabei eingesetzten Genfähren basieren in der Regel auf viralen Vektoren, mit denen das gesunde Gen in die Patientenzellen eingeschleust wird. Retrovirale Vektoren wurden für die Gentherapie am häufigsten eingesetzt.

In mehreren klinischen Gentherapie-Studien zur Behandlung diverser PIDs kam es aufgrund insertionsbedingter Transaktivierung benachbarter Proto-Onkogene zur Leukämieentwicklung. Deswegen wurde gezielt an der Sicherheit retroviraler Genfähren gearbeitet. Insbesondere wurden die in der ersten Generation benutzten retroviralen Promotor/*Enhancer*-Elemente aus der U3-Region des 5' LTRs deletiert (*self-inactivating*, SIN-Vektoren) und durch interne, gewebespezifische Promotoren ersetzt. Auf Genfallen basierende Vektoren (*gene trap*, GT-Vektoren) könnten eine sicherere Alternative zu den Standardvektoren bieten, weil sie zum einen auf den  $\gamma$ -retroviralen SIN-Vektoren basieren und zum anderen keinen internen Promotor enthalten, der zur Transaktivierung benachbarter Gene führen kann. Bei GT-Vektoren wird das integrierte Transgen von endogenen Promotoren kontrolliert, was zu einer robusteren Transgenexpression und zu einem erhöhten Sicherheitsprofil führen sollte.

Ziel dieser Arbeit war, GT-Vektoren hinsichtlich ihres Potentials als Vektoren für die Gentherapie zu bewerten. Dafür wurde zunächst die Gentransduktionseffizienz unterschiedlicher GT-Vektoren in murinen, embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) untersucht. In einem klassischen GT-Vektor ist das Therapiegen von einem 5' liegenden Spleißakzeptor (SA) und einer 3' liegenden Polyadenylierungssequenz (pA) flankiert. Dies bewirkt, dass das Therapiegen nach Integration in ein exprimiertes Gen als Fusionstranskript mit den 5' liegenden endogenen Genfragmenten exprimiert wird. Sind diese kodierend, entsteht ein Fusionsprotein, das die Funktionalität des Therapiegens beeinträchtigen kann. Zu Vermeidung einer derartigen Konstellation wurden drei Strategien zur Verhinderung N-terminaler Fusionen getestet: Die Fusion (i) einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) und (ii) eines viralen Proteinspaltungspeptids (T2A) an das 5' Ende des Therapiegens sowie (iii) die Insertion von

drei Stop-Codons hinter den SA. Die Versuche in mES-Zellen zeigten, dass die GT-Variante mit den Stop-Codons am effizientesten war, weshalb sie für alle weiteren Ansätze verwendet wurde.

Dieser Arbeit vorangegangen war die Entwicklung einer Genfallenstrategie zur Korrektur des septischen Granulomatose (X-CGD) verursachenden gp91<sup>phox</sup> (*CYBB*)-Gendefektes in einer gp91<sup>phox</sup>-defizienten Leukämiezelllinie (PLB-XCGD). Obwohl Genfallen transduzierte PLB-XCGD-Zellen das Therapiegen gp91<sup>phox</sup> exprimierten, war diese Expression im Vergleich zu den mit einem positiven, Promotor-enthaltenden Kontrollvektor (FES-gp91<sup>phox</sup>) transduzierten Zellen sehr gering. Deswegen war es notwendig eine effiziente Selektionsstrategie für Genfallenereignisse in hämatopoetischen Zellen zu entwickeln. Eine Strategie basierte auf einem FKBP12/Thrombopoetinrezeptor-Fusionsprotein, dessen Expression in hämatopoetischen BaF3 Zellen eine 25-fache Anreicherung von Genfallen exprimierenden Zellen nach Zugabe des chemischen Liganden AP20187 ermöglichte. Allerdings konnte dieses System in primären, hämatopoetischen Zellen leider nicht etabliert werden.

Die andere Selektionsstrategie basierte auf dem X-SCID Krankheitsmodell, in dem *IL2RG*-Mutationen, einer Untereinheit verschiedenster Zytokinrezeptoren (z. B. des IL-2-Rezeptors), zu einem kompletten Verlust von T-Zellen und somit zur Reduktion funktionaler B-Zellen führen. Nach *ex vivo* Korrektur und Transplantation der korrigierten, autologen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), kann eine Expansion der *IL2RG* exprimierenden T-Zellen erzielt werden. Initiale Versuche wurden an der *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Zelllinie ED-7R *in vitro* durchgeführt. Nachdem über die durchflusszytometrische Analyse der pSTAT5-Expression eine Aktivierung des *IL2RG*-abhängigen Signalweges in GT-*IL2RG*-Genfallen transduzierten ED-7R-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde in einem X-SCID-Mausmodell (*IL2RG*<sup>-/-</sup>) überprüft, ob es zu der erwarteten Anreicherung von *IL2RG* exprimierenden T-Zellen nach Transplantation autologer GT-*IL2RG* transduzierter HSZ kommt. Dabei wurde sowohl die immunologische Rekonstitution der Mäuse als auch die Funktionalität der rekonstituierten Lymphozyten untersucht. In der GT-Gruppe konnte nach Transplantation genetisch modifizierter Zellen weder ein Unterschied der absoluten Zahl an Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen) im Blut, noch ein erhöhter Prozentsatz der verschiedenen Lymphozyten-subpopulationen in KM, Milz oder Thymus beobachtet werden. Lediglich im Thymus einer Maus aus der GT-Gruppe konnten *IL2RG* exprimierende Zellen nachgewiesen werden. Andererseits konnten aus der Milz transplantierte GT-Mäuse T-Zellen isoliert werden, die nach Interleukin-2-Stimulation STAT5-Phosphorylierung aufwiesen, was eine erfolgreiche obgleich geringe GT-*IL2RG* Transduktion belegt. Durch die Beurteilung des *Engraftments*, also des Anwachsens der transplantierten Spenderzellen im Empfängerorganismus, konnte gezeigt werden, dass die niedrigere *IL2RG*-Rekonstitutionseffizienz durch Genfallen nicht auf einem

suboptimalen *Engraftment*, sondern auf einer zu geringen Anzahl an produktiven Genfallenereignissen beruht.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass Genfallen zu diesem Zeitpunkt keine realistische Alternative gegenüber konventionellen Gentherapievektoren zur Korrektur monogener Bluterkrankungen bieten. Neue Entwicklungen, die eine Genkorrektur mittels sog. „Designer Endonukleasen“ vor Ort ermöglichen, werden sicherlich in der nahen Zukunft sämtliche, beliebig ins Genom integrierende Gentherapievektoren ersetzen.



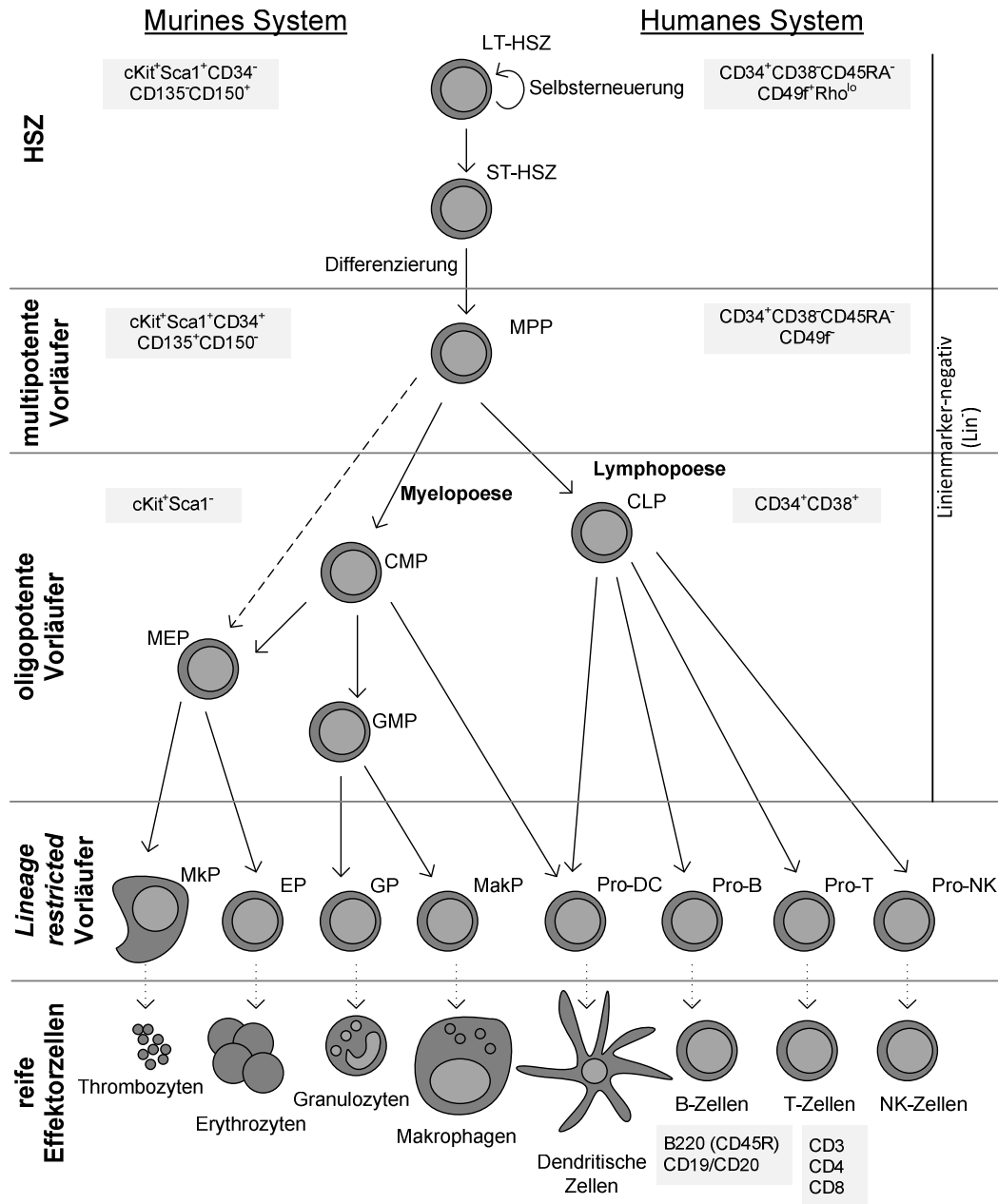
# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

Die Bildung der Blutzellen aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark (KM) wird als Hämatopoese bezeichnet. Da viele Blutzellen nur eine begrenzte Lebensdauer aufweisen, regeneriert sich das adulte Blutsystem täglich um etwa  $2 \times 10^{11}$  Erythrozyten und  $10^{10}$  Leukozyten [1]. Die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) besitzen zum einen die Fähigkeit sich lebenslang selbst zu erneuern, zum anderen können sie in alle hämatopoetischen Zelllinien differenzieren. Im Verlauf der Differenzierung in reife Blutzellen nimmt ihre Selbsterneuerungskapazität ab, das Proliferationspotential jedoch zu. Zur Identifizierung und Abgrenzung der einzelnen Zellpopulationen dienen Oberflächenmerkmale (*cluster of differentiation*, CD), anhand derer die Zellen bestimmten Differenzierungsstadien zugeordnet werden können. In Abb. 1.1 ist eine Übersicht der adulten murinen und humanen Hämatopoese sowie der damit assoziierten wichtigsten Oberflächenmarker dargestellt.

An der Spitze der hämatopoetischen Hierarchie befinden sich die HSZ, die in (i) *long-term* HSZ (LT-HSZ), die das Blutsystem lebenslang regenerieren, und (ii) *short-term* HSZ (ST-HSZ) mit eingeschränktem Selbsterneuerungs- und erhöhtem Proliferationspotential unterteilt werden. Letztere differenzieren zunächst in multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*, MPP) und danach über weitere Vorläuferstufen in reife Effektorzellen der lymphatischen oder der myeloischen Linie, die alle eine spezialisierte Funktion ausüben. Zu den Effektorzellen der lymphatischen Linie zählen B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Zu den Effektorzellen der myeloischen Linie gehören Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen. In der murinen Hämatopoese wird im Gegensatz zur humanen bei der Differenzierung in Thrombozyten und Erythrozyten das Stadium des myeloischen Vorläufers (*common myeloid progenitor*, CMP) übersprungen, d.h. aus einem MPP entsteht direkt ein megakaryozytär-erythroider Vorläufer (*megakaryocyte-erythroid progenitor*, MEP) [2]. Dendritische Zellen (DC), die in den peripheren Geweben Antigene aufnehmen, diese den Lymphozyten in den lymphatischen Organen präsentieren und naive T-Zellen aktivieren, können sich als einzige Population aus beiden Linien entwickeln (Abb. 1.1) [3]. Alle Zellen, die sich in Vorläuferstadien befinden exprimieren noch keinen spezifischen Linienmarker und werden in ihrer Gesamtheit als Linienmarker negative ( $\text{Lin}^-$ ) Zellen bezeichnet. Im murinen System können HSZ zusätzlich über die Expression des Stammzellfaktorrezeptors (CD117, cKit) und des Stammzellantigens-1 (Sca-1) von den reiferen Vorläuferzellen abgegrenzt werden (Abb. 1.1). Bei der humanen Hämatopoese wird häufig der Oberflächenmarker CD34 zur Anreicherung von LT-HSZ benutzt, die Grundlage für erfolgreiche Stammzelltransplantationen sind [4,5]. In

Transplantationsexperimenten konnten die HSZ aufgrund weiterer Oberflächenmarker noch enger umgrenzt werden [6]. Basierend auf einem Immunphänotyp dem insgesamt sechs unterschiedliche Oberflächenmarker zugrunde liegen, können humane LT-HSZ zurzeit erfolgreich angereichert werden (Abb. 1.1) [7–10].



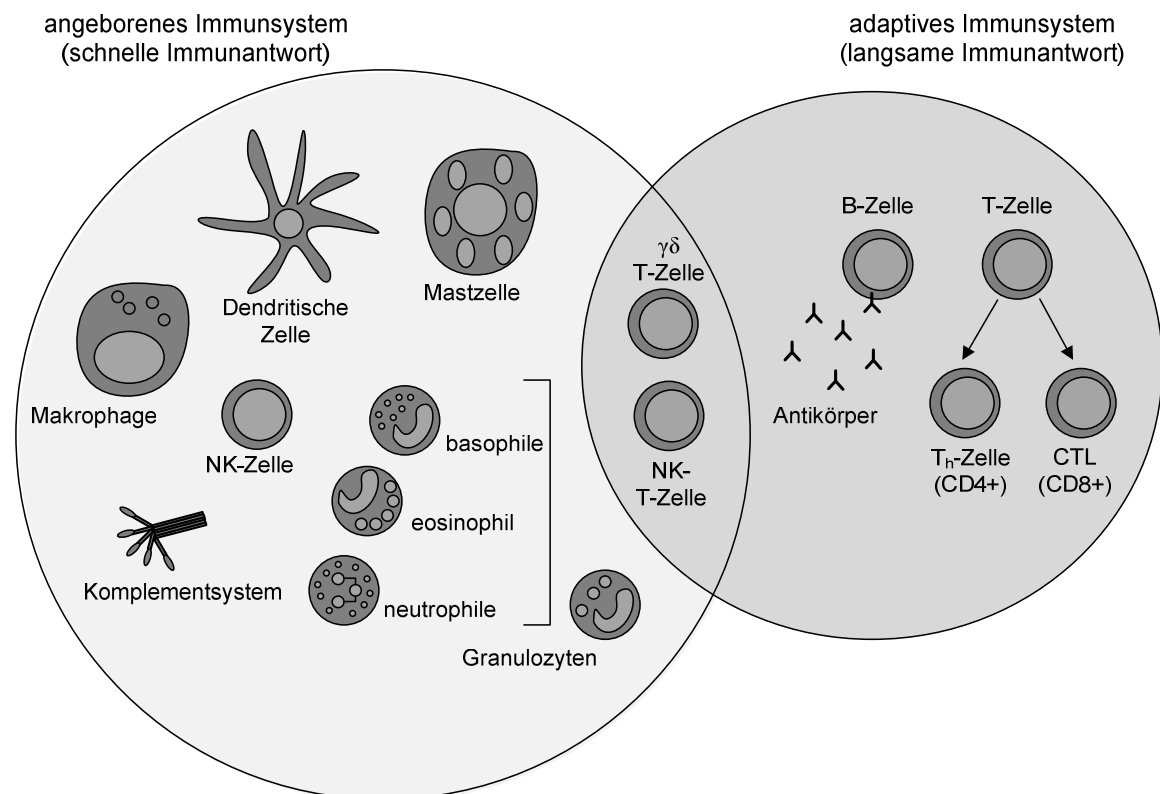
**Abb. 1.1: Hierarchie der adulten murinen und humanen Hämatopoese**

Die wichtigsten phänotypischen Oberflächenmarker der Zellpopulationen für das murine und humane System sind in den grauen Kästchen angegeben.

HSZ: hämatopoetische Stammzelle, LT-HSZ: *long term* HSZ, ST-HSZ: *short term* HSZ, MPP: multipotenter Vorläufer, MEP: megakaryozytär-erythroider Vorläufer, CMP: myeloischer Vorläufer, CLP: lymphatischer Vorläufer, GMP: granulozytär-monozytärer Vorläufer, Pro-: Vorläuferstadium, MkpP: megakaryozytärer Vorläufer, EP: erythroider Vorläufer, GP: granulozytärer Vorläufer, MakP: makrophagischer Vorläufer, DC: dendritische Zelle, NK: natürliche Killerzelle, CD: *cluster of differentiation* (modifiziert nach [2]).

## 1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor pathogenen Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Pilzen, Parasiten und unterschiedlichen Toxinen. Bei Vertebraten wird aufgrund der Geschwindigkeit und Spezifität einer Immunantwort zwischen angeborenem und erworbenem (adaptiven) Immunsystem unterschieden (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Übersicht über die verschiedenen Zelltypen des Immunsystems**

Das angeborene Immunsystem besteht aus dem Komplementsystem, Makrophagen, Mastzellen, DCs, NK-Zellen und Granulozyten (basophile, eosinophile und neutrophile). Zum adaptiven Immunsystem gehören B-Zellen,  $CD4^+$ - $T_H$ -Zellen sowie  $CD8^+$ -CTL und von B-Zellen produzierte Antikörper. Natürliche Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen) und  $\gamma\delta$ -T-Zellen bilden die Schnittstelle zwischen beiden Systemen.

NK-Zelle: natürliche Killerzelle  $T_H$ -Zelle: T-Helferzelle, CTL: zytotoxische T-Zelle, CD: *cluster of differentiation* (modifiziert nach [11]).

### 1.2.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem gilt als „erste Verteidigungslinie“ gegen Infektionen durch pathogene Erreger, weil es schnell und unspezifisch auf die Eindringlinge reagiert. Diese unspezifische Immunreaktion bedient sich löslicher Faktoren (z. B. Proteine des Komplementsystems) und zellulärer Komponenten (Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, DC, NK-Zellen), die über Phagozytose oder direktes Töten die Eindringlinge neutralisieren. Dies geschieht unter anderem über präexistierende Rezeptoren, die innerhalb weniger Minuten in Gegenwart von Mikroorganismen eine Entzündungsreaktion auslösen können [12].

Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören:

### **Neutrophile Granulozyten**

Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Abwehr gegen mikrobielle Erreger. Zirkulierende neutrophile Granulozyten werden prompt zur Infektionsstelle rekrutiert und aktiviert. Diese Rekrutierung wird zum einen durch die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle (z. B. E-Selektin) auf Endothelzellen und zum anderen durch die Wechselwirkung zwischen auf neutrophilen Zellen exprimierten Rezeptoren (z. B. Interleukin-8-(IL-8)Rezeptor) und proinflammatorischen Chemokinen (z. B. IL-8, TNF- $\alpha$ ) am Infektionsherd vermittelt [13]. Dies löst eine Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes aus, während der die Erreger phagozytiert und intrazellulär durch Sauerstoff-abhängige („oxidativer Burst“) und Sauerstoff-unabhängige (Freisetzung toxischer Proteine, z. B. Myeloperoxidase, aus spezialisierten, zytoplasmatischen Vesikeln sog. Granula der Zellen) Mechanismen zerstört werden [14].

### **Eosinophile Granulozyten**

Sie schützen den Organismus vor Parasiten. Durch die Freisetzung zytotoxischer Proteine und Enzyme werden die Parasiten abgetötet. Beispiele für Komponenten der eosinophilen Granula sind das *Major Basic Protein* oder das eosinophile kationische Protein [14].

### **Mastzellen und basophile Granulozyten**

Es gibt zwei unterschiedliche Populationen von Mastzellen, die sich bezüglich ihrer enzymatischen Zusammensetzung und Gewebelokalisation unterscheiden. Schleimhautmastzellen enthalten Trypsin, während Bindegewebsmastzellen neben Trypsin auch Chymotrypsin enthalten [14].

Basophile Granulozyten ähneln Mastzellen, sowohl morphologisch als auch funktional. Wie auch die Mastzellen enthalten basophile Granulozyten Granula mit Histamin, Heparin und anderen Botenstoffen, die in der Pathogenese von Allergien eine wesentliche Rolle spielen.

### **Komplementsystem**

Zum Komplementsystem zählen bisher über 30 verschiedene Proteine, die sich ergänzend (komplementierend) an der Mikroorganismenabwehr beteiligen. Die Hauptaufgabe besteht darin, pathogene Mikroorganismen durch Beschichtung als fremd zu markieren und dadurch einer Phagozytose zugänglich zu machen.

### **NK-Zellen**

Sie gehören zu den Lymphozyten, besitzen aber keinen spezifischen Antigenrezeptor. NK-Zellen erkennen virusinfizierte Zellen oder auch Tumorzellen über Oberflächenrezeptoren, die entweder hemmend oder aktivierend auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wirken können [13]. Der aktivierende Rezeptortyp löst das Abtöten der entsprechenden Zielzelle



durch Freisetzung zytotoxischer Proteasen wie Perforine und Granzyme aus. Die hemmenden Rezeptoren erkennen Klasse I Histokompatibilitätsantigene (*major histocompatibility complex*, MHC) auf der Zelloberfläche der Zielzellen. Alle Körperzellen exprimieren MHC Klasse I-Moleküle. Erkennt eine NK-Zelle diese normale Expression auf Zellen, wird sie davon abgehalten die Zielzelle abzutöten. Ist deren Expression jedoch herunter reguliert oder gar komplett abwesend („*missing-self*“-Hypothese), wird die zytotoxische Kaskade der NK-Zellen aktiviert [15].

### **Makrophagen**

Sie stammen von Vorläuferzellen, den sog. Monozyten im KM ab. Diese Monozyten wandern in die Blutbahn und zirkulieren durch den Körper. Nach Kontakt mit infiziertem Gewebe differenzieren sie dort zu Makrophagen, die durch Phagozytose Mikroorganismen beseitigen. Nach Phagozytose werden die Bestandteile des Erregers mit einem MHC-Molekül der Klasse II verbunden und an der Oberfläche der Makrophage präsentiert. Diese Antigenpräsentation aktiviert über einen Ko-Stimulus die T-Zellen. Somit sind Makrophagen für die Immunabwehr von großer Bedeutung. Makrophagen beseitigen jedoch auch körpereigene Abbauprodukte und Zellabfälle (Fresszellen). Je nach Lokalisation in bestimmten Geweben haben Makrophagen dann spezielle Namen, so heißen sie in der Leber z. B. Kupffer-Zellen oder im Knochen Osteoklasten [13].

### **Dendritische Zellen (DC)**

Sie gehören neben den Makrophagen zu den sog. „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC). Sie wirken als Boten zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Man findet sie vor allem in Geweben, die mit der Umwelt in Kontakt stehen, wie z. B. der Haut (Langerhans-Zellen) oder der Lunge. Nach Einwanderung in sekundäre lymphatische Gewebe können DCs dort naive T-Zellen durch Ausschüttung von Zytokinen (z. B. IL-12) zu T-Effektorzellen aktivieren und damit eine spezifische Immunantwort auslösen [13].

## **1.2.2 Adaptives Immunsystem**

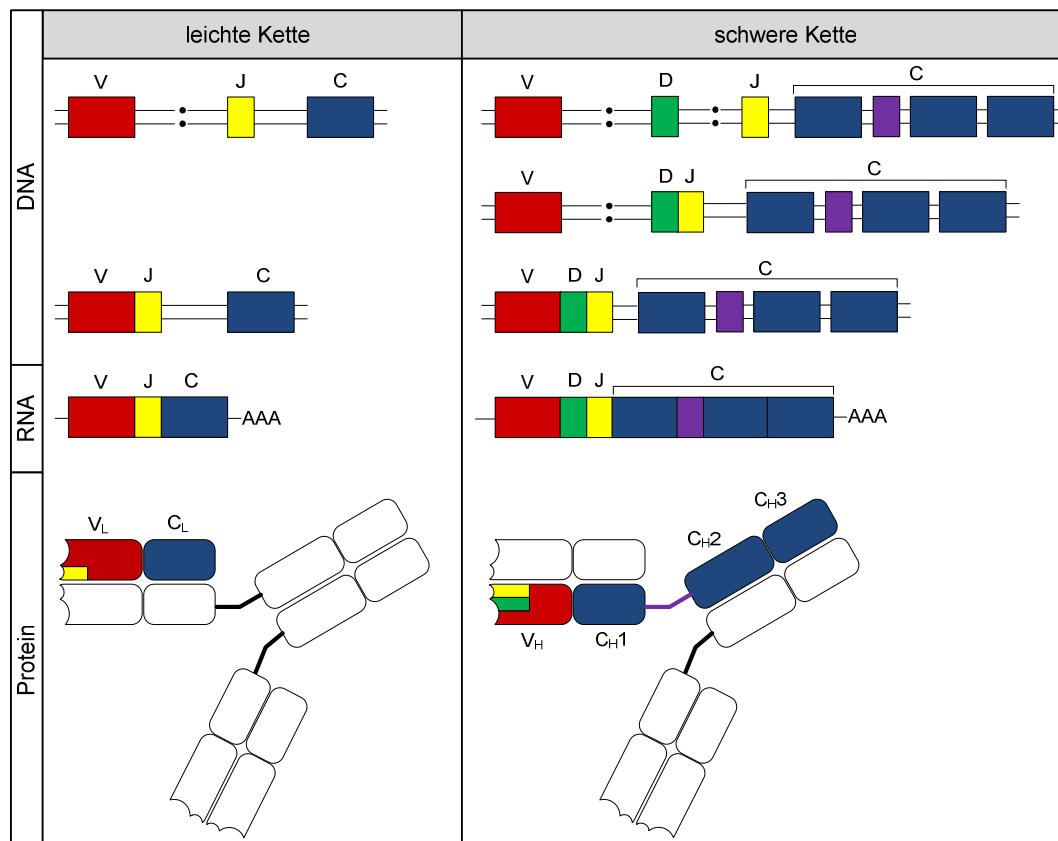
Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems resultiert in einer langsameren aber sehr spezifischen Immunantwort, die sich durch ein langlebiges immunologisches Gedächtnis auszeichnet. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören die Antikörperproduzierenden B-Zellen und die T-Zellen, die sich aus Helfer-CD4<sup>+</sup>-T<sub>h</sub> und zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-CTL zusammensetzen. Die Reifung beider Zelltypen findet in den primären lymphatischen Organen, dem KM und dem Thymus statt. Diese beiden Organe stellen eine spezialisierte Mikroumgebung aus Stroma-Zellen zur Verfügung, die für die Entwicklung von B-Zellen im KM sowie für T-Zellen im Thymus essenziell ist [16]. Hierbei spielen das *C-X-C motif chemokine 12* (CXCL12) und das Zytokin Interleukin-7 (IL-7) bei der Entwicklung von

B-Zellen im KM [17,18] und der Reifung von T-Zellen im Thymus [19] eine wichtige Rolle. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählt neben Milz und Lymphknoten auch das Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe (*mucosa associated lymphoid tissue*, MALT). Das MALT besteht aus einem System knotenförmiger Ansammlungen von Lymphozyten, zu dem auch das darmassoziierte lymphatische Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) gehört. Naive Lymphozyten zirkulieren permanent durch die Peripherie und treffen in den sekundären lymphatischen Organen auf Antigene, die zur Aktivierung und klonalen Expansion der entsprechenden Antigenrezeptor-exprimierenden Lymphozyten führen.

Die hohe Diversität der Antigenrezeptoren beruht auf einer Rekombination von Gensegmenten (V(D)J-Rekombination, Abb. 1.3), die das Repertoire der B- und T-Zell-Rezeptoren sowie die Struktur eines von B-Zellen produzierten Immunglobulinmoleküls, dem sog. Antikörper (AK) bestimmt. Dabei wird die DNA der leichten und schweren Ketten durch zufällige Auswahl unterschiedlicher DNA-Abschnitte rekombiniert. Vor dieser Umlagerung liegen die Gensegmente für die variable Region (V) relativ weit entfernt von denen für die konstante Region (C). Durch die Verknüpfung einzelner Gensegmente wird die ungeordnete V-Region einem Genabschnitt der C-Region bis auf ein Intron nahe gebracht und kann nach der Transkription durch RNA-Spleißen verknüpft werden.

Die V-Regionen beider Ketten setzen sich aus verschiedenen Abschnitten zusammen. Im Fall der leichten Kette sind dies V- und J-Segmente (*joining*, verbindend) (Abb. 1.3 links), im Fall einer schweren Kette V-, J- und D-Segmente (*diversity*, Vielfalt) (Abb. 1.3 rechts). Von jedem dieser Segmente existieren mehrere Varianten im Genom und jeweils eine davon findet sich im fertigen Gen wieder. Ein V- und ein J-Gensegment werden so zusammengefügt, dass ein vollständiges Exon für die variable Region einer leichten Kette ( $V_L$ ) entsteht. Ein separates Exon kodiert die konstante Region der leichten Kette ( $C_L$ ) (Abb. 1.3 links).

Bei der Bildung der schweren Kette werden zuerst das D- und das J-Segment miteinander verknüpft. An die DJ-Sequenz wird dann das V-Gensegment angefügt und es entsteht ein vollständiges  $V_H$ -Exon. Das Gen für die konstante Region der schweren Kette wird von drei Exons ( $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$ ) kodiert, die nach Transkription an die variable Domäne gespleißt werden und zusammen mit einer Gelenkregion (lila) die schwere Kette eines AKs bilden (Abb. 1.3 rechts, Abb. 1.4 blau).



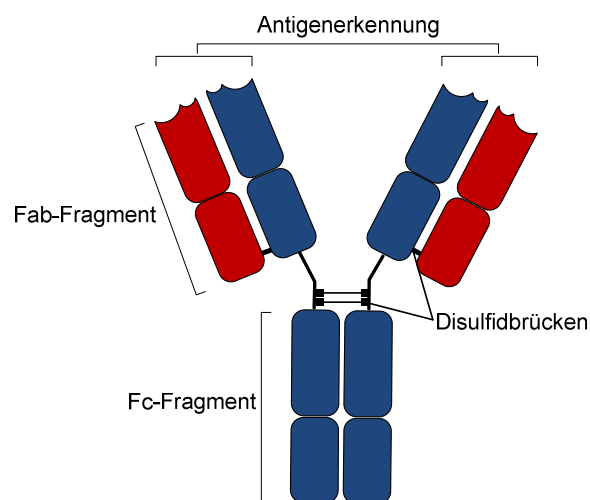
**Abb. 1.3: V(D)J-Rekombination**

Gene der variablen Regionen werden aus unterschiedlichen Segmenten aufgebaut. Näher erläutert im Text.

V: variable Region, J: joining, D: diversity, C: konstante Region, VL: variable Region der leichten Kette, CL: konstante Region der leichten Kette, VH: variable Region der schweren Kette, CH1, CH2 und CH3: konstante Region der schweren Kette, AAA: Poly(A)-Schwanz der RNA (modifiziert nach [13]).

## B-Zellen

Naive B-Zellen zirkulieren durch das periphere Blut und die lymphatischen Organe. Nach direktem Kontakt mit einem löslichen Antigen durch den spezifischen BCR, vernetzen sich BCRs auf der Zelloberfläche und B-Zellen wandern zu den sog. Keimzentren in den Lymphknoten, wo sie stark proliferieren. Nach dieser klonalen Expansion differenzieren sie über mehrere Stadien (pro-, prä- und reife B-Zelle) zu Plasmazellen. Diese Plasmazellen produzieren und sezernieren eine große Menge an hoch affinen AK (Abb. 1.4), die im Rahmen der humoralen Immunantwort die passenden Antigene erkennen, binden und neutralisieren.



**Abb. 1.4: Struktur eines Antikörpers**

Jedes Immunglobulinmolekül ist Y-förmig und besteht aus zwei schweren (blau) und zwei leichten Ketten (rot), die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Das Fab-Fragment eines AK bindet Antigene und enthält die variablen Regionen. Der Fc-Teil lässt sich leicht kristallisieren, enthält die konstanten Regionen und bestimmt den Isotyp eines AK.

Fab: *fragment antigen binding*, Fc: *fragment crystallizable* (modifiziert nach [13]).

Anders als der T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) (Abb. 1.5) weist der B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor*, BCR) eine Immunglobulin-Struktur auf und besitzt daher, wie ein AK zwei Antigenbindungsstellen (vgl. Abb. 1.4). Zusätzlich zu diesem Immunglobulin an der Zelloberfläche besitzt der BCR-Komplex intrazelluläre Signalmoleküle, die für die Signalweiterleitung verantwortlich sind. Die Erkennung und Bindung des Antigens reicht jedoch noch nicht in jedem Fall aus, um eine B-Zelle vollständig zu aktivieren. Je nach Antigen müssen B-Zellen zusätzlich durch ein ko-stimulatorisches Signal von  $T_H$ -Zellen aktiviert werden. Dies geschieht über eine ebenfalls in den Keimzentren stattfindende T-/B-Zellinteraktion. Während der die B-Zelle Peptide des internalisierten Antigens zusammen mit dem MHC-II-Komplex der  $T_H$ -Zelle präsentiert. Letztere schüttet dann Zytokine (z. B. IL-2, IL-4 und IL-5) aus, die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle stimulieren. Ein weiteres Signal erfolgt über die Interaktion zwischen dem B-Zell-Rezeptor CD40 und dessen Liganden CD40L, der von  $T_H$ -Zellen exprimiert wird [14]. Während der B-Zellaktivierung findet der Prozess der somatischen Hypermutation statt, wobei zufällig gesetzte Mutationen in den V-Genen die Diversität der BCRs erhöht. Die B-Zelle mit höchster Antigenaffinität proliferiert am effizientesten und produziert die wirkungsvollsten AKs. Diese gehören zunächst der Immunglobulin M (IgM) Klasse an, durchlaufen dann aber verschiedene Klassenwechsel durch eine ungeordnete Rekombination (vgl. Abb. 1.3) der variablen und konstanten Immunglobulin-Segmente, die zur Produktion von IgG, IgA und IgE führen [13].

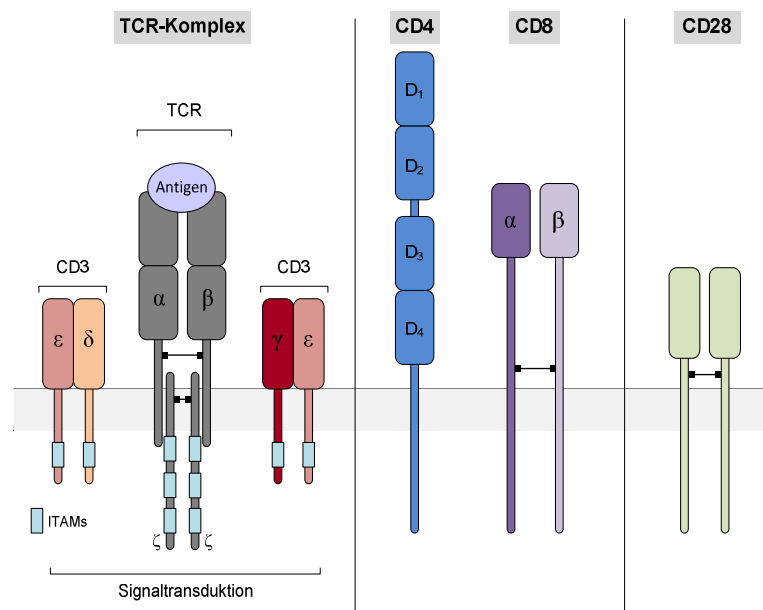
## T-Zellen

T-Zellen sind Bestandteil der zellulären Immunität. Nach Aktivierung durch die Bindung eines Antigens differenzieren naive T-Zellen zu unterschiedlichen Effektorzellen. Der TCR

besitzt im Gegensatz zum BCR nur eine Antigenbindungsstelle und ähnelt einem membranständigen Fab-Fragment eines AKs (vgl. Abb. 1.4). In Abb. 1.5 ist der TCR-Komplex schematisch dargestellt. Der TCR besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette mit extrazellulär gelegenen hoch variablen Regionen, die für die Antigenerkennung und -bindung verantwortlich sind und kurzen zytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bestehend aus konstanten Regionen, die für die intrazelluläre Signalweiterleitung wichtig sind. Die  $\alpha$ -Kette besteht aus V- und J-Gensegmenten und die  $\beta$ -Kette aus V-, J- und D-Gensegmenten. Ein Homodimer aus  $\zeta$ -Ketten dient zusammen mit dem CD3-Komplex (bestehend aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette sowie zweier  $\epsilon$ -Ketten) (Abb. 1.5) der Signaltransduktion.

Ferner exprimieren T-Zellen die CD4 und CD8 Ko-Rezeptoren (Abb. 1.5), die die Bindung an MHC-Molekül exprimierende APCs ermöglichen. MHC-Moleküle binden Peptidfragmente von Antigenen und präsentieren diese den Zellen was zu einer T-Zellproliferation führt. Während der CD4-Rezeptor MHC Klasse II Moleküle bindet, erkennt CD8 Klasse I. Nach Aggregation des TCR-Komplexes mit CD4 bzw. CD8 werden intrazellulär Signalübertragende Tyrosinkinasen phosphoryliert und dadurch aktiviert.

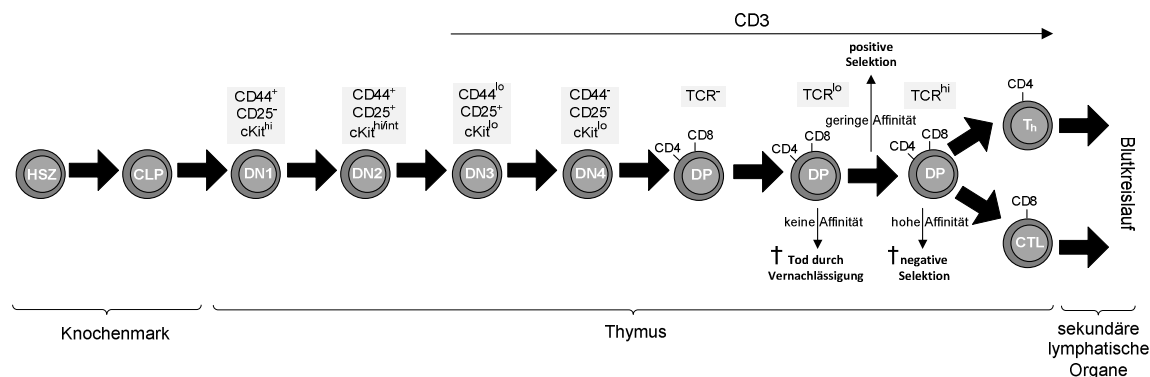
Die Signalgebung durch den TCR-Komplex reicht jedoch nicht aus, um eine naive T-Zelle zu aktivieren. APCs tragen kostimulierende Liganden (z. B. B7.1 und B7.2), die während der Antigenstimulation gleichzeitig mit kostimulierenden Rezeptoren auf der T-Zelle interagieren können. Somit wird sichergestellt, dass naive T-Zellen nur von APCs und nicht von anderen Zellen, die zufällig das Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, aktiviert werden können. CD28, der die B7-Moleküle bindet, ist einer von drei kostimulatorischen Rezeptoren (CD28, CD54 und CD2), die für die T-Zellproliferation, die Zytokinproduktion und das Überleben der T-Zellen essenziell sind (Abb. 1.5). Bindet z. B. eine naive T-Zelle ein Antigen über den MHC-Komplex und die Interaktion zwischen CD28 und dem Liganden B7.1 auf einer APC fehlt, entsteht eine nicht reaktive (anerge) T-Zelle. So kann die Immunantwort kontrolliert abgeschaltet werden, was z. B. bei autoreaktiven T-Zellen passiert, die trotz strenger Selektionsprozesse (vgl. Abb. 1.6) im Thymus, in die Peripherie gelangt sind.



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der auf T-Zellen exprimierten Rezeptoren**

Der funktionale TCR-Komplex besteht aus dem extrazellulär antigenbindenden TCR ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Heterodimer) und einem Komplex aus vier weiteren Signalproteinketten (zwei  $\epsilon$ -Ketten, eine  $\beta$ - und eine  $\gamma$ -Kette) namens CD3. Die T-Zellspezifischen Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 sowie ein exemplarischer kostimulierender Rezeptor (CD28) sind ebenfalls gezeigt. Nähere Erläuterungen im Text (modifiziert nach [13]).

Die Entwicklung der T-Zelle und dem damit verbundenen komplexen Selektionsprozess findet im Thymus statt. Wandert ein lymphatischer Vorläufer (*common lymphoid progenitor*, CLP) aus dem KM in den Thymus, wird durch den *Notch*-Signalweg die Reifung zu einer T-Zelle eingeleitet [20]. Eine Übersicht über die einzelnen Entwicklungsstadien, die eine T-Zelle durchläuft ist in Abb. 1.6 dargestellt. CLPs exprimieren weder CD4 noch CD8 und werden deshalb als doppelt negative Zellen (*double-negative*, DN) bezeichnet. Aufgrund der Expression von CD44, CD25 und cKit können diese DN-Thymozyten in vier weitere Differenzierungsstufen (DN1-DN4) unterteilt werden (Abb. 1.6). Im DN4-Stadium fangen die Zellen an stark zu proliferieren und differenzieren anschließend in doppelt-positive (*double positive*, DP) CD4 und CD8 exprimierende Zellen. Da der TCR durch zufällige Gen-Rekombinationsvorgänge entsteht (*TCR rearrangement*) werden brauchbare T-Zellen aufgrund ihrer Affinität zu MHC-Molekülen selektiert. Dabei dürfen die T-Zellen weder eine zu geringe (Tod durch Vernachlässigung) noch eine zu hohe Affinität (negative Selektion) gegenüber den körpereigenen MHC-Molekülen aufweisen. Nur T-Zellen, deren TCR eine geringe Affinität gegenüber körpereigenen MHC-Molekülen aufweist, überleben und differenzieren. Das Überleben, erzielt durch selektive Bewahrung der DP-Zellen vor Apoptose und anschließender Reifung zu CD4<sup>+</sup> Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>-T<sub>h</sub>) und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen Killer-Zellen (CD8<sup>+</sup>-CTL), bezeichnet man als positive Selektion. Die enddifferenzierten T-Zellen verlassen den Thymus und besiedeln über den Blutkreislauf die sekundären lymphatischen Organe in denen sie vorwiegend ihre Funktion ausüben, wobei T<sub>h</sub>-Zellen B-Zellen und Makrophagen aktivieren, während die CTLs virale Eindringlinge abtöten.



**Abb. 1.6: Entwicklungsstufen der T-Zellen**

Lymphatische Vorläuferzellen wandern aus dem KM in den Thymus ein, wo sie über mehrere Entwicklungsstadien und Selektionsprozesse zu T-Effektorzellen heranreifen. Diese gelangen über den Blutkreislauf in die Peripherie. Nähere Erläuterungen im Text.

HSZ: hämatopoetische Stammzelle, CLP: lymphatischer Vorläufer, DN: *double negative*, DP: *double positive*, CD: *cluster of differentiation*, lo: *low*, hi: *high*, int: *intermediate*, TCR: T-Zellrezeptor, Th: T-Helferzelle, CTL: zytotoxische T-Zelle (modifiziert nach [21]).

Obwohl der Thymus sich nach der Pubertät zurückbildet (Involution), können lebenslang reife T-Zellen mit umfangreichem TCR-Repertoire im peripheren Blut nachgewiesen werden.

Eine kleine Subpopulation von T-Zellen exprimiert einen TCR, der sich nicht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten (Abb. 1.5 links), sondern aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten zusammensetzt. Diese  $\gamma\delta$ -T-Zellen befinden sich hauptsächlich in der Epidermis und spielen möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der Psoriasis [22]. Eine weitere Subpopulation von T-Zellen bilden die NK-T-Zellen, die sowohl den klassischen  $\alpha\beta$ -TCR sowie den typischen NK-Zellen-spezifischen Oberflächenmarker NK1.1 exprimieren und ebenfalls im Thymus heranreifen. Im DP-Stadium der Thymozyten exprimieren NK-T-Zellen einen bestimmten Typ eines T-Zell-Rezeptors. Über dieses sog. CD1d-Molekül erkennen sie im Gegensatz zu klassischen TCRs keine Peptide, sondern Lipidantigene [23]. Im Laufe der Zeit wurden immer mehr CD4<sup>+</sup> T-Zell Subtypen entdeckt, die aufgrund ihrer Zytokinproduktion und Transkriptionsfaktorexpression unterschieden werden. So werden beispielsweise die Gruppe der regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) durch TGF $\beta$  (*transforming growth factor*, TGF) induziert und durch den Transkriptionsfaktor FOXP3 (*forkhead box*, FOX) stabilisiert [16]. Diese T<sub>reg</sub>-Zellen sind maßgeblich an der Inhibition der Immunantwort sowie der Prävention von Autoimmunerkrankungen beteiligt [24]. Weitere bekannte Untergruppen der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind T<sub>h</sub>1, T<sub>h</sub>2, Th9, T<sub>r</sub>1, T<sub>h</sub>17 und T<sub>h</sub> [16].

### 1.2.3 Primäre Immundefekte

Als primäre Immundefekte wird eine Gruppe von seltenen erblichen Krankheiten bezeichnet, die durch einen angeborenen Gendefekt das Immunsystem mehr oder weniger beeinträchtigen. Das klinische Bild von Patienten mit primären Immundefekten ist demnach

sehr heterogen und reicht von asymptomatisch bis lebensbedrohlich [25]. Für lebensbedrohliche Immundefekte gilt die allogene Stammzelltransplantation eines HLA-passenden (*human leukocyte antigen*, HLA) Spenders als Therapie der ersten Wahl [26]. Weil jedoch nur für etwa ein Drittel aller Patienten passende Spender verfügbar sind, bietet die Gentherapie in Kombination mit einer autologen Stammzelltransplantation eine häufig lebensrettende Alternative [27].

### **Septische Granulomatose (CGD)**

Die septische Granulomatose (*chronic granulomatous disease*, CGD) ist eine autosomal-rezessiv oder X-chromosomal vererbte Erkrankung des myeloischen Systems, die sich wegen einer erheblichen Einschränkung der Granulozytenfunktion durch schwere mikrobielle Infekte auszeichnet. Es existieren unterschiedliche Formen von CGD, die jedoch alle eines der für die fünf Untereinheiten des Nikotinamid-Dinukleotidphosphat-Oxidase-Komplexes (NADPH-Oxidase-Komplex) kodierenden Gene betreffen. Die häufigste Form (etwa zwei Drittel aller CGD-Patienten) wird durch Mutationen im X-chromosomalen *CYBB* hervorgerufen, die zu einer Inaktivierung der membranständigen Cytochrom b- $\beta$ -Untereinheit gp91<sup>phox</sup> führt [28]. Dieser Defekt verhindert die von der NADPH-Oxidase vermittelte Produktion von Superoxidradikalen, die normalerweise die Mikroorganismen abtöten. Als Folge davon leiden die Patienten an immer wiederkehrenden, schweren bakteriellen und mykotischen Infektionen.

In den letzten 20 Jahren erhielten in den USA, Deutschland, Vereinigtes Königreich (UK), Frankreich, Korea und Schweiz insgesamt 13 X-CGD Patienten eine Gentherapie, die allerdings nur bedingt erfolgreich war [25]. Davon zeigten 10 Patienten nur einen transienten Behandlungserfolg, der wahrscheinlich durch ein geringes *Engraftment* der transduzierten Zellen verursacht wurde [29]. Nur bei 3 Patienten konnte ein persistenter Erfolg erzielt werden, der aber durch eine klonale Expansion der genetisch veränderten Zellen in Folge von Insertionsmutagenese in bestimmten Genloci (z. B. *EVI1* und *PRDM1*) charakterisiert war. Zusätzlich wurde in den behandelten Patienten eine Herunterregulierung der Transgenexpression (*Silencing*) durch epigenetische Modifikationen des LTR-ständigen SFFV-Promotors (*spleen focus forming virus*, SFFV) beobachtet [30].

### **Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS)**

Das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) wird durch eine Mutation im WAS-Protein (WASp) hervorgerufen, X-chromosomal rezessiv vererbt und manifestiert sich mit unterschiedlichen Symptomen. Dazu zählen Thrombozytopenie, rezidivierende Infektionen, Autoimmunreaktionen, Ekzeme und eine erhöhte Lymphom-Entwicklungstendenz. WASp wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und gilt als Regulator des Aktin-Zytoskeletts, das u. a. für eine stabile Bindung von T-Zellen an APCs essenziell ist [31]. In einer ersten klinischen Studie wurden zwischen den Jahren 2006 bis 2009 in Deutschland 10 Patienten mit einem GALV-pseudotypisiertem (*gibbon ape leukemia virus*, GALV)  $\gamma$ -



retroviralen Vektor nach Konditionierung mit Busulfan behandelt. Obwohl der Immundefekt korrigiert und die Thrombozytopenie in 9 von 10 Patienten reduziert werden konnte, traten nach 1-5 Jahren schwerwiegende Komplikationen auf. Als Folge einer retroviralen Aktivierung des Onkogens *LMO2* entwickelten 7 Patienten eine Leukämie [32]. Bessere Ergebnisse wurden in einer Phase I/II Folgestudie mit 3 Patienten erzielt, die mit verbesserten, lentiviralen Vektoren durchgeführt wurde. Alle drei Patienten konnten klinisch geheilt werden und entwickelten während eines Beobachtungszeitraums von 20 bis 32 Monate keine Anzeichen einer Leukämie [33].

### Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID)

Unter dem Sammelbegriff schwerer kombinierter Immundefekt (*severe combined immunodeficiency*, SCID) werden Krankheiten des lymphoiden Systems zusammengefasst, die alle entweder einen Mangel oder eine Fehlfunktion von T-Lymphozyten aufweisen. Je nach SCID-Form ist nicht nur die zelluläre Immunität beeinträchtigt, sondern auch die von T-Zellen kontrollierten B- und NK-Zellen. Soweit bisher bekannt, kann SCID durch Mutationen in neun unterschiedlichen Genen hervorgerufen werden [34,34]. Dazu gehören Mutationen in Zytokinrezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen wie z. B. Interleukin-2-Rezeptor- $\gamma$  (IL2RG) (vgl. Kapitel 0) und Janus-Kinase-3 (JAK3) oder auch in Genen, die für die Antigenrezeptor-Rekombination essenziell sind wie *RAG-1* und *RAG-2*. Ferner führt eine Mutation im Adenosin-Desaminase (*ADA*) Gen zu einer intra- sowie extrazellulären Akkumulation toxischer Metaboliten, die unter normalen physiologischen Bedingungen während des Abbaus von Nukleinsäuren entstehen und von der Adenosin-Desaminase metabolisiert werden. Diese SCID-Variante, auch als ADA-SCID bekannt, ist mit etwa 15 % weltweit nach X-SCID die zweithäufigste SCID-Variante [25]. Die beiden Patienten die 1990 erstmals eine Gentherapie erhielten, litten an ADA-SCID [35]. Im Gegensatz zu anderen weiter oben erwähnten klinischen Studien kam es bei keiner der bisher durchgeführten ADA-SCID-Studien zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, obwohl 3 von 4 Studien mit vergleichbaren Vektoren durchgeführt wurden [36–38]. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der mit ca. 50 % aller SCID-Formen am häufigsten vorkommenden X-SCID-Variante.

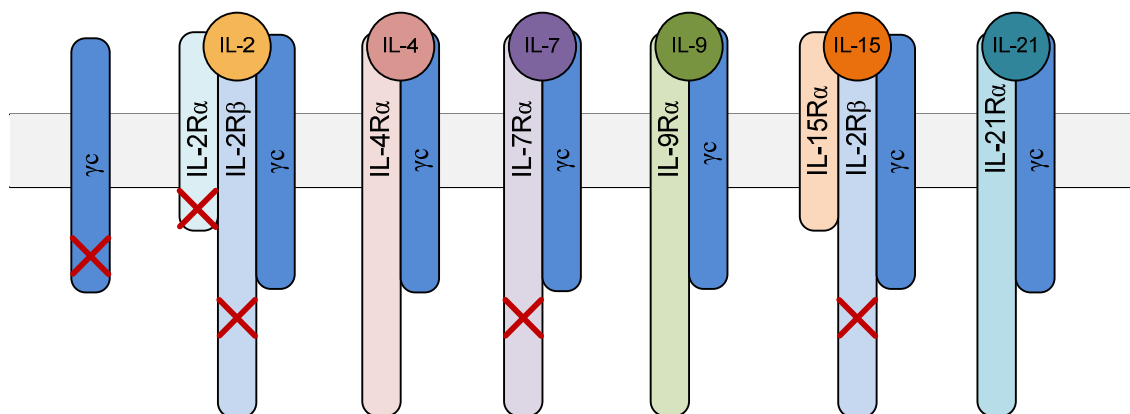
### X-SCID und IL2RG

X-SCID beruht auf einem Defekt der Interleukin-Rezeptor- $\gamma$ -Kette (*common gamma chain*,  $\gamma_c$ ) die Bestandteil aller Typ I Zytokinrezeptoren (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21) ist (Abb. 1.7). Das *IL2RG* Gen befindet sich auf dem X-Chromosom (Xq13.1) und deswegen betrifft die Erkrankung hauptsächlich Männer [39].

$\gamma_c$  ist als Untereinheit der IL-Rezeptoren für zahlreiche Lymphozytenfunktionen von wesentlicher Bedeutung. Der IL-2-Rezeptor ist z. B. für Proliferation und Differenzierung von T-Zellen essenziell, während die zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup>-T- und NK-Zellen vom IL-

21-Rezeptor abhängt. Aber auch B-Zellen sind auf Signale von mehreren  $\gamma$ c-abhängigen Interleukinen angewiesen.

Aufgrund einer geringen Anzahl oder eines kompletten Mangels an T- und NK-Zellen sowie funktionsunfähiger B-Zellen (T<sup>+</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>-</sup>-SCID), leiden X-SCID-Patienten an schwerwiegenden Immundefekten. Mit etwa 1:200.000 Geburten in den USA ist X-SCID der am häufigsten vorkommende vererbte Immundefekt [40]. Ohne eine erfolgreiche Stammzelltransplantation eines passenden HLA-Spenders ist die Erkrankung in der Regel innerhalb der ersten Lebensjahre lethal [41,42]. Zur Abschirmung vor Infekten müssen X-SCID-Kinder in sterilen Zelten untergebracht werden und sind deswegen auch als „bubble babies“ bekannt.



**Abb. 1.7: Zytokin-Rezeptoren mit  $\gamma$ c-Untereinheit**

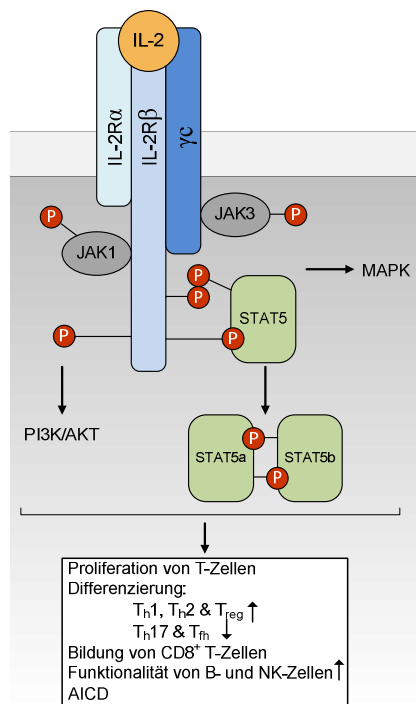
Dargestellt sind die Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21. Die roten Kreuze kennzeichnen Mutationen der Untereinheiten, die in unterschiedlichen SCID-Erkrankungen resultieren. Näher erläutert im Text (modifiziert nach [40]).

Eine Mutation der IL-2R $\alpha$ -Kette verursacht kein SCID, sondern ein Autoimmunsyndrom [43], das aufgrund einer gestörten IL-2-Signaltransduktion zu einem Mangel an T<sub>reg</sub>-Zellen führt [44]. Ein Defekt der IL-2R $\beta$ -Kette hingegen führt zu einem selektiven Verlust von NK-Zellen (T<sup>+</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>-</sup>-SCID) [45]. Ist der IL-7-Rezeptor mutiert, fehlt das T-Zellkompartiment (T<sup>+</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup>-SCID) [46]. Interessanterweise fehlen *IL2RG*-Knockout-Mäusen (*IL2RG*<sup>-/-</sup>) anders als Menschen auch die B-Zellen, was hauptsächlich daran liegt, dass IL-7 für die murine aber nicht für die humane B-Zellentwicklung essentiell ist [47].

Eine Analyse von 103 SCID-Patienten ergab, dass in 87 Fällen das *IL2RG* Gen betroffen war und dieses 62 unterschiedliche, patientenspezifische Mutationen aufwies. Dabei handelte es sich um 34 Punktmutationen, 14 Insertionen/Deletionen und 14 Spleißmutationen, die sich auf der gesamten Länge des *IL2RG* Gens fanden [48].

Das *IL2RG* Gen exprimiert 9 unterschiedliche Spleißvarianten beim Menschen und lediglich 4 in der Maus, wobei allerdings nicht alle Spleißvarianten Protein-kodierend sind. Als Untereinheit mehrerer Zytokinrezeptoren spielt  $\gamma$ c eine wichtige Rolle in mehreren Signalwegen. Über den IL-2-Rezeptor ist  $\gamma$ c z. B. Bestandteil des JAK/STAT-Signalweges

(Abb. 1.8). IL-2 aktiviert nach Bindung am IL-2-Rezeptor JAK1 und JAK3, beides zytoplasmatische Tyrosinkinasen. JAK1 assoziiert dabei mit der IL-2R $\beta$ -Kette und JAK3 mit  $\gamma$ c [49]. JAK-Kinasen werden zum einen durch gegenseitige Phosphorylierung und zum anderen durch Phosphorylierung von Tyrosinresten am zytoplasmatischen Ende der  $\beta$ -Kette aktiviert. Letztere rekrutiert und phosphoryliert STAT5a und STAT5b, die nach Dimerisierung in den Nukleus translozieren und dort bestimmte Zielgene binden (Abb. 1.8) [50]. Durch Aktivierung dieser Zielgene werden unterschiedliche Prozesse, wie die Differenzierung in verschiedene T-Zellsubtypen [51–53] oder die Proliferation der T-Zellen [44], reguliert. IL-2 aktiviert jedoch nicht nur den JAK/STAT-Signalweg, sondern auch die, für die B-Zellentwicklung wichtigen MAP-Kinase (*mitogen activated protein*, MAP) und Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)/Proteinkinase B (AKT)-Signalwege [54]. Ferner partizipiert IL-2 bei der Regulation des sog. *activation-induced cell death* (AICD), der für die Eliminierung autoreaktiver Zellen verantwortlich ist [55].



**Abb. 1.8: Die IL-2-vermittelten Signalwege**

Der IL-2-Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten (einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette sowie der  $\gamma$ c-Kette). Nach Bindung von IL-2 phosphoryliert die mit  $\gamma$ c assoziierte JAK3-Kinase Tyrosinreste der  $\beta$ -Kette und des Proteins STAT5. Das Dimer aus STAT5a und STAT5b fungiert als Transkriptionsfaktor im Nukleus. Zusätzlich werden der MAPK- und der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert. Letztendlich werden so verschiedene Zellfunktionen gefördert oder inhibiert. Nähere erläutert im Text. JAK: Janus-Kinase, P: Phosphorylierung, MAPK: *mitogen activated protein kinase*, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, AKT: Proteinkinase B, STAT: *signal transducer and activator of transcription*, T<sub>h</sub>: T-Helferzelle, T<sub>reg</sub>: regulatorische T-Zelle, AICD: *activation-induced cell death* (modifiziert nach [56,40]).

### 1.3 Gentherapie

Die Gentherapie von monogenen Bluterkrankungen bietet eine Alternative für jene Patienten, für die kein passender Spender für eine allogene Stammzelltransplantation gefunden wird. Bisherige Gentherapien beruhen auf einem Ersatz des mutierten Gens durch eine gesunde Kopie in HSZ. In der Regel wird das gesunde Gen mit viralen Vektoren *ex vivo* in das Genom von autologen HSZ eingeschleust und danach werden die korrigierten Zellen dem Patienten reinfundiert (Abb. 1.9).

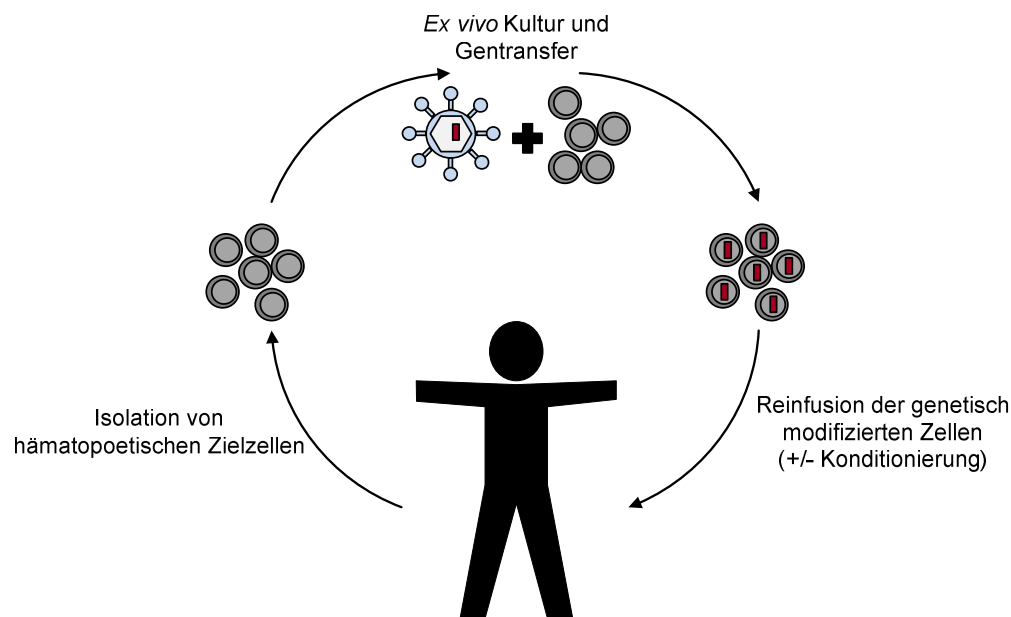


Abb. 1.9: Schematischer Ablauf einer *ex vivo* Gentherapie

Primäre Immundefekte eignen sich besonders gut für die Gentherapie, da sie oft durch eine Mutation in nur einem Gen (monogen) ausgelöst werden. Des Weiteren stehen etablierte Protokolle zur Isolierung und Kultivierung der HSZ zur Verfügung. In den Jahren 1989 bis 2014 wurden weltweit über 2100 klinische Gentherapiestudien genehmigt, davon waren mit ca. 64 % Krebserkrankungen die häufigste Indikation. Monogene Erkrankungen liegen mit ca. 9 % an zweiter Stelle<sup>1</sup>. Ein Meilenstein in der Entwicklung der Gentherapie war die Zulassung von Alipogene Tiparvovec (Glybera<sup>®</sup>) im November 2012 durch die Europäische Kommission zur Behandlung der erblichen Lipoproteinlipase-Defizienz (LPLD). Es ist das erste kommerziell erhältliche Gentherapeutikum in der westlichen Welt [57].

#### 1.3.1 Retrovirale Vektoren und ihre Eigenschaften

Retrovirale Vektoren sind nach den adenoviralen Vektoren, die für die Gentherapie am häufigsten eingesetzten Vektoren<sup>1</sup>. Um das Virus als sichere Genfähre einsetzen zu können, wurden die meisten retroviralen Elemente aus den Gentherapievektoren entfernt. Die erste

<sup>1</sup> Quelle: [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

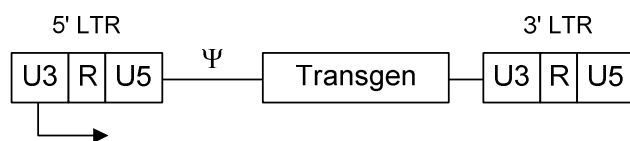
Generation  $\gamma$ -retroviraler Genföhren basieren auf dem murinen Leukämievirus (*murine leukemia virus*, MuLV), einem  $\gamma$ -Retrovirus, dessen genomische, einzelsträngige RNA in der Zielzelle durch die virale Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben wird und anschließend in das Wirtszellgenom integriert.

Bei der Herstellung von Viruspartikeln werden die benötigten Proteine auf ko-transfizierten Helferplasmiden bereitgestellt und nur das Transferplasmid, welches das therapeutische Gen sowie das Verpackungssignal ( $\Psi$ ) enthält, wird in die replikationsinkompetenten Partikel verpackt.

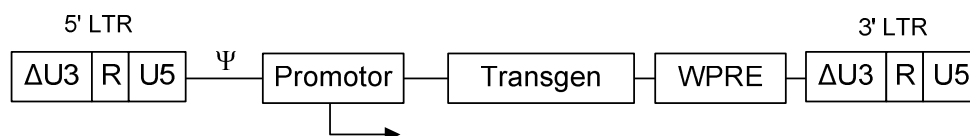
Aufgrund schwerer Nebenwirkungen in mehreren klinischen Genthapiestudien (vgl. Kapitel 1.3.2) wurde die Sicherheit der Vektoren erheblich weiterentwickelt. So stand die Transkription des Transgens in Vektoren der ersten Generation unter der Kontrolle von Promotor/*Enhancer*-Elementen in der U3-Region des 5'LTRs (Abb. 1.10). In den optimierten Vektoren der zweiten Generation wurden diese Elemente deletiert, um dadurch eine selbstinaktivierende Konfiguration (*self-inactivating*, SIN) zu erreichen. Anders als in den Vektoren der ersten Generation, wird hier das Therapiegen nicht vom viralen LTR, sondern von einem internen, zellulären Promotor exprimiert. Ferner wurde zur Stabilisierung der mRNA ein posttranskriptionales regulatorisches Element vom Woodchuck-Hepatitis-Virus (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*, WPRE) in die Vektoren eingebaut (Abb. 1.10). Die Termination der Transkription erfolgt in beiden Vektoren in der R-Region des 3'LTR [58].

In den letzten Jahren wurden immer häufiger klinische Phase I/II-Studien gestartet, in denen lentivirale SIN-Vektoren zum Einsatz kamen. Lentiviren basieren auf dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und scheinen aufgrund ihres unterschiedlichen Integrationsmusters eine sicherere Alternative gegenüber den  $\gamma$ -retroviralen MuLVs zu bieten. Anders als die  $\gamma$ -Retroviren, die präferentiell in unmittelbarer Nähe von aktiven Promotoren integrieren und dadurch häufig zelluläre Gene aktivieren, integrieren Lentiviren meist in Introns [59].

### Vektoren der ersten Generation



### SIN-Vektoren der zweiten Generation



**Abb. 1.10: Schematische Darstellung von Vektoren nach Integration der ersten und zweiten Generation**

In Vektoren der ersten Generation wird die Transkription des Transgens durch Promotor-/*Enhancer*-Elemente im 5'LTR reguliert. In Vektoren der zweiten Generation wurden diese Elemente deletiert und ein interner Promotor kontrolliert die Transkription des Transgens. Außerdem wurde ein WPRE zur Stabilisierung der mRNA eingebaut.

LTR: *long terminal repeat*, WPRE: posttranskriptionales regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus, U: *unique*, R: *redundant*, SIN: selbst inaktivierend.

### 1.3.2 Gentherapiestudien für X-SCID und Rückschläge in der klinischen Gentherapie

In den 90er Jahren wurden SCID-Erkrankungen als ideales Model für klinische Gentherapiestudien betrachtet. Dies war zum einen dadurch begründet, dass SCID häufig lebensbedrohliche Erkrankungen sind und zum anderen wurde ein Selektionsvorteil der korrigierten Zellen im Empfänger erwartet [60]. Einzelne Publikationen über eine partielle Korrektur der T-Zell-Immundefekte durch spontane Rückmutationen bei Patienten mit ADA-SCID [61] oder X-SCID [62] festigten die Meinung, dass SCID-Erkrankungen eine gute Basis für klinische Gentherapien darstellen. Die erste X-SCID-Gentherapiestudie wurde 1999 in Frankreich initiiert [63], in der insgesamt 10 Patienten mit einem amphotropen  $\gamma$ -retroviralen Vektor [64–67] der ersten Generation (vgl. Kapitel 1.3.1) behandelt wurden. Kurz nach Eröffnung der ersten Studie wurde in London eine zweite Studie gestartet, bei der weitere 10 Patienten mit einem vergleichbaren Vektor behandelt wurden [68] (Tab. 1.1). In 19 von 20, der in beiden Studien behandelten Patienten, konnte der Immundefekt durch die polyklonalen und funktionalen rekonstituierten T-Zellen korrigiert werden. Insgesamt wurden 11 von 20 Patienten durch Beendigung der Immunglobulinsubstitutionstherapie ein normales Leben ermöglicht [69,38].

Allerdings waren die ersten klinischen X-SCID-Studien mit retroviralen Vektoren der ersten Generation (Tab. 1.1) von schwerwiegenden genotoxischen Nebenwirkungen geprägt. Fünf der 20 Patienten entwickelten zwischen 2 und 5 Jahre nach Therapie eine T-Zelleukämie (Tab. 1.1). Während ein Patient an den Folgen der Leukämie starb, konnte bei 4 Patienten

die Leukämie durch eine Standard-Chemotherapie in komplette Remission gebracht werden, die bis 10 Jahre nach Behandlung noch anhält [69].

Die gescheiterte Behandlung von insgesamt 3 älteren Patienten (Alter: 10-14 Jahre) einer 2003 am *National Institutes of Health* durchgeführten Studie ohne signifikanten Erfolg, demonstriert die Relevanz besonders früh mit einer gentherapeutischen Behandlung der betroffenen Kinder zu beginnen [70,71].

**Tab. 1.1: Übersicht der klinischen X-SCID-Studien mit Vektoren der ersten Generation**  
SAE: *serious adverse events*, T-ALL: akute T-Zelleukämie, GALV: *gibbon ape leukemia virus*, LMO2: *LIM domain only 2*, CCND2: *cyclin d2*, BMI1: *polycomb ring finger oncogene*, NIH: National Institutes of Health in Bethesda (Maryland) (modifiziert nach [25,72]).

Studienzentren	behandelte Patienten	Vektor	klinischer Erfolg	SAE	Integrationsorte
Frankreich (Paris)	10	$\gamma$ -retroviral (amphotrop)	signifikante Verbesserung	T-ALL (4), gestorben (1)	<i>LMO2</i> , <i>CCND2</i> , <i>BMI1</i>
UK (London)	10	$\gamma$ -retroviral (GALV)	signifikante Verbesserung	T-ALL (1)	<i>LMO2</i>
USA (NIH)	3	$\gamma$ -retroviral (GALV)	mäßige Verbesserung (altersbedingt)	keine	-

Mit Hilfe hoch sensitiver molekulargenetischer Methoden, wie z. B. der LAM-PCR [73] (*linear-amplification-mediated polymerase chain reaction*, LAM-PCR) verbunden mit Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung konnten die Integrationsorte der viralen Genfären genau bestimmt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Leukämien bei allen Patienten durch eine retrovirale Aktivierung der Onkogene *LMO2* oder *CCND2* mit anschließender klonalen Expansion verursacht wurden [69]. Darüber hinaus konnten weitere sekundäre genomische Veränderungen (Insertion, Deletion, Translokation oder Mutation) in weiteren Genen, wie z.B. *BMI1*, *CCND2* oder *Notch-1* nachgewiesen werden [25].

Ähnliche Komplikationen wurden bei der Gentherapie von WAS- oder CGD-Patienten mit  $\gamma$ -retroviralen Vektoren der ersten Generation beobachtet (vgl. Kapitel 1.2.3). Insgesamt entwickelten 16 von 32 X-SCID-, WAS- und CGD-Patienten, entweder eine lymphoblastische oder eine myeloblastische Leukämie [69]. Hierbei wurde klar, dass sicherere Vektoren erforderlich waren, was zur Entwicklung der SIN-Vektoren mit gewebespezifischen Promotoren führte (vgl. Kapitel 1.3.1). Anders als der LTR, sind diese Promotoren weniger anfällig gegenüber epigenetischer Repression durch Methylierung, die insbesondere in embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen stattfindet [74]. Diese, als Schutzmechanismus eingestufte, Promotor-Methylierung war auch Grund dafür, dass es in der Frankfurter X-CGD-Gentherapiestudie zur Abschaltung („*Silencing*“) des Therapiegens und damit zum Verlust des therapeutischen Effekts kam [30] (vgl. Kapitel 1.2.3). Durch den

Einsatz eines internen chimären *cfes*/Cathepsin G-Promotors in einen lentiviralen Vektor konnte dieses Problem anscheinend behoben werden, weil letzterer nur in myeloischen Zellen aktiv ist [75].

In einer 2011 gestarteten und noch laufenden multi-zentrischen X-SCID-Gentherapiestudie (Tab. 1.2) wurden erstmalig neun Patienten mit  $\gamma$ -retroviralen SIN-Vektoren der zweiten Generation behandelt [76]. Die *IL2RG*-Expression wird dabei durch eine gekürzte Form (*short*) des ubiquitär exprimierten EF1 $\alpha$ -Promotor kontrolliert (EFS), der sich in präklinischen Studien als Promotor mit minimiertem mutagenen Potential erwiesen hat [77,78]. Bei acht der Patienten gelang eine Wiederherstellung des Immunsystems. Ein Patient verstarb 4 Monate nach Transplantation an einer adenoviralen Infektion bevor eine komplette T-Zellrekonstitution stattfinden konnte [72]. Anders als in den früheren Studien kam es bisher zu keiner klonalen Expansion der bevorzugten Integrationen in lymphatischen Onkogenen (*LMO2*, *MECOM*, u. a.) [76].

**Tab. 1.2: Übersicht der noch laufenden klinischen X-SCID-Studien mit SIN-Vektoren der zweiten Generation**

SIN: selbst inaktivierend, EF1 $\alpha$ : *elongation factor 1 alpha*, IgG Immunglobulin G, SAE: *serious adverse events*, GALV: *gibbon ape leukemia virus*, LV: lentiviral (modifiziert nach [25,72]).

Studien-zentren	behandelte Patienten	Vektor	klinischer Erfolg	SAE	Integrations-orte
Frankreich, UK, USA	9	SIN $\gamma$ -retroviral, EF1 $\alpha$ (GALV)	deutliche Verbesserung, Immunrekonstitution	-	-
USA (2 Standorte)	2	SIN-LV EF1 $\alpha$	Verbesserung der IgG-Produktion	-	-

In einer weiteren noch offenen X-SCID-Gentherapiestudie (Tab. 1.2) aus den USA werden erstmalig lentivirale SIN-Vektoren eingesetzt [79]. Erste Ergebnisse zeigen bei zwei gentherapeutisch behandelten jungen Erwachsenen eine Wiederherstellung der Ig-Produktion und B-Zellfunktion, eine erhöhte Anzahl an genetisch modifizierten NK-Zellen sowie eine Verbesserung des klinischen Zustandes [79].

Eine Alternative zu den bisherigen Gentherapievektoren könnten Vektoren sein, die Onkogenaktivierung und epigenetische Repression umgehen, indem sie eine Transgenexpression von endogenen, zellulären Promotoren ermöglichen. Vektoren dieser Art, auch als Genfallen bekannt, wurden ursprünglich sowohl zur Hochdurchsatzmutagenese in embryonalen Stammzellen als auch in genetischen Screens für neue Onko- und Tumorsuppressorgene in Mausmodellen eingesetzt.



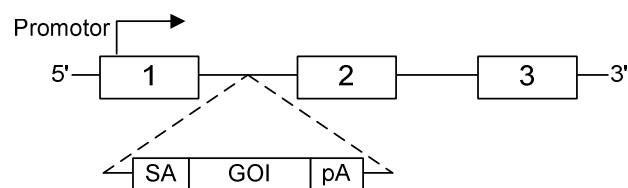
## 1.4 Genfallen

Mit der ursprünglichen ROSA $\beta$ -gal (*reverse orientation splice acceptor*, ROSA) Genfalle [80] ist es möglich, Gene zufällig zu mutieren („*Gene Trapping*“) und simultan durch ein Reporter-gen im Vektor die endogene Expression des getroffenen Gens zu beobachten [81]. Bei Genfallen-Vektoren wird die Genfallenkassette in reverser Orientierung bezüglich der viralen Transkription eingefügt, um eine Interferenz der viralen LTRs mit der endogenen Expression des getroffenen, zellulären Gens zu verhindern [82]. Eine klassische Genfallenkassette besteht aus einem promotorlosen *gene of interest* (GOI), das von einem 5' liegenden Spleißakzeptor (SA) und einer 3' liegenden Polyadenylierungssequenz (pA) flankiert wird (Abb. 1.11). Im Rahmen des *German Gene Trap Consortiums* (GGTC)<sup>2</sup> konnten insgesamt 85.742 konditionale Genfalleninsertionen in mES-Zellen mit Hilfe von ROSA-basierten retroviralen Vektoren annotiert werden. Dies entspricht insgesamt 7.013 einzelnen Genen [83]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Genfallen basieren ebenfalls auf den erwähnten ROSA-Vektoren, enthalten aber zusätzlich in allen drei Leserahmen *upstream* des GOI Stop-Codons, die dafür sorgen, dass zum einen die Translation am Start-Codon (ATG) des GOI initiiert wird und zum anderen, dass die *upstream* kodierenden endogenen Aminosäuren nicht mit dem GOI fusionieren, da dies eine Beeinträchtigung der enzymatischen Funktion des Proteins zur Folge haben könnte. Nach Integration der Genfalle in ein Intron eines exprimierten Gens resultiert unter Kontrolle des endogenen Promotors auf prä-mRNA Ebene ein Fusionstranskript. Nach RNA-Spleißen wird die entstehende reife mRNA an den Ribosomen translatiert und im Falle einer Integration der Genfalle *upstream* eines endogenen Start-Codons ausschließlich das GOI translatiert (Abb. 1.11).

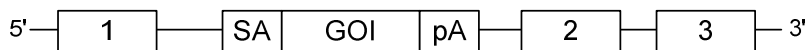
---

<sup>2</sup> [www.genetrapp.org](http://www.genetrapp.org)

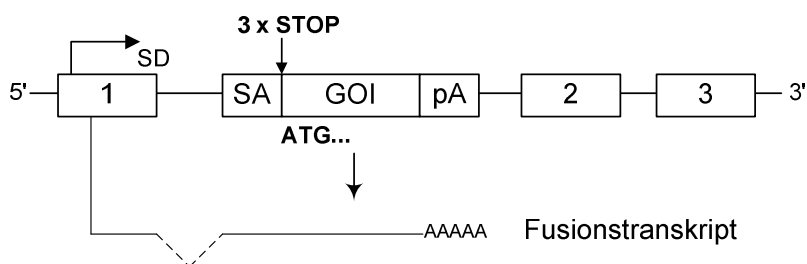
### 1. Zufällige Integration der Genfalle in einen Genlokus



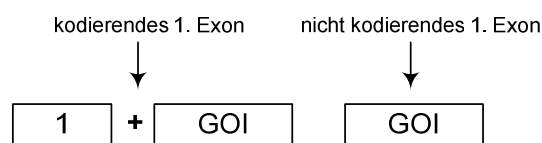
### 2. Integration der Genfalle in ein Intron eines exprimierten Gens



### 3. Resultierendes Fusionstranskript auf prä-mRNA Ebene



### 4. Proteine nach RNA-Spleißen und Translation



**Abb. 1.11: Prozess einer Genfallenintegration**

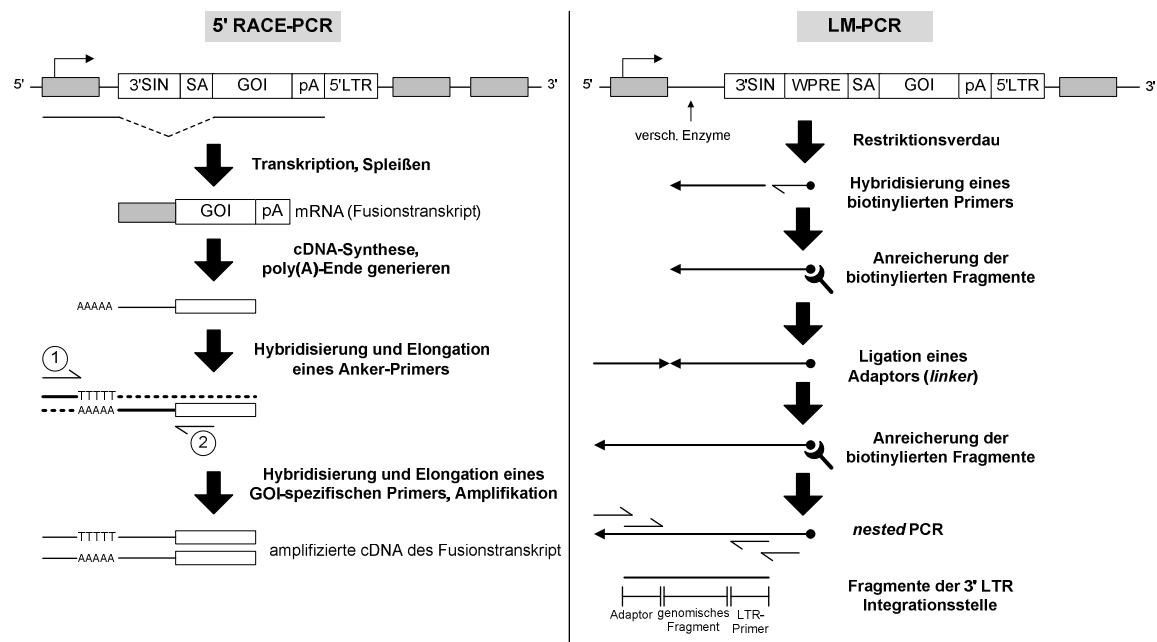
Dargestellt ist eine klassische Genfallenintegration. Eine typische Genfalle besteht aus einem adenoviralen SA, einem GOI und einem pA des bGH-Gens. Näher erläutert im Text.

SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor, GOI: *gene of interest*, pA: Polyadenylierungssignal, mRNA: *messenger RNA*, ATG: Start-Codon, RNA: Ribonukleinsäure, bGH: *bovine growth hormone*

(modifiziert nach <http://www.genetrap.org/tutorials/overview.html#intro>).

Mit Hilfe einer Datenbankanalyse konnte herausgefunden werden, dass die große Mehrheit der Integrationen, die im Rahmen des GGTC durch retrovirale Genfallen-Vektoren erzielt wurden, eine Präferenz für das 1. oder 2. Intron annotierter Gene zeigen und 40 % aller Gene ein nicht kodierendes 1. Exon besitzen.

Die Integrationsorte einer Genfalle können z. B. mittels einer 5'RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*, RACE) (vgl. Kapitel 4.1.6) [81,84] oder *ligation mediated PCR* (LM-PCR) (vgl. Kapitel 4.1.3) identifiziert werden [85]. Bei der LM-PCR dient isolierte genomische DNA (gDNA) als Ausgangsmaterial und die, an den 3'LTR der Genfalle angrenzenden genomischen DNA-Bereiche werden amplifiziert. Mit Hilfe isolierter RNA und einer 5'RACE können die am Genfallenintegrationsort exprimierte Fusionstranskripte amplifiziert und somit das getroffene Gen identifiziert werden (Abb. 1.12).



**Abb. 1.12: Prinzip der 5'RACE-PCR und LM-PCR**

Bei einer 5'RACE-PCR wird das an der Genfallensintegrationsstelle exprimierte Fusionstranskript zunächst in cDNA umgeschrieben. Nach Anhängen eines poly(A)-Endes und Hybridisierung des Anker-Primers (1), werden die Exon-Sequenzen innerhalb des Fusionstranskripts in einer *nested* PCR mit Anker-Primern und GOI-spezifischen Primern (2) amplifiziert (links).

Durch Restriktionsverdau mit Eyzmen mit kurzer Erkennungssequenz, wird bei einer LM-PCR die gDNA zunächst in kleine Fragmente zerteilt. Anschließend wird ein biotinylierter Primer hybridisiert und die biotinylierten Fragmente mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten magnetischen *Beads* angereichert. Nach Ligation eines Adaptors (auch *linker* genannt) und erneuter Anreicherung der biotinylierten Fragmente werden die am 3'LTR angrenzenden DNA-Bereiche in einer *nested* PCR mit Adaptor-Primern und LTR-Primern amplifiziert (rechts).

RACE: *rapid amplification of cDNA ends*, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, SIN: selbstinaktivierend, SA: Spleißakzeptor, GOI: *gene of interest*, pA: Polyadenylierungssignal, mRNA: *messenger RNA* LTR: *long terminal repeat*, cDNA: *complementary DNA*, gDNA: genomische DNA, LM: *ligation mediated*, WPRE: posttranskriptionales regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus (modifiziert nach [84,86]).

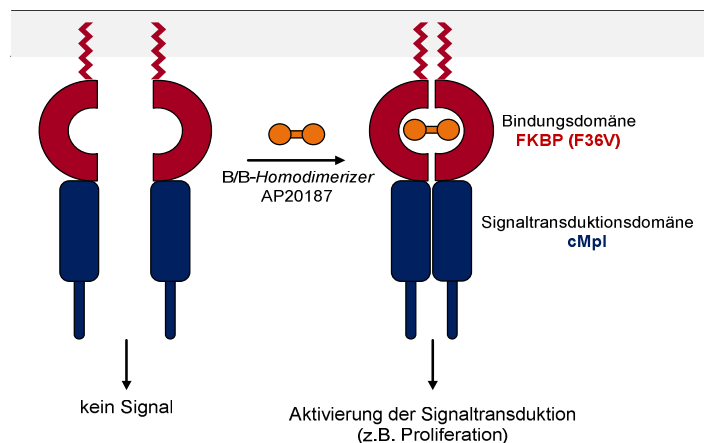
Anschließend können die resultierten PCR-Produkte nach Subklonierung und Sequenzierung analysiert werden. Mit Hilfe von *in silico* Programmen kann so der spezifische Integrationsort von Genfallen bestimmt werden.

## 1.5 Selektionsstrategie zur Expansion genmodifizierter Zellen

Anders als bei SCID-Erkrankungen unterliegen genkorrigierte X-CGD-Zellen keinem Selektionsdruck nach Transplantation. Die Abwesenheit eines Selektionsvorteils führt dazu, dass während der Regeneration des transplantierten KMs in den Empfängern transduzierte mit den nicht transduzierten Zellen konkurrieren, wobei letztendlich die nicht transduzierten Zellen überwiegen. Als Folge davon ist die gentherapeutische Wirkung meist nur kurzfristig.

Deswegen wäre es von Vorteil, wenn genmodifizierte Zellen entweder *ex vivo* oder *in vivo* expandiert werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System entwickelt, das über einen chimären Zytokinrezeptor nach Bindung eines synthetischen Liganden zu einem Wachstumsvorteil führt [87]. Das System basiert auf dem Immunophilin FKBP12, das das immunsuppressive Protein FK506 bindet. Um die endogene Bindung von FKBP12 an FK506 und die damit verbundene putative Toxizität zu unterbinden, wurde eine mutierte Version von FKBP12 namens FKBP12(F36V) entwickelt [88]. Diese bindet anstatt FK506 verschiedene synthetische Dimerisierungsinduktoren (*chemical inducer of dimerization*, CID), wie z. B. AP20187<sup>3</sup>. Werden eine oder mehrere CID-Bindungsdomänen an eine Signaltransduktionsdomäne eines Zytokinrezeptors (z. B. Thrombopoetin-Rezeptor, cMpl) fusioniert, kann durch die Zugabe von AP20187 die Signaltransduktion aktiviert und die Zelle zur Proliferation angeregt werden (Abb. 1.13).



**Abb. 1.13: System der induzierbaren Expansion**

Ist der Ligand AP20187 abwesend findet keine Signaltransduktion statt. Wird AP20187 hinzugefügt, führt dies zu einer Dimerisierung der Fusionsproteine und anschließender Aktivierung der Signaltransduktion. Durch Aktivierung unterschiedlicher Signalwege wird z. B. die Proliferation der Zellen gefördert. Nähere Erläuterungen im Text.

FKBP(F36V): *FK506 binding protein*, cMpl: humaner Thrombopoetin-Rezeptor.

Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus FKBP(F36V) und der zytoplasmatischen cMpl Signaltransduktionsdomäne konnte *in vitro* deutlich eine selektive Expansion von genmodifizierten hämatopoetischen Vorläuferzellen erreicht werden [89]. Auch *in vivo* konnte eine Expansion muriner FKBP-cMpl-exprimierender hämatopoetischer Zellen durch AP20187 erreicht werden [88]. Bei Hunden ließen sich die FKBP-cMpl-transduzierte HSZ durch Gabe von AP20187 bis zu neun Jahre nach Transplantation reaktivieren [90,91]. Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine FKBP-Fusion mit einer hyperaktiven cMpl-Domäne eine 99-fache Expansion von humanen hämatopoetischen- und eine 4,4-fache Expansion von

<sup>3</sup> iDimerize System der Firma Clontech

CD34<sup>+</sup>-Stamm- und Vorläuferzellen in Gegenwart von AP1903, einem Derivat von AP20187, in Gewebekultur ermöglichte [92].

## 1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Genfallen-Vektoren für die gentherapeutische Behandlung monogenetischer Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. In einem ersten Schritt wurde die Effizienz von Genfallen-Vektoren unterschiedlichen Designs in mES-Zellen getestet. Der effektivste Vektor wurde anschließend mit GFP als Transgen in einer faktorabhängigen Zelllinie und dann in primären murinen hämatopoetischen Zellen validiert. Parallel dazu wurde ein therapeutischer *IL2RG*-exprimierender Genfallen-Vektor zur Behandlung von X-SCID entwickelt und dessen Effizienz sowohl in einer humanen *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Leukämiezelllinie als auch in einem *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Mausmodell analysiert.



## 2 Material

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Material	Hersteller
Agarose-Gelkammern	Peqlab, Erlangen, DE
Autoklav	H & P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
Bakterien-Schüttler	B. Braun, Melsungen, DE
Bestrahlungsgerät Biobeam2000	Eckert & Ziegler BEBIG, Berlin, DE
Blutabnahmeröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Blutbildmessgerät scil vet abc	scil animal care company, Viernheim, DE
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Durchflusszytometer (FACS Calibur, FACS Canto II, FACS Fortessa, FACS Aria III)	BD, Heidelberg, DE
Einwegpipetten Costar (5/10/25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Falcon (15/50 ml)	Greiner, Frickenhausen, DE
Filterspitzen (10/200/1000 µl)	Starlab, Hamburg, DE
Gel-/Blot-Kammern	Life Technologies, Darmstadt, DE
Geldokumentationssystem Odyssey Fc	LI-COR, Bad Homburg, DE
Gel-Kassetten	Life Technologies, Darmstadt, DE
Heizblock	Peqlab, Erlangen, DE
Kanülen	BD, Heidelberg, DE
Kryotube (0,5/2 ml)	Greiner, Frickenhausen, DE
LightCycler 480	Roche, Mannheim, DE
MACS-Säulen (Größe: LS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Mikroskop	Zeiss, Berlin, DE
Mikrowelle	LG, Ratingen, DE
Nanodrop Spektrometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München, DE
PCR Maschine iCycler	BioRad, München, DE
PCR Tubes	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Petrischale (10 cm)	Greiner, Frickenhausen, DE
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, DE
Photometer	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetten	Greiner, Frickenhausen, DE
Pipettierhilfe (elektrisch)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Plattenlesesystem Mithras LB940	Berthold, Bad Wildbach, DE
qPCR Platten 96-well, weiß	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
QuadroMACS-Zellseparator	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE

Röhrchen für UZ	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Spritzen	B. Braun, Melsungen, DE
Sterilbank	Heraeus, Hanau, DE
Sterilfilter 0,45 µM (PVDF)	Merck Millipore, Billerica, USA
Tischzentrifugen	VWR, Darmstadt, DE
Ultrazentrifuge (UZ)	Beckman Coulter, Krefeld, DE
UV-Tisch und Geldokumentationssystem	Herolab, Wiesloch, DE
Vortexer	Neolab, Heidelberg, DE
Waage	Sartorius, Göttingen, DE
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Whatman Blottingpapier	Neolab, Heidelberg, DE
Zählkammern	Hycor Biomedical, Edinburgh, UK
Zellkulturflaschen (25/75/175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturplatten (6/24/96-well)	Greiner, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten 96.well, weiß	Berthold, Bad Wildbach, DE
Zellsieb	Merck Millipore, Billerica, USA
Zentrifugen	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE

## 2.2 Chemikalien und andere Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Lieferant
10x Lyse Puffer	BD Heidelberg, DE
Acrylamid 40%	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agar	Life Technologies, Darmstadt, DE
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Calbiochem, Darmstadt, DE
AP20187	Takara/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F
Bis-Tris	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, DE
BSA	PAA, Pasching, AUT
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, München, DE
Desoxynukleotide	Life Technologies, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, DE
DNA Marker (100bp, 1kB)	New England Biolabs, Frankfurt, DE
EDTA	Appllichem, Darmstadt, DE
Ethanol (96%)	Sigma-Aldrich, München, DE
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Forene 100% (V/V)	Abbott, Wiesbaden, DE
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
HCL	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München, DE
L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE



Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PBS	Life Technologies, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt, DE
Phenol/Chloroform	Sigma-Aldrich, München, DE
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, München, DE
Ponceau S	Applichem, Darmstadt, DE
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, München, DE
Protein Marker (All Blue Standard)	BioRad, München, DE
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
RNase/DNase freies Wasser	Life Technologies, Darmstadt, DE
Saccharose/Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, München, DE
TRIzol Reagent	Life Technologies, Darmstadt, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, DE

### 2.3 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
OneTaq DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt, DE
RedTaq DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, München, DE
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt, DE
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt, DE

### 2.4 Zytokine

<b>Zytokin</b>	<b>Hersteller</b>
hIL-11	PeptoTech, Hamburg, DE
hIL-2	PeptoTech, Hamburg, DE
mFlt3-Ligand	PeptoTech, Hamburg, DE
mIL-2	PeptoTech, Hamburg, DE
mIL-3	PeptoTech, Hamburg, DE
mIL-7	PeptoTech, Hamburg, DE
mSCF	PeptoTech, Hamburg, DE

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 FACS

Antigen	Konjugat	Reaktivität	Hersteller
CD117 (c-Kit)	APC	murin	eBioscience, Frankfurt, DE
CD11b	PE-Cy7	murin	eBioscience, Frankfurt, DE
CD11b	APC	murin	eBioscience, Frankfurt, DE
CD132 (hIL2RG)	PE	human	BD Heidelberg, DE
CD132 (mIL2RG)	PE	murin	BD Heidelberg, DE
CD28	unkonjugiert	murin	Biozol, Eching, DE
CD3ε	V500	murin	BD, Heidelberg, DE
CD3ε	PE	murin	BD, Heidelberg, DE
CD3ε	unkonjugiert	murin	Biozol, Eching, DE
CD4	PerCP-Cy5.5	murin	BD Heidelberg, DE
CD45.1	PerCP-Cy5.5	murin	eBioscience, Frankfurt, DE
CD45.2	APC	murin	eBioscience, Frankfurt, DE
CD45.2	PerCP-Cy5.5	murin	eBioscience, Frankfurt, DE
CD45RA (B220)	PE	murin	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
CD45RA (B220)	VioBlue	murin	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
CD8a	APC	murin	BD Heidelberg, DE
CD8a	PE	murin	eBioscience, Frankfurt, DE
FcR Blocking Reagent	-	murin	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Fixable Viability Dye eFluor780	APC-Cy7	murin/human	eBioscience, Frankfurt, DE
Gr-1	VioBlue	murin	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Isotypkontrollen	passend	passend	alle
Lineage Antibody Cocktail	APC	murin	BD Heidelberg, DE
MC CD90.2	PE/VioBlue	murin	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
T cell Cocktail			
Sca-1	PE-Cy7	murin	eBioscience, Frankfurt, DE
STAT5 (pY694)	AlexaFluor488	murin/human	BD Heidelberg, DE

### 2.5.2 Western Blot

#### Primärantikörper

Antigen	Proteingröße	Verdünnung	Spezies	Hersteller
GAPDH	36 kDa	1:20000	Maus	Abcam, Cambridge, UK
pSTAT5 (Tyr694) (C11C5)	90 kDa	1:500	Hase	Cell Signaling, Leiden, NL
STAT5a/b (3H7)	90 kDa	1:1000	Hase	Cell Signaling, Leiden, NL

## Sekundärantikörper

Name	Verdünnung	Hersteller
anti-Hase	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg, DE
anti-Maus	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg, DE

## 2.6 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 $\alpha$ (selbst hergestellt)	F c80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) PhoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1
TOP 10 <i>E. coli</i> chemisch kompetent (Life Technologies, Darmstadt, DE)	F' [lacIq Tn10 (TetR)] <i>mcrA</i> , D( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) F80 <i>lacZ</i> DM15 <i>DlacX74 deoR recA1 araD139 D(araleu) 7697</i> <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG-</i>

## 2.7 Mausstämme

Name	Beschreibung	Lieferant
B6.12954- Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /J (X-SCID Maus)	Mäuse mit einer Null-Mutation des Gens <i>IL2RG</i> [93], welche zur X-chromosomal gebundenen Form von SCID führt. Hintergrund: C57BL/6	The Jackson Laboratory
B6.129S6- Cybb <sup>tm1Din</sup> /J (X-CGD Maus)	Mäuse mit einer Null-Mutation des Gens <i>CYBB</i> [94], welche zur X-chromosomal gebundenen Form von CGD führt Hintergrund: C57BL/6	The Jackson Laboratory
C57BL/6	am häufigsten verwendete Inzuchtmauslinie, WT Kontrolle	Charles River

## 2.8 Zelllinien

Name	Beschreibung	Quelle
BaF3	murine B-Zelllinie [95], IL-3 abhängiges Wachstum, in Suspension	Özlem Demirel, (AG Brandts, Frankfurt)
ED-7R	humane T-Zelleukämiezelllinie, keine endogene Expression von <i>IL2RG</i> und <i>IL7R<math>\alpha</math></i> , stabil transfiziert mit <i>IL-7R<math>\alpha</math></i> [96], in Suspension	Adrian Thrasher (Great Ormond Street Hospital, London)
HEK-293T	humane embryonale Nierenzelllinie [97], adhärent	DSMZ: ACC 635
mES-Zellen (E14 Tg2a.4)	murine embryonale Stammzellen, kultivierbar ohne Fütterungszelllinie, 129Ola x 129SvEv [98]	ATCC: CRL-1821

PLB-985	humane AML-Zelllinie [99], in Suspension	DSMZ: ACC 139
PLB-XCGD	humane AML-Zelllinie, durch homologe Rekombination zerstörtes <i>CYBB</i> Gen [100], in Suspension	Manuel Grez (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt)
SC-1	murine embryonale Fibroblastenzelllinie [101], adhärent	Ute Modlich (Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt), ATCC: CRL-1404
ϕNX Eco	humane embryonale Nierenzelllinie, retrovirale Verpackungszelllinie, basierend auf HEK-293T [102] adhärent	ATCC: CRL-3214

## 2.9 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
Cold Fusion Cloning Kit	System Biosciences, Mountain View, USA
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden, DE
Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28	Life Technologies, Darmstadt, DE
GenElute Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich, München, DE
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich, München, DE
Lineage Cell Depletion Kit (mouse)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Nucleobond Xtra Midi/Maxi	Machery-Nagel, Düren, DE
Pan T Cell Isolation Kit II (mouse)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden, DE
Roche LC 480 Probes Master Mix	Roche, Mannheim, DE
SMARTer RACE cDNA Amplification Kit	Takara/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F
ViaLight plus Kit	Lonza, Basel, CH

## 2.10 Software und *in silico* Hilfsprogramme

Software	Anwendung
ApE PlasmidEditor	<i>in silico</i> Klonierung, Archivierung, Primer-Design, ( <a href="http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/">http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/</a> )
CellQuest Pro	Messung und Auswertung, FACS Calibur
Ensembl Genome Browser	Analyse genomischer DNA-Sequenzen
FACS Diva 6.0	Messung und Auswertung, FACS Canto II/Fortessa/Aria III
GraphPad Prism	Grafische und statistische Auswertung
ImageJ	Auswertung ES-Zellkolonien ( <a href="http://imagej.nih.gov/ij/download.html">http://imagej.nih.gov/ij/download.html</a> )
LightCycler 480 Software	qPCR-Messung und Auswertung

Scil vet abc Software	Messung des Differentialblutbildes
UCSC Genome Browser	Analyse genomischer DNA-Sequenzen

## 2.11 Plasmide

### 2.11.1 Plasmid für Subklonierungen

Plasmid	Herkunft
pGEM-T Vektor	Promega, Mannheim, DE

### 2.11.2 Helfer-Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pMD2.VSV.G	Verpackungsplasmid, das das VSV-Hüllprotein unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert	Plasmid Factory, Bielefeld, DE
pCDNA3MLVg/p (M634)	$\gamma$ -retrovirales Verpackungsplasmid, das die viralen Proteine gag/pol unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert	Plasmid Factory, Bielefeld, DE

### 2.11.3 $\gamma$ -retrovirale Plasmide

Vektorbezeichnung in dieser Arbeit	detaillierte Vektorbezeichnung	Bezugsquelle
FES-GFP	SER11GFPW	S. Schultze-Strasser
GT-CAG-GFP	GTSA-W1-CAG-eGFP	F. Schnütgen
GT-GFP	GTSA-W1-eGFP	eigene Arbeit
GT-mIL2RG	GTSA-W1-mIL2RG	eigene Arbeit
GT-Mpl-GFP	GTSA-W1-T2A-2xF-cMpl(gsdel3YF)-P2A-eGFP	S. Schultze-Strasser
GT-SA	GTopt-SA final	F. Schnütgen
GTSA-IRES-NEO/CEO	GTSA-W1-IRES-NEO/CEO	eigene Arbeit
GTSA-NEO/CEO	GTSA-W1-NEO/CEO	eigene Arbeit
GTSA-T2A(0)-NEO/CEO	GTSA-W1-T2A(0)-NEO/CEO	eigene Arbeit
GTSA-T2A(1)-NEO/CEO	GTSA-W1-T2A(1)-NEO/CEO	eigene Arbeit
GTSA-T2A(2)-NEO/CEO	GTSA-W1-T2A(2)-NEO/CEO	eigene Arbeit
SFFV-GFP	SF71GFPW	S. Schultze-Strasser
SFFV-hcoIL2RG	SF71hcoIL2RGW	eigene Arbeit
SFFV-mIL2RG	SF71mIL2RGW	eigene Arbeit

## 2.12 Oligonukleotide

### 2.12.1 Primer für qPCR

Name	Sequenz (5' → 3')
h-EPOR 7/5 for	ATGCCAGACTAGACCCAGAC
h-EPOR 7/5 rev	GGAAAGGAACTAACAAAGGGAC
h-EPOR 7/5 Sonde	TCTTGGGGACTTTTCACCTGATTTTCCTTCTAC
m-β-Aktin for	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
m-β-Aktin rev	CAATAGTGATGACCTGGCCGT
m-β-Aktin Sonde	CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC
SRY #82 for	AGCCTCATCGGAGGGCTA
SRY #82 rev	AGGCAACTGCAGGCTGTA
SRY Sonde #82	CAGAGGAG
WPRES #95 for	ATTGCCACCACCTGTCAACT
WPRES #95 rev	GCAACCTAGCCCCTGTCC
WPRES Sonde #95	TGTGGCTG

### 2.12.2 Genspezifische Primer zum Nachweis von Fusionstranskripten (5'RACE)

Name	Sequenz (5' → 3')
RACE IL2RG 1	CAGGGGCTGTAGAAGTCAGG
RACE IL2RG 2	GTCTTCATTCGCACTGGACA
RACE IL2RG 3	ACTGGACATGAGGACCTTGG
RACE IL2RG 4	CAGGAGCAGCTGAAGGACTAA

### 2.12.3 Primer zum Nachweis des Provirus auf genomischer Ebene

Name	Sequenz (5' → 3')
bGH gen as	CAACAGATGGCTGGCAACTA
IL2RG gen s	AACGAATGCCTCCAATTCC
WPRES gen as	ATGATTGCCCCACCATTTT

### 2.12.4 Primer für Klonierung

Name	Sequenz (5' → 3')
eGFP as	AGCGAGCTCTAGATACAAATGTATACTCATTACTTGTACAGCTCG TCCATG
eGFP s	TTCCAGTGGGGATCGACGGTATCGATTGATTGATTGAGCCGCCAC CATGGTGAGCAAGGGCGAGG
Fusion in1 as	CCTCGCCCTTGCTCACCATGGCTTCCGGCTTCAGAGAATAAC
Fusion in2 as	GCTCTAGATACAAATGTAGTATCATTACTTGTACAGCTCGTCCAT G

Fusion in2 s	GTTATTCTCTGAAGCCGGAAGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
Fusion in3 s	CATGGACGAGCTGTACAAGTAATGATACTACATTTGTATCTAGAG C
Fusion ov out as	TTCTGTATTGTCTGAAAATAGCGGCCGCTCTAGAGGATCG
Fusion ov out s	ATTCCCCCAAAGGAGGGGCCCTAGGAGAGGGGCCTGGAG
IL2RG as	TCAGGCTTCCGGCTTCAGAGAATAAC
IL2RG kas	AGCGAGCTCTAGATACAAATTACGTATCATCAGGCTTCCGGCTTC AGAGAATAAC
IL2RG ks	GGGCGGGGTATACGACGGTATCGATTGATTGATGAGCCGCCACC ATGTTGAAACTATTATTGTACCTAGATC
IL2RG s	ATGTTGAAACTATTATTGTACCTAGATC
IL2RG SFFV as	GCGGTAAGATGCTCGAATTCGTCGACGCGGCCGCTTCAGGCTTCC GGCTTCAGAGAATAAC
IL2RG SFFV s	GCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCTGCCACCATGTTGAAACTA TTATTGTACCTAGATC
SFFV hcoIL2RG as	AATTCGTCGACGCGGCCGCTTCATCAGGTCTCGGGCTTCAGG
NotI	
SFFV hcoIL2RG s	TTACAGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCTGCCACCATGCTG AAGCCCAGCC
NotI	

### 2.12.5 Primer für Sequenzierung und Kolonie-PCR

Name	Sequenz (5' → 3')
M13 for (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC

### 2.12.6 Primer für Genotypisierung der X-SCID-Mäuse

Name	Sequenz (5' → 3')
geno common	GTGGGTAGCCAGCTCTTCAG
geno mutant rev	GCCAGAGGCCACTTGTGTAG
geno mutant rev 2	CATTTGTACGTCCTGCACGAC
geno wt rev	CCTGGAGCTGGACAACAAAT





## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Arbeiten mit Bakterien

##### Kultivierung

Zur Kultivierung von Bakterien in einer Flüssigkultur wurde dem LB-Medium (*lysogeny broth*) das Selektionsantibiotikum Ampicillin (Amp) in einer Konzentration von 50 µg/mL zugefügt und die Bakterien bei 200 rpm bei 37°C über Nacht (ca. 16 h) in einem Bakterenschüttler geschüttelt.

<b>LB-Medium:</b>	1 g/L Bacto-Trypton 0,5 g/L Hefeextrakt 1 g/L NaCl pH 7
-------------------	--

##### Klonierung

###### ▪ Restriktion

Für alle Restriktionsansätze wurden kommerziell erhältliche Restriktionsendonukleasen von *New England Biolabs* (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Für eine präparative Restriktion wurden 1-5 µg, für eine analytische Restriktion 0,1-0,5 µg DNA eingesetzt. Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. Für einen gleichzeitigen Doppel-Verdau wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer für beide Enzyme gewählt. Wenn möglich wurde anschließend eine Hitzeinaktivierung der Enzyme durchgeführt und die geschnittene DNA in einem Agarosegel analysiert.

###### ▪ Phosphatase Behandlung

Die alkalische Phosphatase katalysiert den Abbau von Phosphatgruppen an 5'- und 3'-Enden von DNA und RNA. Sie wurde zur Dephosphorylierung von Vektoren verwendet, um eine Religation des geschnittenen Vektors während einer Klonierung zu verhindern. Die thermosensitive alkalische Phosphatase kann im Gegensatz zu anderen Phosphatasen hitzeinaktiviert werden. Die Reaktion wurde nach Herstellervorgaben durchgeführt.

###### ▪ Ligation

Für die Ligation fertiger DNA Fragmente wurden ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 unter Berücksichtigung der Fragmentgrößen und DNA-Konzentrationen berechnet.

### ▪ Klonierung von PCR Fragmenten in pGEM-T Vektor

Zur Subklonierung von PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T Vektor System von Promega verwendet. Der Klonierungsvektor pGEM mit überhängenden 3'-T-Enden zeichnet sich durch eine schnelle und effiziente Ligation aus. Bei 72°C wurde das PCR-Fragment für 20 min. mit einer Taq-Polymerase inkubiert, die aufgrund ihrer terminalen Transferaseaktivität und mit Hilfe des 10x PCR Puffers und dNTPs zusätzliche 3'Adenosin-Überhänge an die neu-synthetisierte DNA anfügt. Anschließend konnte das PCR-Fragment in den pGEM-T-Vektor zwischenkloniert werden. Der Ligationsansatz bestand aus 1 µl pGEM-T-Vektor (10 ng), 3,5 µl des PCR-Fragmentes, 5 µl 2x Puffer (*Rapid* Ligationspuffer) und 0,5 µl Ligase. Die Ligationsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h mit anschließender Transformation in kompetente Bakterien.

### Transformation

Die Aufnahme freier DNA durch kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. In dieser Arbeit wurde mit chemisch kompetenten DH5α oder TOP10 Bakterienzellen gearbeitet. Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurden die Bakterien mit einem Hitzeschock behandelt. Hierfür wurde ein Aliquot der Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1 µl verdünnter Plasmid-DNA bzw. 1 µl eines Ligationsansatzes wurden die Bakterien 5 min auf Eis inkubiert und anschließend erfolgte für 30 s bei 42°C ein Hitzeschock. Danach wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt und weitere 2 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit 50 µg/mL Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden <1 Monat bei 4°C gelagert. Bakterien aus pGEM-T Klonierungsreaktionen wurden auf IPTG/X-GAL vorbehandelten LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Durch Blau/Weiß-Selektion konnten so positive Klone mit Insert (weiß), von Klonen mit religiertem Vektor (blau) unterschieden werden.

<b>LB-Agarplatten:</b>	1 g/L Bacto-Trypton 0,5 g/L Hefeextrakt 1 g/L NaCl 1,5 g/L Agar Agar
<b>IPTG/X-Gal-Platten:</b>	LB-Agarplatten 40 µg/µl X-Gal 0,1 M IPTG

### 3.1.2 Arbeiten mit DNA

#### Plasmidpräparation

Für die Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA für Klonierungen oder Sequenzierungen wurde in dieser Arbeit die Minipräparation mit Hilfe der alkalischen Lyse eingesetzt. Hierfür wurden 1,5 ml einer Übernacht-Bakterienkultur für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Puffer P1

sorgfältig resuspendiert. Zur Lyse wurden 200 µl Puffer P2 zugegeben und durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach Zugabe von 150 µl Puffer P3 zur Neutralisierung und erneutem Mischen wurde das Reaktionsgefäß für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um Zelldebris von dem löslichen Überstand zu trennen. Der Überstand, in dem die Plasmid-DNA enthalten war, wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100%igem Ethanol unter Schütteln gefällt. Das Reaktionsgefäß wurde erneut für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um so die ausgefallene DNA zu pelletieren. Das Pellet wurde mit 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen (5 min, 13.000 rpm), an der Luft getrocknet und anschließend in 10-50 µl dH<sub>2</sub>O rückgelöst. Die Konzentration wurde mittels Spektralphotometrie bestimmt und 5 µl der gelösten DNA wurde für eine Kontrollrestriktion eingesetzt.

Die Präparation von Plasmiden in größerem Maßstab, z.B. für die Virusproduktion erfolgte mit den *Nucleobond Xtra Kits* von Macherey-Nagel. Das verwendete System basiert auf DNA-bindenden Anionenaustauscher-Säulen. Die Plasmidpräparation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Das gelöste DNA-Pellet wurde nach der Konzentrationsbestimmung auf 1 µg/µl eingestellt und stand für weitere Anwendungen zur Verfügung.

<b>Puffer P1:</b>	50 mM Tris/HCl pH 8 100 mM EDTA 100 µg/mL RNase A
<b>Puffer P2:</b>	200 mM NaOH 1% SDS
<b>Puffer P3:</b>	3 M Kaliumacetat pH 5,5

### Isolierung genomischer DNA

#### ▪ DNeasy Tissue Kit

Die Gewinnung genomischer DNA (gDNA) aus Primärzellen und Knochenmark transplantierte Mäuse erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *DNeasy Blood and Tissue Kit* von Qiagen.

#### ▪ Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Isolierung von gDNA aus Zelllinien wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion verwendet. Dafür wurde das Zellpellet in 400 µl Zell-Lysepuffer plus 3 µl Proteinase K aufgenommen und bei 60°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 300 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol. Nach anschließender Mischung und Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und 300 µl Chloroform zugegeben. Die Lösung wurde wieder gemischt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol gefällt. Nach zwei Zentrifugationsschritten und Waschen

der DNA mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet getrocknet und die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

<b>Zell-Lysepuffer:</b>	10% SDS 3 M NaCl 1 M TrisHCl pH 7,5 0,5 M EDTA pH 8
-------------------------	--

### Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch an einem Nanodrop bestimmt. Dabei misst man die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (DNA, RNA), und bei 280 nm, wo das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Die Reinheit der Proben wird durch den Quotienten aus den Extinktionen bei beiden Wellenlängen ermittelt. Bei reiner DNA sollte das Verhältnis ungefähr bei 1,8 bzw. bei reiner RNA bei 2,0 liegen.

### Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphate kann DNA in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe der Fragmente ab. Entsprechend der Fragmentgrößen wurden Gele von 1-2 % eingesetzt. Dazu wurde die entsprechende Menge an Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine vollständig homogene Lösung erreicht wurde. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid zugegeben, durch Schwenken gemischt und in einer Gelkammer auspolymerisiert. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Ladepuffer versetzt, in die Taschen des Agarosegels pipettiert und bei 120 V aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker mitgeführt. Anschließend wurde die DNA im Gel durch UV-Licht unter einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

<b>TAE-Puffer (50x):</b>	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,05 M EDTA pH 8
<b>Ladepuffer:</b>	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol

### Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde *das GeneElute Gel Extraction Kit* von Sigma-Aldrich nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Hierfür wurden einzelne Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe eines Hochsalzpuffers wurde das Gelstück bei 50°C geschmolzen. Nach Bindung der präzipitierten DNA an eine Silica Membran und anschließenden Waschrufen, wurde die DNA abschließend mit dH<sub>2</sub>O eluiert und für Klonierungen oder Sequenzierungen eingesetzt.

### Sequenzierung von DNA Fragmenten

Die Sequenzierung wurde kommerziell von der Firma SeqLab (Göttingen, DE) durchgeführt. Erhaltene Sequenzen wurden mit dem Programm ApE oder der Online Datenbank UCSC Genome Browser BLAT *in silico* analysiert.

### 3.1.3 Arbeiten mit RNA

Um die RNA vor dem Abbau durch RNasen zu schützen, wurden bei allen Arbeiten mit RNA-Molekülen gestopfte sterile Spitzen, RNase freie Reaktionsgefäße sowie RNase freies Wasser verwendet.

#### Isolierung von RNA

- **RNeasy Kit**

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Primärzellen wurde das *RNeasy Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

- **Trizol-Phenol-Chloroform-Extraktion**

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde die Trizol-Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet. Dafür wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und 800 µl Trizol zugegeben, um die Zellmembran zu zerstören. Die Lösung wurde für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und 160 µl Chloroform zugegeben. Nach intensivem Mischen wurde die Lösung 3 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dabei bilden sich drei Phasen:

**Oben:** farblose, wässrige Phase (enthält die RNA)

**Mitte:** weiße Interphase

**Unten:** rote organische Phase (Phenol)

Die obere Phase mit der RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 400 µl Isopropanol erfolgte die Fällung der RNA. Die Lösung wurde erneut für 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4°C). Das am Boden sichtbare RNA-Pellet wurde anschließend mit 75%igem Ethanol gewaschen (5 min, 7.500 rpm, 4°C) und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 30 µl dH<sub>2</sub>O gelöst und die RNA-Probe bei -80°C gelagert.

#### cDNA Synthese

Um isolierte Gesamt-RNA (1-5 µg) in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, wurde das *SMARTer RACE cDNA Amplification Kit* der Firma Clontech nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mit Hilfe von zwei flankierenden, spezifischen Primern und thermostabilen DNA-Polymerasen. Als Vorlage können Plasmid-DNA, gDNA oder synthetisierte cDNA dienen. Ein typischer PCR Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. **Denaturierung** des DNA Doppelstranges bei 95°C
2. **Hybridisierung** der Primer an den komplementären Einzelstrang bei spezifischer Schmelztemperatur der Primer (48°C-60°C)
3. **Elongation** der DNA bei 72°C

Durch Wiederholung dieser Schritte für mehrere Zyklen wird die spezifische DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert.

Standard PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Puffer (10x)	5 µl	Initiale Denaturierung (95°C)	5 min
dNTPs (5 mM)	2 µl	Denaturierung (95°C)	30 s
Primer for (10 µM)	1 µl	Hybridisierung (54-60°C)	30 s
Primer rev (10 µM]	1 µl	Elongation (72°C)	1-2 min
DNA-Polymerase	0.5 µl	Finale Elongation (72°C)	5 min
DNA	10 - 100 ng	Kühlen (4°C)	∞
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl		

} 30x

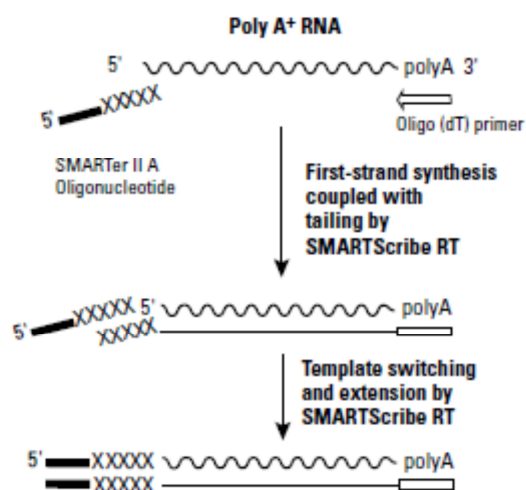
### Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Die Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) ist eine spezielle Form der Polymerase-Kettenreaktion, bei der cDNA als Vorlage dient und somit spezifische RNA-Transkripte nachgewiesen werden können. Isolierte Gesamt-RNA wird hierfür zuerst mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in Kombination mit gen-spezifischen, *random* Hexamer- oder oligo-dT Primern in cDNA umgeschrieben (vgl. Kapitel 3.1.3), die in anschließenden PCR-Reaktionen amplifiziert wird.

### *Rapid amplification of cDNA-ends* (RACE)

Als *rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction* (RACE-PCR) wird eine Abwandlung der RT-PCR bezeichnet, bei der cDNA-Enden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion schnell vervielfältigt und somit unbekannte Sequenzen in den untranslatierten Bereichen der zytoplasmatischen mRNA ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde die 5' RACE eingesetzt, um Fusionstranskripte einer unbekanntem Gen-Sequenz (getroffenes Gen) mit bekanntem Transgen im Vektor (*IL2RG*) in transduzierten PLB-985 nachzuweisen (vgl. Kapitel 4.1.6). Die komplette Generierung der *ready-to-use* cDNA und anschließende

5'RACE-PCR wurde mit Hilfe des *SMARTer RACE* Systems von Clontech durchgeführt. Dabei wurde die RNA mit Hilfe eines modifizierten Oligo(dT) Primer (5'-CDS) und einem speziellen Adapter-Primer (*SMARTer II A* Oligonukleotid) in Kombination mit der passenden *SMARTScribe* Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Mechanismus der *SMARTer* cDNA Synthese**

Synthese des Erst-Strangs durch einen modifizierten Oligo(dT)-Primer. Wenn die *SmartScribe* RT das Ende der mRNA erreicht hat, werden mehrere Basen angehängt. Der *SMARTer II A*-Oligonukleotid bindet an das Ende der cDNA und dient nun als Vorlage für die *SMARTScribe* RT.

RT: Reverse Transkriptase, polyA: Poly(A)-Schwanz der RNA

(Quelle: *SMARTer*<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit User Manual)

Die synthetisierte cDNA konnte anschließend mit Hilfe reverser *IL2RG*-spezifischen Oligonukleotiden und optimierten im Kit enthaltenen Primern (Universal Primer A Mix (UPM), Nested Universal Primer A (NUP)) mittels *nested* PCR amplifiziert werden. Es wurden zwei genspezifische Primerpaare getestet (RACE *IL2RG* 1 und 3, RACE *IL2RG* 2 und 4). Anschließend wurden nach einem PvuII-Kontrollverdau oder einer Kolonie-PCR die Sequenzen identifiziert, die dem Sequenzier-Service übergeben und anschließend *in silico* analysiert wurden.

1. PCR			
PCR-Ansatz		PCR-Programm	
OneTaq-Puffer (5x)	10 µl	Denaturierung (94°C)	3 min
dNTPs (10 mM)	1 µl	Denaturierung (94°C)	30 s
RACE IL2RG 1/2 (10 µM)	1 µl	Hybridisierung (60°C)	30 s
UPM (10x)	5 µl	Elongation (68°C)	3 min
OneTaq-Polymerase	0.25 µl	Kühlen (4°C)	∞
cDNA	2.5 µl		
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl		
2. PCR			
PCR-Ansatz		PCR-Programm	
OneTaq-Puffer (5x)	5 µl	Denaturierung (94°C)	3 min
dNTPs (10 mM)	1 µl	Denaturierung (94°C)	30 s
RACE IL2RG 3/4 (10 µM)	1 µl	Hybridisierung (60°C)	30 s
NUP (10x)	1 µl	Elongation (68°C)	3 min
OneTaq-Polymerase	2,5 µl	Kühlen (4°C)	∞
verdünntes PCR-Produkt aus 1. PCR	5 µl		
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl		

### **Real-time quantitative PCR (qPCR)**

Eine quantitative PCR (qPCR) ist eine hochempfindliche Methode, die es erlaubt entstehende PCR-Produkte in Echtzeit (*real time*) zu messen, um z. B. den Chimärismus transplanteder Mäuse über den Anteil an weiblichen bzw. männlichen Zellen in einer Probe zu bestimmen. Hierfür wird ein Abschnitt der Ziel-DNA mit Hilfe einer Fluoreszenz-basierten Methode spezifisch amplifiziert und detektiert. In dieser Arbeit wurde die TaqMan-Methode benutzt, bei welcher ein am 5'-Ende fluoreszenzmarkiertes (mit z. B. FAM, TexasRed) Oligonukleotid (sog. TaqMan-Sonde) in Kombination mit sequenzspezifischen Primern verwendet wird. Diese Sonden enthalten am 3'-Ende einen sog. Quencher, welcher bei räumlicher Nähe durch FRET (*Förster resonance energy transfer*, FRET) die Fluoreszenz vom 5'-Ende absorbiert. Beim Abbau der Sonde durch die 5'-Exonukleaseaktivität der eingesetzten Taq-Polymerase während der PCR-Reaktion werden die Fluoreszenzmoleküle am 5'-Ende räumlich vom Quencher getrennt, die Fluoreszenz wird nicht mehr absorbiert und kann somit als proportional zur amplifizierten DNA-Menge messbares Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Die Normalisierung zur eingesetzten Gesamt DNA Menge fand durch die gleichzeitige Verwendung eines zweiten TaqMan-Assays für einen endogenen Locus statt. Für murine Proben war dieser spezifisch für das  $\beta$ -Aktin Gen, und in humanen für das Erythropoetin-Rezeptor-Gen. Für die Bestimmung des Chimärismus wurde zunächst gDNA aus dem KM transplanteder Mäuse isoliert (vgl. Kapitel 3.1.2) und die kommerziell erhältliche TaqMan-Sonde #82 (Roche Universal Probe Library) in Kombination mit Primern komplementär zum *SRY*-Gen (*sex determining region on Y-chromosome*, SRY) genutzt. Ein speziell für den



Roche LightCycler entwickelter qPCR Readymix (*Roche LightCycler Probes Master*) enthält alle weiteren benötigten Materialien für die PCR (z. B. dNTPs, Polymerase etc.).

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
SRY for (40 µM)	0,5 µl	Präinkubation (95°C)	5 min
SRY rev (24 µM)	0,5 µl	Denaturierung (95°C)	15 s
Sonde #82 (FAM) (10 µM)	0,1 µl	Elongation (60°C)	1 min
mβ-Aktin for (12 µM)	0,5 µl	Kühlen (37°C)	∞
mβ-Aktin rev (30 µM)	0,5 µl		
Sonde mβ-Aktin (Texas Red) (16 µM)	0,1 µl		
Roche qPCR Readymix (2x)	10 µl		
DNA (10 ng/µl)	5 µl		
dH <sub>2</sub> O	ad 20 µl		

} 50x

### Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente dazu, um nach pGEM-T-Klonierung die Größe des in den pGEM-T-Vektor klonierten PCR-Produkts in Bakterienklonen zu analysieren. Für diesen Zweck wurden Primer genutzt, die das PCR-Produkt flankieren (M13 for (-20), M13 rev). Die Bakterienklone wurden einzeln mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt und anschließend in vorgelegten 25 µl dH<sub>2</sub>O lysiert. Nach 10 min wurde 25 µl des PCR-Ansatzes dazugegeben und die PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die Produkte der gewünschten Größe sequenziert.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Puffer (10x)	5 µl	Initiale Denaturierung (95°C)	10 min
dNTPs (5 mM)	2 µl	Denaturierung (95°C)	30 s
Primer M13 for (-20) (10 µM)	1 µl	Hybridisierung (56°C)	30 s
	1 µl	Elongation (72°C)	1-2 min
Primer M13 rev (10 µM)	0.5 µl	Finale Elongation (72°C)	5 min
DNA-Polymerase	ad 25 µl	Kühlen (4°C)	∞
dH <sub>2</sub> O			

} 35x

## 3.2 Zellbiologische und virologische Methoden

### 3.2.1 Arbeiten mit Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zelllinien wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten.

### Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Über einen längeren Zeitraum hinweg wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Hierfür wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, in Einfriermedium resuspendiert

und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zunächst für mind. 48 h bei -80°C in vorgekühlten Einfrierboxen gelagert und danach in die Stickstoff-Kryobank umgesetzt.

Zum Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden das Kryoröhrchen mit dem vorgewärmten Zellkulturmedium gespült und die Zellen portionsweise in ein frisches Reaktionsgefäß mit Zellkulturmedium überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend gewaschen, zentrifugiert (1.500 rpm, 5 min, RT) und das Zellpellet in adäquater Menge frischen Mediums resuspendiert.

<b>Einfriermedium:</b>	90% FCS 10% DMSO
------------------------	---------------------

### Kultivierung

Adhärente Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle* Medium (DMEM), Suspensionszellen in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin (P/S) gehalten. Für die Passagierung wurden die adhärenen Zellen mit 1x PBS gewaschen und mittels einer Trypsin-Lösung (0,25% in PBS) von dem Zellkulturgefäß abgelöst. Durch die Zugabe von frischem Medium wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt und die Zellen in einem geeigneten Verhältnis in ein neues Kulturgefäß überführt.

Die mES-Zellen wurden in supplementierten *Glasgow Minimum Essential* Medium (GMEM) auf gelatinisierten Zellkulturschalen kultiviert. Zur Gelatinierung wurden die Zellkulturschalen für 10 min mit 0,1 % Gelatine bedeckt. Danach wurde die Gelatine abgenommen und die Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen auf die Platten ausgesät. Die Passagierung der ES-Zellen erfolgte wie bei ädhärenen Zelllinien mittels Trypsin. Jeden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

<b>mES-Zellmedium:</b>	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat 1x MEM NEA 10 <sup>-4</sup> mM Mercaptoethanol 1000 U/ml LIF
------------------------	--

### 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 Zellen folgendermaßen bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### Behandlung von Zellen mit AP20187

Für die Expansionsversuche der BaF3-Zellen mit Hilfe des iDimerize-Systems mit dem chemischen Liganden AP20186 wurden die Zellen zunächst 2x mit PBS gewaschen, anschließend entweder in Zellkultur-Medium versetzt mit 10 ng/ml mL-3 (normales Kulturmedium) oder mit 10 nM AP20187 (Selektionsmedium) aufgenommen und weiter kultiviert.

### 3.2.2 Produktion $\gamma$ -retroviraler Partikel

#### Produktion VSV-G-pseudotypisierter Viruspartikel

Die Produktion von amphotropen VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln erfolgte in HEK 293T-Zellen durch die „Drei-Plasmid-Transfektion“ [103]. Sowohl der Transfervektor, als auch die beiden Helfervektoren enthalten je einen SV40-Replikationsursprung. Da die HEK 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 einziges Plasmid in die viralen Partikel verpackt, da er das Verpackungssignal ( $\psi$ ) enthält. Die beiden Helferplasmide kodieren für die Strukturgene gag und pol (pCDNA3MLVg/p) bzw. für das virale VSV-G Hüllprotein (pMD2.VSV.G) und werden für die Virusproduktion bereitgestellt, jedoch nicht in die viralen Partikel verpackt.

#### ▪ Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen

Für die Transfektion wurde das synthetische Polymer Polyethylenimin (PEI) nach gängigen Protokollen eingesetzt [104]. Die negativ-geladene DNA wird hierbei in positiv-geladene Partikel verpackt, die per Endozytose von der Zelle aufgenommen werden. Ein Tag vor der Transfektion wurden Zellen aus einer T75-Kulturflasche auf zwei T175-Kulturflaschen aufgeteilt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen zu etwa 75-90 % konfluent sein. Zwei Stunden vor einer Transfektion wurde der Kulturüberstand gegen 12 ml frisches Medium ausgetauscht. Für jede Transfektion einer T175 Kulturflasche wurden folgende Ansätze in einem 10 ml Reaktionsgefäß gemischt:

<b>Lösung A</b>	in 2,3 ml DMEM ohne Zusätze
Transfervektor	17 $\mu$ g
pCDNA3MLVg/p	9,5 $\mu$ g
pMD2.VSV.G	6 $\mu$ g
<b>Lösung B</b>	in 2,2 ml DMEM ohne Zusätze
PEI (180 mM)	140 $\mu$ l

Zunächst wurden beide Lösungen einzeln unter Vortexen gemischt, anschließend wurde Lösung B und Lösung A zusammen pipettiert und nach erneutem sorgfältigem Mischen für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung langsam in die Flasche

pipettiert, durch leichtes Schwenken verteilt und bei 37°C im Brutschrank gelagert. Nach 48 h wurde der Virusüberstand abgesammelt, sterilfiltriert und in einer Ultrazentrifuge aufkonzentriert. Die Transfektionseffizienz wurde durch FACS-Analyse virusproduzierender HEK 293T-Zellen kontrolliert.

#### ▪ **Aufkonzentration von Viruspartikeln**

Der abgesammelte Virusüberstand wurde zunächst bei 4000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert, um Zelldbris zu pelletieren. Anschließend wurde der Virusüberstand durch einen mit PBS vorgewaschenen 0,22 µm-Filter mit PVDF-Membran sterilfiltriert, in spezielle Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und sorgfältig austariert. Die Viruspartikel wurden unter Anwendung eines Saccharose-Gradienten in einer Ultrazentrifuge bei 20500 rpm und 4°C für 2,5 h aufkonzentriert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Viruspellet ü. N. bei 4°C in 1/100 des Ausgangsvolumens in serumfreien Medium rückgelöst. Am nächsten Tag wurde der aufkonzentrierte Virusüberstand in entsprechenden Aliquots bei -80°C gelagert.

#### ▪ **Virustiterbestimmung und Transduktion von Zellen**

Da wiederholtes Einfrieren und Auftauen die Konzentration an infektiösen viralen Partikeln verringert, wurde für Virustiterbestimmungen und Transduktionen immer einmalweggefrorener Virusüberstand verwendet. Der biologische Virustiter wurde durch Transduktion einer definierten Anzahl von Zielzellen berechnet. Am Tag der Transduktion wurden  $2 \times 10^5$  ED-7R bzw. PLB-985 in einer 24-Wellplatte in 250 µl ausgesät. Anschließend wurde der Virusüberstand in verschiedenen Verdünnungen zusammen mit Protaminsulfat in einer Endkonzentration von 4 µg/ml in Duplikaten auf die Zielzellen gegeben und mit Medium auf 500 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Transduktionsansatz wurde ü. N. im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag wurde ein Halbmediumwechsel durchgeführt. Die Bestimmung des Virustiters (transducing units pro Milliliter, TU/ml) erfolgte nach 3-4 Tagen mittels Durchflusszytometrie einer Probe, die maximal zu 20 % das Transgen exprimierte. Somit wurden vor allem Zellen mit nur einer proviralen Kopie pro Zelle in die Auswertung einbezogen und Mehrfachtransduktionen einzelner Zellen vermieden, die zur Fehleinschätzung des biologischen Titers geführt hätten. Der Virustiter wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Titer} \left[ \frac{\text{TU}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Anteil transduzierter Zellen} [\%]}{100 \%} \times \text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### **Produktion mit Hilfe einer retroviralen Verpackungszelllinie**

Die Produktion von ecotropen replikationsinkompetenten  $\gamma$ -retroviralen Partikeln für die Infektion von mES-Zellen erfolgte mit Hilfe der auf HEK 293T basierenden retroviralen Verpackungszelllinie  $\phi$ NX Eco. Einen Tag vor Transfektion wurden  $3 \times 10^6$   $\phi$ NX Eco-Zellen pro 10 cm-Kulturschale ausgesät. Die transiente Transfektion wurde entsprechend des

Protokolls für HEK 293T herunterskaliert auf die Menge für eine 10 cm-Schale mit PEI durchgeführt. Es wurde 10 µg Transfervektor in 1 ml DMEM eingesetzt. Am nächsten Tag fand ein Mediumwechsel mit ES-Zellmedium statt. Der abgesammelte Virusüberstand wurde durch einen 0,22 µM-Filter mit PVDF-Membran steriltrifert und direkt auf die zu infizierenden Zellen gegeben.

#### ▪ **Transduktion von murinen ES-Zellen**

Der abgesammelte Virusüberstand wurde unverdünnt oder 1:100 verdünnt auf die gewaschenen ES-Zellen pipettiert. Nach vier Stunden wurde das Medium auf die normale Menge aufgefüllt und am übernächsten Tag konnte mit der Selektion mittels Hygromycin B auf Virusintegration begonnen werden. Nach 14 Tagen Selektion wurden die Klone mittels Methylenblau angefärbt.

#### ▪ **Färbung der resistenten Klone**

Die Platten mit selektierten ES-Zellklonen wurden zunächst 2x mit PBS gewaschen und dann 10 min mit 5 ml 4 % PFA fixiert. Anschließend wurde 1 % Methylenblau auf die Platten pipettiert und durch Schwenken verteilt. Anschließend wurden die Platten mehrmals mit PBS gewaschen und mit Hilfe einer Mikroskop-Kamera abfotografiert. Die Zählung der angefärbten Kolonien erfolgte mit Hilfe der ImageJ-Software.

### **3.2.3 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Passiert eine Zelle den Detektor wird sie durch den Laserstrahl angeregt und sendet charakteristische Signale wie Emission und Streulicht. Die Lichtstreuung wird von Zelleigenschaften wie Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazellulären Bestandteilen beeinflusst. Je nachdem in welche Richtung das Licht gestreut wird, lassen sich Aussagen über die Granularität und die Zellgröße treffen. Der größte Teil des Lichts wird in Vorwärtsrichtung gestreut und wird als Vorwärtsstreulicht (*forwardscatter*, FSC) bezeichnet. Weil kleine Zellen das Licht weniger streuen stellt das Vorwärtsstreulicht ein Maß für die Zellgröße dar. Das Licht, das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut wird bezeichnet man als Seitwärtsstreulicht (*sidescatter*, SSC) und dient als Maß für die Granularität. Zusätzliche Laser verschiedener Wellenlängen ermöglichen die spezifische Anregung von Fluorophoren, die entweder von der Zelle selbst exprimiert werden (z. B. eGFP) oder an Antikörper gekoppelt sein können. Innerhalb dieser Arbeit wurden FACS-Messungen an einem FACS Calibur unter Verwendung der Cell Quest Pro sowie an einem FACS Canto II und einem Fortessa unter Verwendung der FACS-Diva 6.0 durchgeführt. Für die Sortierung spezifischer Zellpopulationen wurde ein FACS Aria III mit der FACS-Diva 7.0 eingesetzt.

### Extrazelluläre Färbung von Oberflächenproteinen

Die zu untersuchenden Zellen wurden in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet anschließend zur extrazellulären Detektion von Oberflächenproteinen mit den entsprechenden Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Hierfür wurden je 1 µl von fluorophorgekoppeltem Primärantikörper (vgl. Kapitel 2.5.1) verwendet. Nach Waschen wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen. Zur Vorbereitung für eine Sortierung der Zellen wurden diese zusätzlich mittels eines Zellsiebes vereinzelt, um eine Verstopfung der empfindlichen Kapillare des Aria III zu vermeiden.

### Intrazelluläre Färbung phosphorylierter Proteine

Für die Detektion von phosphoryliertem STAT5 nach Stimulation mit IL-2 in ED-7R Zellen musste eine intrazelluläre Färbung durchgeführt werden. Direkt nach Stimulation der Zellen mit 100 ng/µl IL-2 für 10 min bei 37°C im Brutschrank wurde die Zellsuspension mit einem Volumenanteil vorgewärmtem BD Cytofix-Puffer gemischt und für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1400 rpm und Absaugen des Überstandes, wurden die fixierten Zellen 1x mit Wasch-/Färbepuffer gewaschen und zentrifugiert (5 min, 1400 rpm). Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen durch paralleles Vortexen und langsames Zugeben von 500 µl eiskaltem BD PermBuffer III permeabilisiert. Nach 30 min auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert und 2x mit 5 ml Wasch-/Färbepuffer gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl Wasch-/Färbepuffer resuspendiert und 30-45 min auf Eis mit 20 µl anti-pSTAT5-AlexaFluor488 und 2 µl anti-CD132-PE gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Proben sofort am FACS Fortessa analysiert.

<b>Wasch-/Färbepuffer:</b>	in 500 ml 1x PBS 1 % FCS 0,09 % Na-Azid
----------------------------	---

### 3.2.4 *In vitro* Proliferations-Assay mit primären T-Zellen aus der Maus

Ein Tag vor Isolation der T-Zellen aus den Milzen von transplantierten Mäusen wurde die entsprechende Anzahl an Wells einer 96-Wellplatte mit 3 µg/ml anti-CD3 und 5 µg/ml anti-CD28 beschichtet und ü. N. im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Nach Isolation der T-Zellen aus der Milz der Mäuse wurden  $0,5 \cdot 2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well entweder in 100-200 µl purem Mausmilzmedium oder supplementiert mit 500 U/ml IL-2 ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden 50-100 µl frisches Medium zugegeben. Nach drei Tagen erfolgte die Analyse der Proliferation durch Detektion des intrazellulären ATP-Gehalts in einem Luminometer mit Hilfe des ViaLight Plus Kit der Firma Lonza nach Herstellerangaben.

<b>Mausmilzmedium:</b>	in RPMI 10 % FCS 1 % P/S 0,09 % Na-Azid
------------------------	--

### 3.3 Tierexperimentelle Methoden

#### 3.3.1 Arbeiten mit primären Mauszellen

##### Isolation und Kultivierung von hämatopoetischen Mauszellen

Die Isolation von Lin<sup>-</sup>-Zellen (vgl. Abb. 1.1) aus dem Knochenmark von Mäusen dient der Anreicherung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Das KM besteht zu etwa 99 % aus differenzierten Zellen, die über die Expression der spezifischen Linienmarker selektiv entfernt werden. In dieser Arbeit wurde die Isolation mittels MACS (*magnetic activated cell sorting*) durchgeführt. Zur Isolation von murinen Stamm- und Vorläuferzellen aus dem KM wurde das *Lineage Cell Depletion Kit* der Firma Miltenyi benutzt. Das KM wurde mit PBS (plus 100 U/ml P/S) aus den Femora gespült und mittels 50 µM Zellsieben homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und mit MACS-Puffer aufgefüllt. Durch Zentrifugation (800 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Zellen pelletiert und anschließend mit 400 µl MACS-Puffer pro 10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Dann wurden 100 µl pro 10<sup>8</sup> Zellen des Biotin-Antikörper-Mix (CD5, B220, CD11b, Gr-1, 7-4 und Ter-119) hinzugegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl MACS-Puffer sowie 200 µl pro 10<sup>8</sup> Zellen der magnetischen *Beads* hinzugefügt. An diesen Beads sind biotinspezifische Antikörper immobilisiert, die wiederum an die zuvor angefärbten primären, biotinylierten Antikörper binden. Nach 15 min Inkubation bei 4°C wurde das Falcon mit MACS-Puffer aufgefüllt und die Zellen durch Zentrifugation (800 rpm, 4°C, 10 min) pelletiert. Zuletzt wurden die Zellen in 500 µl pro 10<sup>8</sup> Zellen MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf eine mit MACS-Puffer equilibrierte MACS-Säule (Größe: LS) gegeben, die in einem QuadroMACS-Zellseparator platziert wurde. Die Säule wurde 3 x mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und die nicht-markierten Stamm- und Vorläuferzellen in einem 15 ml Falcon gesammelt. Die antikörpergebundenen differenzierten Zellen werden durch das magnetische Feld und die magnetischen Beads in der Säule zurückgehalten. Zuletzt wurde die Zellzahl bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.1) und die Zellen in entsprechendem Zytokin-Medium kultiviert. Isolierte Lin<sup>-</sup>-Zellen für die X-SCID-Transplantationsversuche wurden in einem Volumen von 10<sup>6</sup> pro ml in serumfreien StemSpan SFEM Medium supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml P/S, 100 ng/ml mSCF, 100 ng/ml mFlt3L, 100 ng/ml hIL-11 und 20 ng/ml mIL-3 kultiviert [105]. Für alle anderen Experimente wurden die Lin<sup>-</sup>-Zellen in StemSpan SFEM Medium supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml P/S, 10 ng/ml mSCF, 20 ng/ml mTPO, 20 ng/ml mIGF-2 und 10 ng/ml hFGF-1, dem sog. STIF-Mix

kultiviert [106]. Dieses Medium soll aufgrund der geringen Zytokin-Konzentration eine kurzfristige Kultivierung repopulierender Stammzellen ermöglichen.

<b>MACS-Puffer:</b>	in PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA 100 U/ml P/S
---------------------	--

### Transduktion und Transplantation

Die primären Lin<sup>-</sup>-Zellen wurden nach einer 48 stündigen Zytokin-Prästimulation in 24-Wellplatten mit  $\gamma$ -retroviralen Partikeln transduziert. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l Zytokin-Medium vorgelegt und Virusüberstand eines bekannten Titers (vgl. Kapitel 3.2.2) dazu pipettiert. Dabei wurden eine MOI (*multiplicity of infection*) von 2,5 und eine maximale Menge von 50  $\mu$ l ankonzentriertem Virusüberstand angestrebt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (2000 rpm, 30 min, 32°C) und nach etwa 4 h erfolgte ein Halbmediumwechsel.

Einen Tag nach Transduktion wurden die Lin<sup>-</sup>-Zellen mit PBS gewaschen und  $1 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen und auf Eis gelagert. Anschließend wurden pro Maus 200  $\mu$ l der Zellsuspension in die Schwanzvene von lethal (9,5 Gy) bestrahlten Mäusen injiziert. Nach der Transplantation wurden die Mäuse 2 Wochen mit 1,6 g/L Neomycin versetztem Trinkwasser versorgt. 6 Monate nach Transplantation erfolgte die Endanalyse, bei der das KM, der Thymus, die Lymphknoten und die Milz der Mäuse analysiert wurden. Außerdem wurden T-Zellen aus der Milz der Mäuse isoliert (siehe unten), mit denen weitere Analysen durchgeführt wurden.

### Entnahme und Analyse peripherer Blutproben

In regelmäßigen Abständen (1 x monatlich) wurde das periphere Blut der Mäuse mittels FACS und der Erstellung eines Differentialblutbildes untersucht. Dafür wurde durch Kappen der Schwanzspitze Blut in EDTA-beschichtete Kapillaren entnommen, unter Verwendung von PBS ausgespült und in FACS-Röhrchen überführt. Ein kleiner Volumenanteil des Blutes wurde direkt aus den EDTA-Röhrchen im Blutbildmessgerät scil vet abc der Firma *scil animal care company* analysiert. Dieses Gerät liefert in kürzester Zeit ein großes Blutbild der analysierten Maus inklusive der Anzahl aller hämatopoetischer Zellen (z. B. Leukozytenanzahl) pro  $\mu$ l Blut und anderen wichtigen Blutwerten (z. B. Hämoglobinkonzentration). In der vorliegenden Arbeit konnte aus der Kombination der gemessenen Lymphozytenanzahl und der Detektion von Antikörperpositiven Zellen im Durchflusszytometer die absolute Zahl an z. B. CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (vgl. Abb. 4.18) im peripheren Blut errechnet werden.



Die Lyse der Erythrozyten vor der FACS-Messung erfolgte durch Zugabe von 3 ml Pharmlysis Puffer und der anschließenden Inkubation bei RT im Dunkeln für 5 min. Dann wurde die Lyse durch Zugabe von PBS abgestoppt und die Zellen durch Zentrifugation (1400 rpm, 5 min, RT) pelletiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt (vgl. Abb. 4.17) und per Durchflusszytometrie (vgl. Kapitel 3.2.3) analysiert.

### **Isolation und Kultivierung muriner T-Zellen**

Die Isolation von T-Zellen aus der Milz transplantiertter Mäuse diente der funktionalen Überprüfung der rekonstituierten Lymphozyten. Die Isolation erfolgte ebenfalls mittels MACS. Zur Isolation wurde das *Pan T Cell Isolation Kit II* der Firma Miltenyi benutzt. Die Milz wurde zunächst durch ein 50  $\mu$ M Zellsieb gedrückt, um die Zellen zu vereinzeln. Anschließend erfolgte die Erythrozyten-Lyse (siehe oben) und die Milzzellen wurden gezählt (vgl. Kapitel 3.2.1). Die pelletierten Zellen wurden mit 40  $\mu$ l MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Dann wurden 10  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen des Pan T-Zell-Biotin-Antikörper-Mix (CD11b, CD11c, CD19, B220, CD49b, CD105, anti-MHC Klasse II und Ter-119) hinzugegeben und für 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 30  $\mu$ l MACS-Puffer sowie 20  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen der magnetischen *Beads* hinzugefügt. An diesen Beads sind biotinspezifische Antikörper immobilisiert, die wiederum an die zuvor angefärbten primären, biotinylierten Antikörper binden. Nach 10 min Inkubation bei 4°C wurde das Falcon mit MACS-Puffer aufgefüllt und die Zellen durch Zentrifugation (800 rpm, 4°C, 10 min) pelletiert. Zuletzt wurden die Zellen in 500  $\mu$ l pro  $10^8$  Zellen MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf eine mit MACS-Puffer equilibrierte MACS-Säule (Größe: LS) gegeben, die in einem QuadroMACS-Zellseparator platziert wurde. Die Säule wurde 1 x mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und die nicht-markierten angereicherten T-Zellen in einem 15 ml Falcon gesammelt. Zuletzt wurde die Zellzahl bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.1) und die Zellen für die jeweiligen weiterführenden Analysen (vgl. Kapitel 3.1.4, 3.2.4 und 3.4.2) aufgeteilt.

## **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.4.1 Stimulation der Zellen und Herstellung von Zelllysaten**

Für die Detektion von phosphoryliertem STAT5 per Western Blot wurden die zu analysierenden Zellen (transduzierte ED-7R-Zellen bzw. rekonstituierte T-Zellen transplantiertter Mäuse) zunächst ü. N. in FCS-freiem Medium kultiviert und am nächsten Tag wurde ein Teil der Zellen für 30 min bei 37°C mit 100 ng/ml IL-2 stimuliert.

Zur Herstellung von Zelllysaten für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Zellmenge in 20-100  $\mu$ l Stürmer Lysepuffer plus Protease- und Phosphatase inhibierende

Zusätze (1:50 Protease-Inhibitor-Cocktail, 1:100 100 mM Vanadate und 1:100 50 mM Natriumfluorid) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Der Zelldebris wurde bei 15.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt nach Bradford ermittelt. Alle Waschschritte wurden mit eiskaltem PBS und mit gekühlter Zentrifuge (4°C) durchgeführt.

<b>Stürmer Lysepuffer:</b>	50 mM Tris-HCL pH 7.5 150 mM NaCl 2 mM EDTA pH 8 1% NP-40
----------------------------	--

### 3.4.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 30-120 kDa wurden 10% SDS-Gele verwendet. Dafür wurde ein 10%iges Trenngel und ein 4%iges Sammelgel in eine 1 mm Kassette gegossen. Die Proteinproben im Ladepuffer wurden für 5 min bei 95°C denaturiert. Je nach Experiment wurden 20-60 µg Protein in eine Geltasche geladen. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte in 10x Laufpuffer bei einer Spannung von 120 V für ca. 90 min.

Die im SDS-Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran mittels des *Semi-Dry Blot Systems* der Firma Life Technologies transferiert. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer bei 35 mA pro Blot für 2 h bei RT. Nach Blockierung in einer Blockierungslösung wurde die Membran ü. N. bei 4°C mit dem primären Antikörper (vgl. Kapitel 2.5.2) in Färbelösung plus 0,2% Na-Azid inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran 3 x für 5 min bei RT in TBS-T gewaschen und anschließend für 60 min bei RT mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in TBS-T inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 1 min mit dem entsprechenden ECL-Reagenz inkubiert. Das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol wird dabei durch die Peroxidase, welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, oxidiert. Die dabei entstehende Lumineszenz und das charakteristische Molekulargewicht der Proteine (vgl. Kapitel 2.5.2) wurde mit Hilfe des Geldokumentationssystem Odyssey Fc detektiert (vgl. Abb. 4.12 und Abb. 4.24).

<b>Ladepuffer (4x):</b>	200 mM Tris-HCL pH 6,8 8% SDS 40% Glycerol 0,4% Bromphenolblau 100 mM DTT
<b>Laufpuffer (1x):</b>	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
<b>Trenngel (10%, 2 Stück):</b>	3 ml Acrylamid (40%) 3,47 ml Bis-Tris-Gel-Puffer 5,6 ml Wasser 80 µl APS (10%) 22,4 µl TEMED
<b>Sammelgel (4%, 2 Stück):</b>	1,374 ml Acrylamid (40%) 1,1 ml Bis-Tris-Gel-Puffer 5,44 ml Wasser 80,6 µl APS (10%) 8 µl TEMED
<b>Transferpuffer:</b>	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% Methanol
<b>TBS-T:</b>	10 mM Tris pH 7,4 100 mM NaCl 0,05% Tween-20
<b>Färbe-/Blockierungslösung:</b>	in TBS-T 5% Milchpulver



## 4 Ergebnisse

Aufgrund negativer Effekte durch *Silencing* der Transgenexpression, Insertionsmutagenese und resultierender Transaktivierung benachbarter Onkogene in früheren klinischen Studien [107,108,30], rückt die Entwicklung neuartiger Vektoren, mit geringerem Sicherheitsrisiko und verbesserter physiologischer Expression in den Vordergrund [109,110]. Genfallen-Vektoren (*gene trap*, GT) könnten eine sicherere alternative Möglichkeit darstellen, da sie zum einen auf  $\gamma$ -retroviralen Vektoren der zweiten Generation basieren (vgl. Abb. 1.10), bei denen durch Entfernung kodierender, viraler Sequenzen und einer Deletion in der U3-Promotor/*Enhancer*-Region des 3'LTRs eine selbstinaktivierende (*self inactivating*, SIN) Konfiguration entsteht [58]. Zum anderen enthalten Genfallen-Vektoren keinen internen Promotor, der zur Transaktivierung benachbarter Gene führen kann, stellen also das integrierte Transgen unter die Kontrolle endogener Promotoren und führen zu einem zellspezifischen Expressionsprofil. Im Folgenden werden Genfallen-Vektoren *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich ihres Potentials als Vektoren für die Gentherapie bewertet.

### 4.1 Evaluierung von Genfallen-Vektoren *in vitro*

Zunächst wurden unterschiedliche Designs von Genfallen-Vektoren hinsichtlich ihrer Effizienz in zwei experimentellen *in vitro* Ansätzen untersucht. Im Anschluss wurde ein induzierbares Expansionssystem mit Genfallen-exprimierender Zellen in einer faktorabhängigen hämatopoetischen Zelllinie sowie primären hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen untersucht. Darüber hinaus wurde die Funktionalität eines therapeutischen Genfallen-Vektors für die Behandlung von X-SCID in einer entsprechenden *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Zelllinie untersucht.

#### 4.1.1 Analyse unterschiedlicher Genfallen-Vektoren in murinen embryonalen Stammzellen

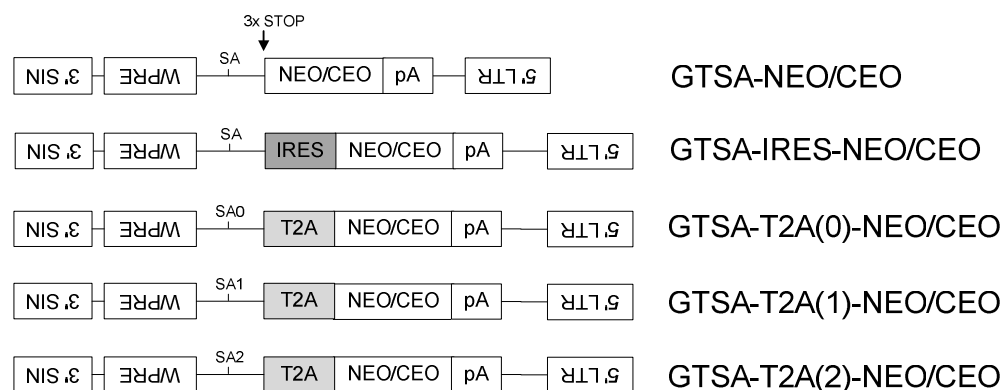
Eine Eigenschaft  $\gamma$ -retroviraler Vektoren ist die zufällige Integration in das Genom einer Zelle. Es ist bekannt, dass diese Vektoren bevorzugt in Genabschnitten nahe der 5'-Region aktiver Gene integrieren, wo die Initiation der Transkription beginnt (*transcription start sites*, TSS), unabhängig von einer konventionellen oder einer SIN-Konfiguration [111]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Genfallen-Vektoren mit kurativen Genen (gp91<sup>phox</sup>, *IL2RG*) auf  $\gamma$ -retroviralem Hintergrund entwickelt werden, die eine effiziente Transgenexpression gewährleisten.

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, besteht ein klassischer Genfallen-Vektor aus dem gewünschten Transgen, das von einem 5' liegenden Spleißakzeptor (SA) und einer 3' liegenden Polyadenylierungssequenz (pA) flankiert wird. Da die Aktivierung einer klassischen

Genfalle auf eine Integration in exprimierte endogene Gene angewiesen ist, entstehen am Integrationsort Fusionstranskripte und somit Fusionsproteine, die sich aus dem 5'-trunkierten endogenen und dem zu exprimierenden Therapiegen zusammensetzen (vgl. Abb. 1.11). Derartige Fusionen können allerdings die Funktionalität des Therapiegens beeinflussen. Zum Beispiel besitzt das  $\gamma$ c-Transmembranprotein eine Signalsequenz, die für dessen Export an die Zellmembran verantwortlich ist. Eine funktionale N-terminale Fusion müsste demnach die Signalsequenz zwischen dem trunkierten endogenem Protein und dem  $\gamma$ c enthalten, was mit einem klassischen Genfallen-Ansatz nicht möglich ist. Zur Vermeidung einer derartigen Konstellation, wählten wir Strategien, die N-terminale Fusionen verhindern und den Membrantransport von  $\gamma$ c oder vergleichbaren sekretorischen Proteinen gewährleisten. Diese beinhalten zum einen den Einsatz einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES), die eine bicistronische Translation der mRNA am Ribosom ermöglicht. Zum anderen kann durch den Einsatz von viralen Proteinspaltungspeptiden (*multiprotein cleavage sequence*), wie z. B. dem 2A-Peptid aus dem Maul- und Klauenseuche-Virus (*foot and mouth disease virus*, FMDV) [112] oder 2A-ähnliche Sequenzen aus dem *Thosea asigna virus* (T2A) eine posttranslationale Spaltung von polycistronisch translatierten Multiproteinen erzielt werden [113]. Allerdings muss bei dieser Strategie anders als bei der IRES darauf geachtet werden, dass sich die durch 2A-Sequenzen verknüpften Proteine im gleichen Leserahmen befinden. Für einen Genfallenansatz bedeutet dies, dass separate Vektoren für die drei Leserahmen konstruiert werden müssen. Schließlich schien auch eine spontane Reinitiation ohne IRES und 2A eine tragfähige Alternative weil 40 % aller Gene ein nicht kodierendes 1. Exon besitzen und viele andere in ihrem 5' untranslatierten Bereich (*untranslated region*, UTR) nur kurze offene Leserahmen enthalten (persönliche Mitteilung, Frank Schnütgen). Um die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Reinitiation zu erhöhen, wurden in die Genfalle hinter den SA drei Stop-Codons eingefügt. Eine Reinitiation der Translation am darauffolgenden ATG würde dann die Expression eines intakten Therapieproteins ermöglichen.

Um zu testen, welcher Genfallen-Vektor zur effizientesten Translation und somit zur stärksten Proteinexpression führt, wurden murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) mit Vektoren transduziert, die (i) ein IRES-Element, (ii) T2A-Elemente in den drei unterschiedlichen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) oder (iii) nur den SA mit Stop-Codons in allen drei Leserahmen 5' eines Neomycinresistenz vermittelnden Gens enthielten. Neben dem klassischen Neomycinresistenzgen (NEO) wurde auch ein Signalpeptid kodierendes CD2-Neo-Fusionsgen (CEO) [114] benutzt, um die Expression membranständiger Proteine, wie  $\gamma$ c (*IL2RG*) und gp91<sup>phox</sup> (*CYBB*), zu simulieren (Abb. 4.1). Die Virusproduktion erfolgte mit Hilfe der retroviralen Verpackungszelllinie  $\phi$ NX Eco (vgl. Kapitel 3.2.2) und die ES-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Virusüberstand (unverdünnt oder 1:10 verdünnt) transduziert und in Geneticin (G-418)

selektiert. Nach zweiwöchiger Selektion wurden die Neo-resistenten Kolonien mit Methylenblau angefärbt (Abb. 4.2).



**Abb. 4.1: Verwendete Genfallen-Vektoren mit zwei verschiedenen Resistenzgenen**

Alle hier abgebildete Vektoren basieren auf einem gammaretroviralen SIN-Vektor und beinhalten ein WPRE Element. Die Konstrukte codieren entweder das NEO- oder das CEO-Gen welches von einem SA und einer pA flankiert wird. Unterscheiden lassen sich die Konstrukte durch die Art der Translationsinitiation (spontane Reinitiation durch drei Stop-Signale, IRES oder T2A-Elemente in drei Leserahmen). Eine Auswertung der Anzahl der entstandenen Kolonien erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ<sup>4</sup>.

SIN: *self inactivating*, NEO: Neomycin-Geneticin-Resistenzgen, CEO: Oberflächenmolekül CD2 fusioniert mit dem Neomycin-Geneticin-Resistenzgen, WPRE: posttranskriptionales regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, T2A: 2A-Peptide aus dem *Thosea asigna* Insekten-Virus, SA: Spleißakzeptor, pA: Polyadenylierungssignal, LTR: *long terminal repeat*, GT: Genfalle.

Insgesamt waren die NEO-Vektoren effizienter als die CEO-Vektoren (Abb. 4.2). Dies könnte zum Teil damit zusammenhängen, dass CEO nur als membranständiges Protein aktiv sein kann und hierfür möglicherweise eine höhere Expression erforderlich ist, um eine mit dem zytoplasmatisch lokalisierten NEO gleichwertige Resistenz zu erzeugen. Weiterhin waren die auf SA und Stop-Codon basierenden Vektoren am effizientesten (Abb. 4.2) und bildeten deswegen die Grundlage für die in den folgenden Experimenten benutzen Genfallen-Gentherapie-Vektoren. Der Einfachheit halber werden diese im Folgenden nur noch als GT-Vektoren bezeichnet.

<sup>4</sup> <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>

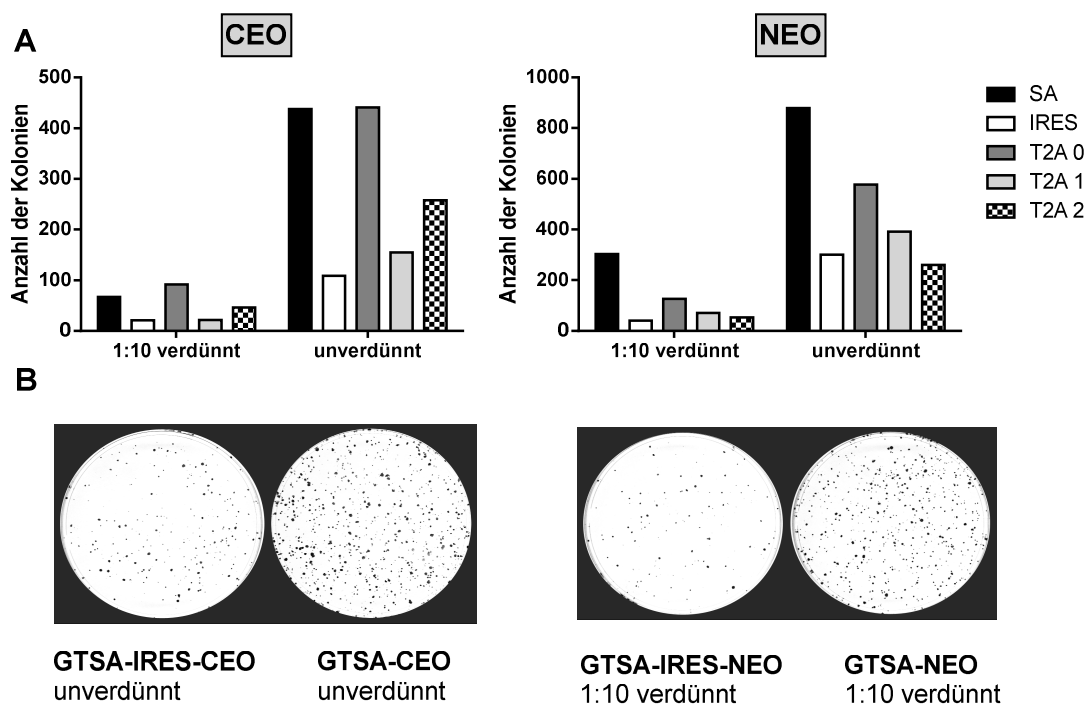


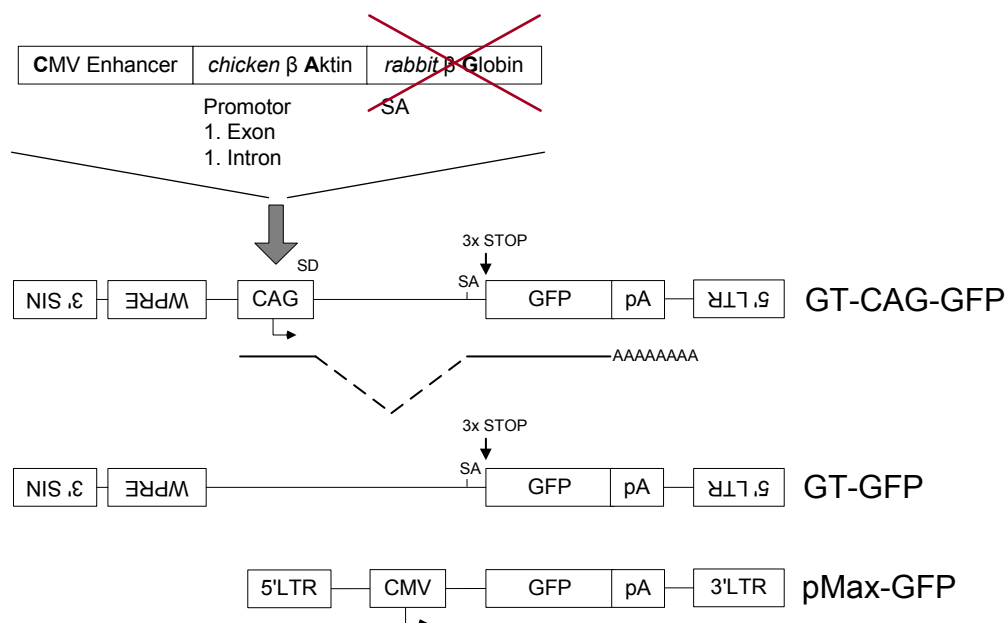
Abb. 4.2: Effizienz der unterschiedlichen Genfallen-Vektoren in murinen ES-Zellen

(A) Anzahl der Kolonien nach Transduktion mit unverdünntem oder verdünntem Virusüberstand der unterschiedlichen CEO-Konstrukte (links) und NEO-Konstrukte (rechts). (B) Exemplarische Bilder der Kolonien nach Färbung mit Methylenblau von Zellen transduziert mit unverdünntem Virus GTSA-IRES-CEO und GTSA-CEO (links) bzw. verdünntem Virus von GT-IRES-NEO und GTSA-NEO (rechts).

#### 4.1.2 Validierung des GT-Vektors mit Hilfe eines artifiziell nachgebildeten Genfallenergebnisses

Die Expression von Transgenen in GT-Vektoren ist nicht nur von endogenen Promotoren abhängig, sondern auch von einem korrekten Spleißvorgang. Um die Spleißeffizienz des GT-Vektors zu testen, wurde ein Genfallenergebnis in einem SIN-Vektor artifiziell nachgebildet. Hierfür wurde der synthetische CAG-Promotor zusammen mit einem Spleißdonor (SD) *upstream* einer SA-GFP-pA-Kassette kloniert. [115]. Der CAG-Promotor besteht aus: (i) einem *Enhancer*-Element des Cytomegalievirus (CMV), (ii) dem Promotor, Exon 1 mit SD und Intron 1 des Hühner  $\beta$ -Aktin Gens sowie (iii) dem SA des Hasen  $\beta$ -Globin Gens wobei letzterer deletiert wurde, um einen Spleißvorgang zwischen dem CAG-SD und dem Genfallen-SA zu ermöglichen (Abb. 4.3). Der so entstandene GT-CAG-GFP Vektor wurde transient in HEK293T transfiziert und die GFP-Expression nach 48 Stunden durchflusszytometrisch quantifiziert. Als Negativkontrolle diente der reine GT-GFP Vektor ohne Promotor und als Positivkontrolle der optimierte, kommerziell erhältliche pMax-GFP Vektor.



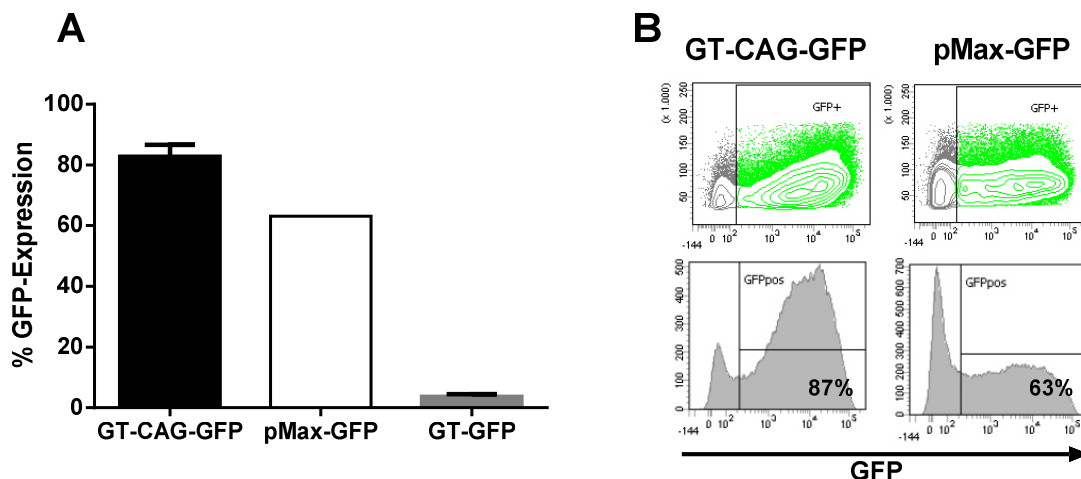


**Abb. 4.3: Schematische Darstellung des verwendeten Vektors mit internem Promotor und der Kontrollvektoren**

Der deletierte CAG Promotor, der sich aus verschiedenen Elementen zusammensetzt wurde vor die Genfall-Kassette kloniert und reguliert die Transkription des GFPs. Als Negativkontrolle diente der klassische GT-GFP und als Positivkontrolle wurde das kommerziell erhältliche pMax-GFP-Konstrukt verwendet, bei dem die GFP-Expression unter Kontrolle des CMV-Promotors steht.

CMV: Cytomegalievirus, SA: Spleißakzeptor, SIN: *self inactivating*, WPRE: posttranskriptionales regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus, GFP: grünfluoreszierendes Protein pA: Polyadenylierungssignal, LTR: *long terminal repeat*

Wie in Abb. 4.4 A dargestellt, exprimierten zwei Tage nach Transfektion 83 % der GT-CAG-GFP transfizierten HEK293T Zellen GFP, was mit der Expression der pMax-GFP transfizierten Zellen vergleichbar war. Wie erwartet exprimierten die GT-GFP transfizierten Zellen ohne Promotor kein GFP (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4: Imitation einer Genfallen-Integration**

(A) Die prozentuale GFP-Expression in transfizierten 293T-Zellen an Tag 2 nach transienter Transfektion mit drei unterschiedlichen Vektoren (GT-CAG-GFP, pMaxGFP und GT-GFP) ermittelt durch Durchflusszytometrie. (B) Repräsentative Punktdiagramme und Histogramme der GFP-Expression an Tag 2 nach Transfektion mit GT-CAG-GFP sowie pMaxGFP.

GFP: grünfluoreszierendes Protein, FSC: Vorwärtsstreulicht  
(n=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Die vergleichbare GFP-Expression von GT-CAG-GFP und pMax-GFP transduzierten Zellen besagt, dass die eingebauten Stop-Codons nicht mit der Reporterexpression interferieren.

#### 4.1.3 Expansion genmodifizierter Zellen mit Hilfe eines induzierbaren Selektionssystems

In den Vorarbeiten konnte mittels der Genfallenstrategie ein  $gp91^{phox}$ -Defekt in einer  $gp91^{phox}$ -defizienten Leukämiezelllinie (PLB-XCGD) korrigiert werden. Wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, führen Mutationen in  $gp91^{phox}$  zur septischen Granulomatose. Mit der Genfalle GT- $gp91^{phox}$  transduzierte PLB-XCGD Zellen exprimierten allerdings, verglichen zu den mit dem Promotor-enthaltenden Kontrollvektor (FES- $gp91^{phox}$ ) transduzierten Zellen, mit weitaus geringerer Effizienz (Abb. 4.5 A). Die nach mehreren FACS-Runden angereicherten GT- $gp91^{phox}$  Zellen ließen sich zu Granulozyten differenzieren und produzierten ROS im Cytochrom-C Reduktionstest [116], wobei die ROS-Produktion von GT- $gp91^{phox}$  Zellen eindeutig unter der ROS-Produktion der FES- $gp91^{phox}$  Kontrollzellen lag (Abb. 4.5 B). Anhand des Quotienten aus  $gp91^{phox}$ -positiven Zellen und der über qPCR bestimmten Vektorkopienzahl (*vector copy number*, VCN) ließ sich schließen, dass die  $gp91^{phox}$ -Expression von endogenen Promotoren etwa 4-fach geringer war, als die vom exogenen FES-Promotor (Abb. 4.5 C und D).

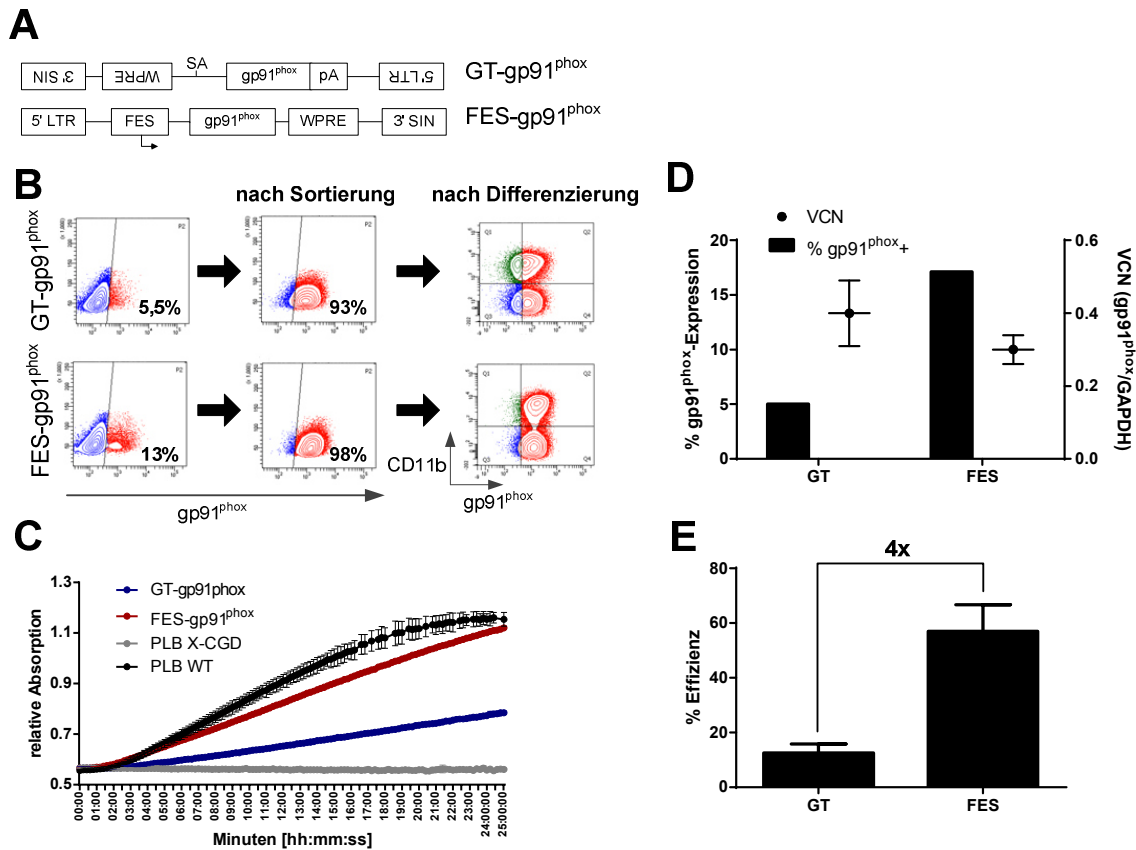


Abb. 4.5: Funktionale Rekonstitution humaner Zellen mit einem gp91<sup>phox</sup>-Genfallen-Vektor

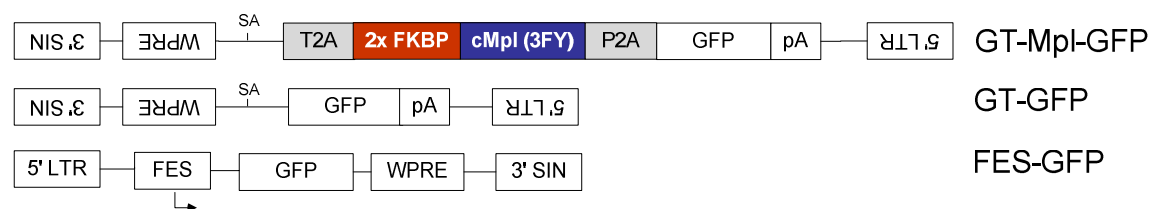
(A) Transduktionseffizienz analysiert per Durchflusszytometrie, anschließende Sortierung der gp91<sup>phox</sup>-positiven-Zellen und Differenzierung in CD11b/gp91<sup>phox</sup>-positive-Granulozyten nach Transduktion mit dem Genfallen-Vektor sowie einem Kontrollvektor, der den cfes-Promotor enthält. (B) Superoxid-Produktion der transduzierten Zellen sowie der Positivkontrolle (PLB WT) und der Negativkontrolle (PLB-XCGD) gemessen mit Hilfe eines Cytochrom C Assays. (C) Dargestellt ist die gp91<sup>phox</sup>-Expression (linke y-Achse) ermittelt mittels Durchflusszytometrie sowie die Vektorkopienzahl (VCN) ermittelt durch qPCR (rechte y-Achse) von Zellen die mit GT-gp91<sup>phox</sup> und FES-gp91<sup>phox</sup> transduziert wurden. (D) Die berechnete Effizienz (Expression/VCN) eines Genfallen-Vektors im Vergleich zu einem Promotor-Vektor (FES).

GT: Genfalle, FES: Promotor des c-fps/fes-Protoonkogens, CD11b: myeloischer Oberflächenmarker, VCN: Vektorkopienzahl (Daten von Stephan Schultze-Strasser).

Insgesamt zeigen die Daten, dass mit Genfallen ohne Selektion (hier: durch die mehrfache FACS-Sortierung) lediglich ca. 2-5 % der Zellen gp91<sup>phox</sup> exprimieren. Deswegen schien es notwendig, eine einfache und zellschonende Anreicherungsstrategie für transduzierte Zellen zu entwickeln.

### Expansion von transduzierten BaF3-Zellen mit Hilfe des iDimerize-Systems

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Genfallen-Vektor eingesetzt, in dem ein FKBP/Mpl-Fusionsgen (vgl. Abschnitt 1.5) über eine P2A-Sequenz mit einer GFP-pA-Kassette verbunden wurde (Abb. 4.6).



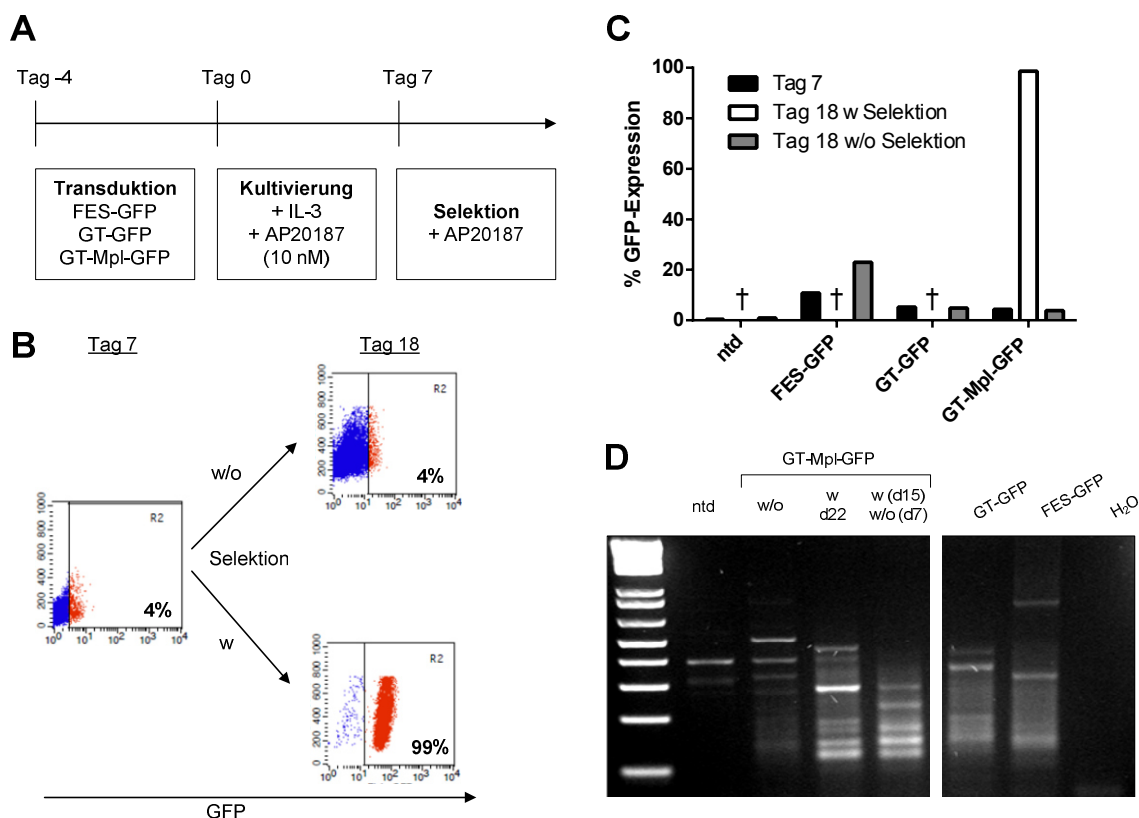
**Abb. 4.6:** Schematische Darstellung des Selektionsvektors GT-Mpl-GFP sowie der verwendeten Kontrollvektoren

Dargestellt sind  $\gamma$ -retrovirale SIN-Vektoren. Als Kontrolle diente ein Genfallen-Vektor ohne Selektionskassette und ein Konstrukt, bei dem die GFP-Expression unter Kontrolle des FES-Promotors steht.

SIN: *self inactivating*, WPRE: posttranskriptionales regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus, SA: Spleiß-Akzeptor, T2A: 2A-Peptide aus dem *Thosea asigna* Insekten-Virus, P2A: 2A-Peptide aus dem porzinen Teschovirus, GFP: grünfluoreszierendes Protein, pA: Polyadenylierungs-Signal, LTR: *long terminal repeat*, FES: Promotor des *c-fps/fes*-Protoonkogens

Mit diesem Vektor wurden in Zusammenarbeit mit Stephan Schultze-Strasser die Interleukin-3-(IL-3)abhängigen hämatopoetischen BaF3-Zellen [95] transduziert und anschließend in Gegenwart des Dimerizers AP20187 kultiviert. Nach vier Tagen in Gegenwart von IL-3 und AP20187 wurde den Zellen IL-3 entzogen.

Abb. 4.7 B und C zeigen, dass nach 18 Tagen in Gegenwart von AP20187 99% der Zellen GFP<sup>+</sup> waren. In Gegenwart von IL-3 hingegen proliferierten die Zellen weiter, doch blieb der Prozentsatz von ursprünglichen 4 % während des gesamten Beobachtungszeitraums konstant. Die nicht-induzierbaren Zellen, transduziert mit GT-GFP und FES-GFP konnten erwartungsgemäß unter AP20187-Selektion nicht überleben, während die GFP-Expression unter IL-3 ebenfalls konstant blieb (Abb. 4.7 C). Dies bedeutet, dass mit iDimerize eine nahezu 25-fache Anreicherung an Genfalle exprimierenden Zellen erreicht wurde. Darüber hinaus konnte mit einer Integrationsort bestimmenden LM-PCR [86] eine Konversion der ursprünglich polyklonalen Population zur Oligoklonalität nachgewiesen werden (Abb. 4.7 D), was bedeutet, dass nur wenige Genfallenergebnisse zu einer anreicherbaren GT-Mpl-GFP Expression geführt haben.



**Abb. 4.7: Expansion der genmodifizierten BaF3-Zellen unter Selektion mit AP20187**

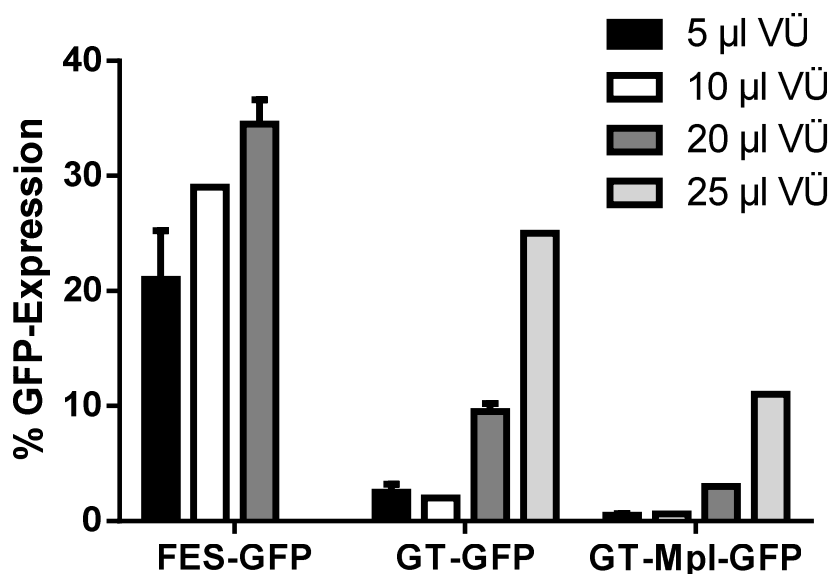
In (A) ist der schematische Ablauf des Selektionsexperiments dargestellt. BaF3-Zellen wurden mit den Vektoren transduziert, vier Tage später mit IL-3 und AP20187 in Kombination kultiviert, nach weiteren drei Tagen wurde das IL-3 entzogen und mit AP20187 weiterkultiviert. (B) zeigt repräsentative FACS-Bilder der kultivierten Zellen, die mit GT-Mpl-GFP transduziert wurden an Tag 7 sowie an Tag 18. (C) Übersicht der GFP-Expression der nicht transduzierten (ntd) und mit FES-GFP, GT-GFP und GT-Mpl-GFP transduzierten Zellen an Tag 7 sowie Tag 18 unter bzw. ohne Selektion. In (D) sind die unterschiedlichen, in einer LM-PCR amplifizierten Fragmente transduzierter Zellen gezeigt. Von GT-Mpl-GFP transduzierten Zellen wurde Proben analysiert, die zum einen unter Standardbedingungen (w/o) und zum anderen über 22 Tage mit AP20187 kultiviert wurden. Die dritte Probe entspricht GT-Mpl-GFP transduzierten Zellen die zunächst 15 Tage mit AP20187 kultiviert und anschließend über einen Zeitraum von 7 Tagen wieder mit IL-3 kultiviert wurden bevor sie per LM-PCR analysiert wurden.

†: Zellen sind gestorben, w: mit, w/o: ohne, ntd: nicht transduzierte Kontrolle, IL-3: Interleukin-3, FES: Promotor des *c-fps/fes*-Protoonkogens, GT: Genfalle, Mpl: Thrombopoetin-Rezeptor, GFP: grünfluoreszierendes Protein, FACS: Durchflusszytometrie. (Daten in (D) von Stephan Schultze-Strasser).

### Expansion von transduzierten murinen Stamm- und Vorläuferzellen mit Hilfe des iDimerize-Systems

In einem nächsten Schritt sollte versucht werden, die Expansionstrategie auf primäre murine Stamm- und Vorläuferzellen zu übertragen. Dazu wurden aus dem Knochenmark von X-CGD-Mäusen [94] Lin<sup>-</sup>-Zellen (vgl. Kapitel 1.1, Abb. 1.1) mit FES-GFP, GT-GFP oder GT-Mpl-GFP transduziert und nach vier Tagen in Gewebekultur die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Abb. 4.8 zeigt, dass die Transduktionseffizienzen von

GT-GFP und GT-Mpl-GFP wie erwartet gegenüber FES-GFP eindeutig geringer waren. Doch konnten mit hohen Viruskonzentrationen immerhin 25 % der Zellen mit GT-GFP und 11 % mit GT-Mpl-GFP transduziert werden (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8: Transduktionseffizienz auf primären Zellen**

Die GFP-Expression bestimmt mittels Durchflusszytometrie vier Tage nach Transduktion mit unterschiedlichen Mengen an Virusüberstand (VÜ) der zwei Kontrollvektoren (FES-GFP, GT-GFP) und des GT-Mpl-GFP-Konstruktes (n=1-2, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Nach Transduktion wurden die Zellen zunächst so lange in Standardmedium kultiviert, bis genügend Zellen vorhanden waren, um mit einer Expansion zu beginnen. In der Regel dauerte dies bis zu 11 Tage. Die Zusammensetzung der hierfür benutzten Medien (Medium 1 und 2) ist in Tab. 4.1 zusammengefasst. Das Medium 1 (Abb. 4.9 links) basiert auf serumfreiem Medium (SFEM) versetzt mit einem Zytokin-Cocktail, der die Expansion von Stamm- und Vorläuferzellen unterstützt und auch unter dem Namen STIF-Mix bekannt ist [106]. Medium 2 (Abb. 4.9 rechts) basiert auf RPMI versetzt mit einem Standard-Zytokin-Cocktail (Tab. 4.1), mit dem es in früheren von der Arbeitsgruppe Grez durchgeführten Experimenten gelang, die Primärzellen mit AP20187 zu expandieren (Dissertation Linping Chen-Wichmann, 2005). Beide Medien wurden mit FCS supplementiert, um die Zellvitalität weiter zu verbessern.

**Tab. 4.1: Medien für die *in vitro* Expansion primärer Maus-Zellen**

SFEM: serum-freies Medium, RPMI: Suspensionszell-Medium, FCS: fötales Kälberserum, L-Glu: L-Glutamin, P/S: Penicillin/Streptomycin, SCF: Stammzellfaktor, TPO: Thrombopoetin, IGF-2: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-2, FGF-1: Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1, IL-3: Interleukin-3, IL-6: Interleukin-6.

	Medium 1		Medium 2	
	Standard	Selektion	Standard	Selektion
<b>Basismedium</b>	SFEM	SFEM	RPMI	RPMI
<b>Zusätze</b>	10 % FCS 1% L-Glu 1% P/S	10 % FCS 1% L-Glu 1% P/S	10 % FCS 1% L-Glu 1% P/S	10 % FCS 1% L-Glu 1% P/S
<b>Zytokine</b>	10 ng/ml mSCF 20 ng/ml mTPO 20 ng/ml mIGF-2 10 ng/ml hFGF-1	10 ng/ml mSCF 10 ng/ml hFGF-1 10 nM AP20187	10 ng/ml mIL-3 50 ng/ml mIL-6 50 ng/ml mSCF	50 ng/ml mSCF 10 nM AP20187

Leider konnte mit beiden Ansätzen keine Expansion der Primärzellen erzielt werden (Abb. 4.9). Obwohl alle Zellen über den Beobachtungszeitraum proliferierten (Abb. 4.9 B), kam es in Gegenwart von AP20187 zu keiner Anreicherung von GFP<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 4.9 A).

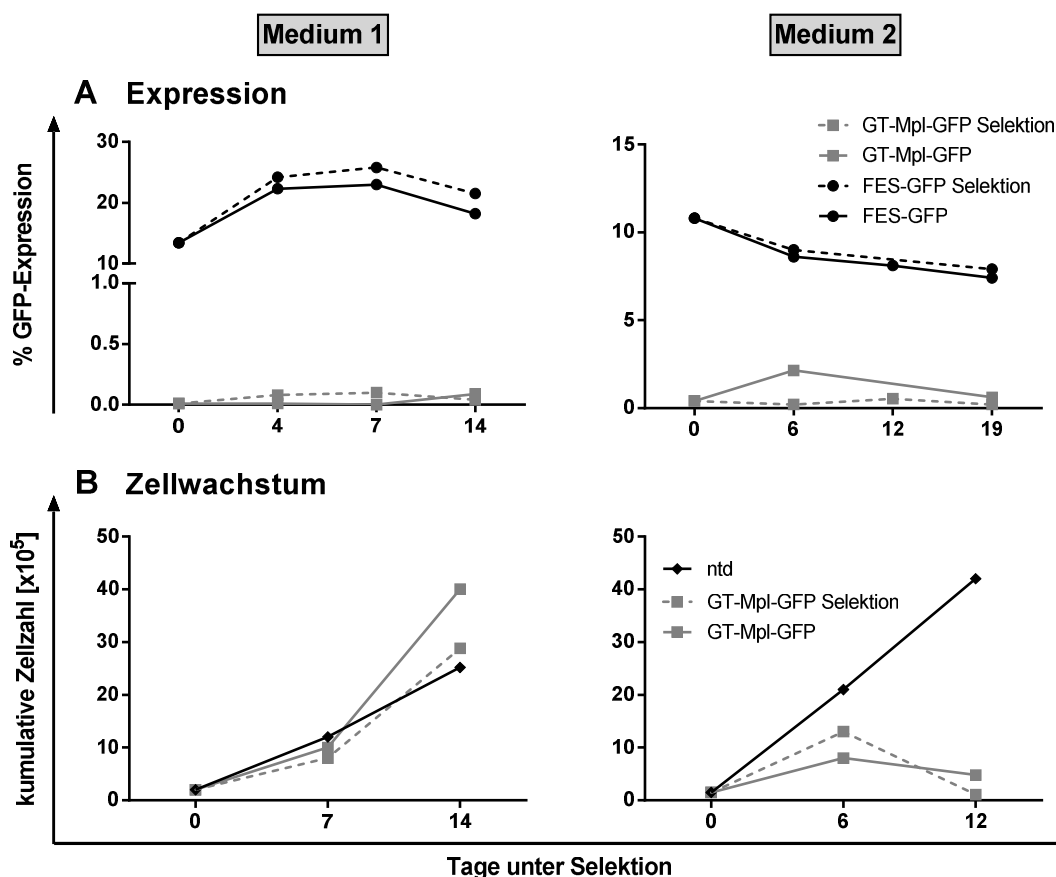


Abb. 4.9: Kinetik von primären Maus-Zellen unter Selektion mit AP20187

Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente. Die murinen Lin<sup>-</sup>-Zellen wurden mit FES-GFP und GT-Mpl-GFP transduziert und entweder unter Selektion (gestrichelte Linie) mit zwei verschiedenen Selektionsmedien (Medium 1 und Medium 2, näher erläutert im Text und in Tab. 4.1) oder unter Standardbedingungen (durchgezogene Linie) kultiviert.

(A) zeigt die Kinetik der GFP-Expression und in (B) ist die Wachstumskinetik der Zellen über die Zeit in Kultur dargestellt.

GFP: grünfluoreszierendes Protein, FES: Promotor des c-fps/fes-Protoonkogens, GT: Genfalle, Mpl: Thrombopoetin-Rezeptor, ntd: nicht transduzierte Kontrolle.

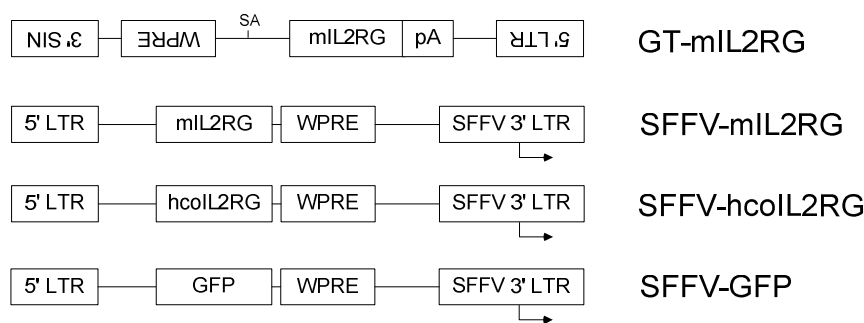
Es stehen mehrere Gründe zur Diskussion, warum es nicht möglich war *in vitro* eine Expansion transduzierter primärer Zellen zu erzielen. Zum einen könnte eine zu niedrige, möglicherweise Vektor- und/oder Integration immanente, cMpl-Expression für eine AP20187 Aktivierung nicht ausreichen. Zum anderen könnte anders als bei den BaF3-Zellen die notwendige Präsenz von Zytokinen den Expansionsdruck vermindern. Aufgrund der vielen ungeklärten Fragen und der noch zu erwartenden Problemen, wurde entschieden, auf eine zweite Anreicherungsstrategie auszuweichen. Und zwar sollte im Folgenden der natürliche Selektionsdruck für *IL2RG* exprimierende Zellen im X-SCID-Mausmodell (vgl. Kapitel 4.2) ausgenutzt werden.

#### 4.1.4 Rekonstitution einer *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Zelllinie

*IL2RG*-Mutationen führen durch einen kompletten Verlust von T-Zellen und einer damit verbundenen Reduktion funktionaler B-Zellen zu der schweren Immundefizienzerkrankung X-SCID (vgl. Kapitel 1.2.3). Wird das mutierte *IL2RG* Gen im Rahmen einer Gentherapie durch eine gesunde Kopie ersetzt, haben die korrigierten, IL-2 stimulierbaren T-Zellen gegenüber den nicht-stimulierbaren *IL2RG*-depletierten T-Zellen einen Wachstumsvorteil. Um diese natürliche, positive Selektion bei der Genfallen-Gentherapie auszunutzen, wurden zunächst Genfallen- und Kontrollvektoren kloniert, die anstatt gp91<sup>phox</sup> (vgl. Abb. 4.5) entweder das murine *IL2RG* (mIL2RG) oder eine Codon-optimierte Variante des humanen *IL2RG* (hcoIL2RG) exprimieren.

Wie in Abb. 4.10 dargestellt, ist der Genfallen-Vektor, abgesehen vom unterschiedlichen Therapiegen, mit den GT-gp91<sup>phox</sup> und GT-GFP Vektoren identisch (vgl. Abb. 4.5, Abb. 4.6), während die Kontrollvektoren auf dem LTR-getriebenen SF71gp91<sup>phox</sup>  $\gamma$ -retroviralen Vektor der ersten Generation basieren, der bei einer in Frankfurt durchgeführten, klinischen X-CGD Gentherapie-Studie zur Anwendung kam [117]. Im letzteren wurde gp91<sup>phox</sup> durch *mIL2RG* bzw. *hcoIL2RG* ersetzt. Die entstandenen SFFV-mIL2RG und SFFV-hcoIL2RG Vektoren wurden in den folgenden Versuchen als Positivkontrollen benutzt. Zur Überprüfung der Transduktionseffizienz und Virusproduktion wurde ein weiterer SFFV-Vektor hergestellt, in dem *IL2RG* durch GFP ersetzt wurde (Abb. 4.10).





**Abb. 4.10: Schematische Darstellung der verwendeten therapeutischen IL2RG-Konstrukte**

Der zuvor entwickelte Genfallen-Vektor mit der cDNA des murinen *IL2RG*-Gens sowie Vektoren basierend auf einem LTR-getriebenen  $\gamma$ -retroviralen Konstrukt mit mIL2RG, hcoIL2RG oder GFP als Positivkontrollen.

SIN: *self inactivating*, WPRE: posttranskriptionales regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus, SA: Spleiß-Akzeptor, pA: Polyadenylierungs-Signal, LTR: *long terminal repeat*, SFFV: Enhancer- und Promotorelemente des *spleen focus forming virus*, mIL2RG: murines IL2RG, hcoIL2RG: humanes codon-optimiertes IL2RG

Um die mit den einzelnen Vektoren erreichbaren biologischen Virustiter zu bestimmen, wurden VSV-G pseudotypisierte Virusüberstände in unterschiedlichen Konzentrationen auf drei verschiedene Zielzellen gegeben und zwar auf die (i) humane *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Zelllinie ED-7R, (ii) humane AML-Zelllinie PLB-985 und (iii) murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie SC-1. Die jeweiligen Virustiter (Berechnung vgl. Kapitel 3.2.2) sind in transduzierende Einheiten (*transducing units*, TU) pro Milliliter (ml) in Tab. 4.2 aufgeführt.

**Tab. 4.2: Biologischer Virustiter der einzelnen Vektoren auf unterschiedlichen Zelllinien**

Dargestellt ist der Mittelwert aller Virustiterbestimmungen (n=2-5) der fünf Vektoren auf den Suspensionszelllinien ED-7R und PLB-985 sowie der adhärennten Zelllinie SC-1.

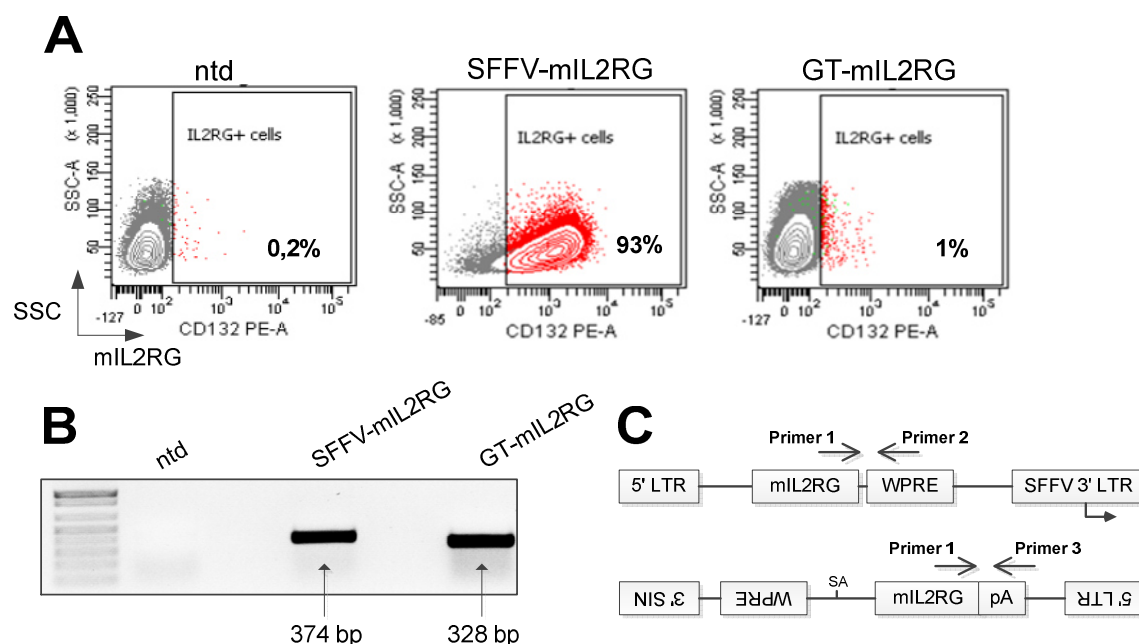
SFFV: *spleen focus forming virus*, GT: Genfalle, TU: *transducing units*, ml: Milliliter, mIL2RG: murines IL2RG, GFP: grünfluoreszierendes Protein, hcoIL2RG: humanes codon-optimiertes IL2RG

Vektor	Zelllinie [(TU/ml) x 10 <sup>6</sup> ]		
	ED-7R	PLB-985	SC-1
<b>mit Promotor:</b>			
SFFV-mIL2RG	5	19	136
SFFV-GFP	23	76	140
SFFV-hcoIL2RG	3,5	25	-
<b>Genfallen:</b>			
GT-mIL2RG	1	-	-
GT-GFP	4	15	-

Erfahrungsgemäß waren die biologischen Virustiter stark von den jeweilig benutzten Zielzellen abhängig. Dementsprechend war der mittlere Virustiter auf PLB-985-Zellen für alle Konstrukte ca. 4-fach höher als auf ED-7R-Zellen, was bedeutet, dass letztere sich unter Verwendung des gleichen Konstruktes schwerer transduzieren lassen.

Ferner war der Titer der GFP-Konstrukte gegenüber den IL2RG-Konstrukten auch ca. 4-fach höher, was wahrscheinlich die unterschiedlichen Detektionsgrenzen von direkter GFP-Autofluoreszenz und indirekter IL2RG-Antikörper-Fluoreszenz widerspiegelt.

Der biologische Virustiter der Genfallen-Vektoren war wie erwartet ca. 5-fach geringer als der der SFFV-Vektoren, weil anders als die SFFV-Vektoren, die das Transgen unabhängig vom Integrationsort exprimieren, die Expression des Transgens in Genfallen-Vektoren von Integrationen in exprimierte Gene abhängig ist. Aus diesem Grund reflektiert der Genfallentiter nicht den biologischen Virustiter und sollte mit molekulargenetischen Methoden, wie in Abb. 4.11 dargestellt, überprüft werden.



**Abb. 4.11: Nachweis des Transgens in einer  $IL2RG^{-/-}$ -Zelllinie**

ED-7R-Zellen wurden mit Virusüberstand der beiden Konstrukte (SFFV-mIL2RG und GT-mIL2RG) transduziert und nach vier Tagen die Oberflächenexpression von murinem IL2RG (mIL2RG) per FACS (**A**) und nach Isolation genomischer DNA per PCR die provirale cDNA (**B**) nachgewiesen. In (**C**) ist die Lage der benutzten Primer innerhalb des SFFV-IL2RG (oben) und des GT-IL2RG (unten) dargestellt.

SSC: Seitwärtsstreulicht, ntd: nicht transduziert, PE: Phycoerythrin, WPRE: posttranskriptionales regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus, SA: Spleiß-Akzeptor, pA: Polyadenylierungssignal, LTR: *long terminal repeat*, SFFV: *spleen focus forming virus*

Die Zelllinie ED-7R wurde aus T-Zelleukämiezellen eines erwachsenen Patienten generiert und exprimiert endogen kein  $IL2RG$  [96]. Damit eignet sie sich als  $IL2RG^{-/-}$ -Zelllinie ideal als X-SCID-Gewebekulturmodell.

Vier Tage nach Transduktion der ED-7R-Zellen exprimierten 93 % der SFFV-IL2RG- und lediglich 1 % der GT-mIL2RG-transduzierten Zellen  $IL2RG$  an der Zelloberfläche (Abb. 4.11 A). Anders als SFFV-IL2RG-Zellen, war die  $IL2RG$ -Expression als Folge von Integrationen

in unterschiedlich stark exprimierte Gene in den GT-IL2RG-Zellen sehr heterogen (Abb. 4.11 A).

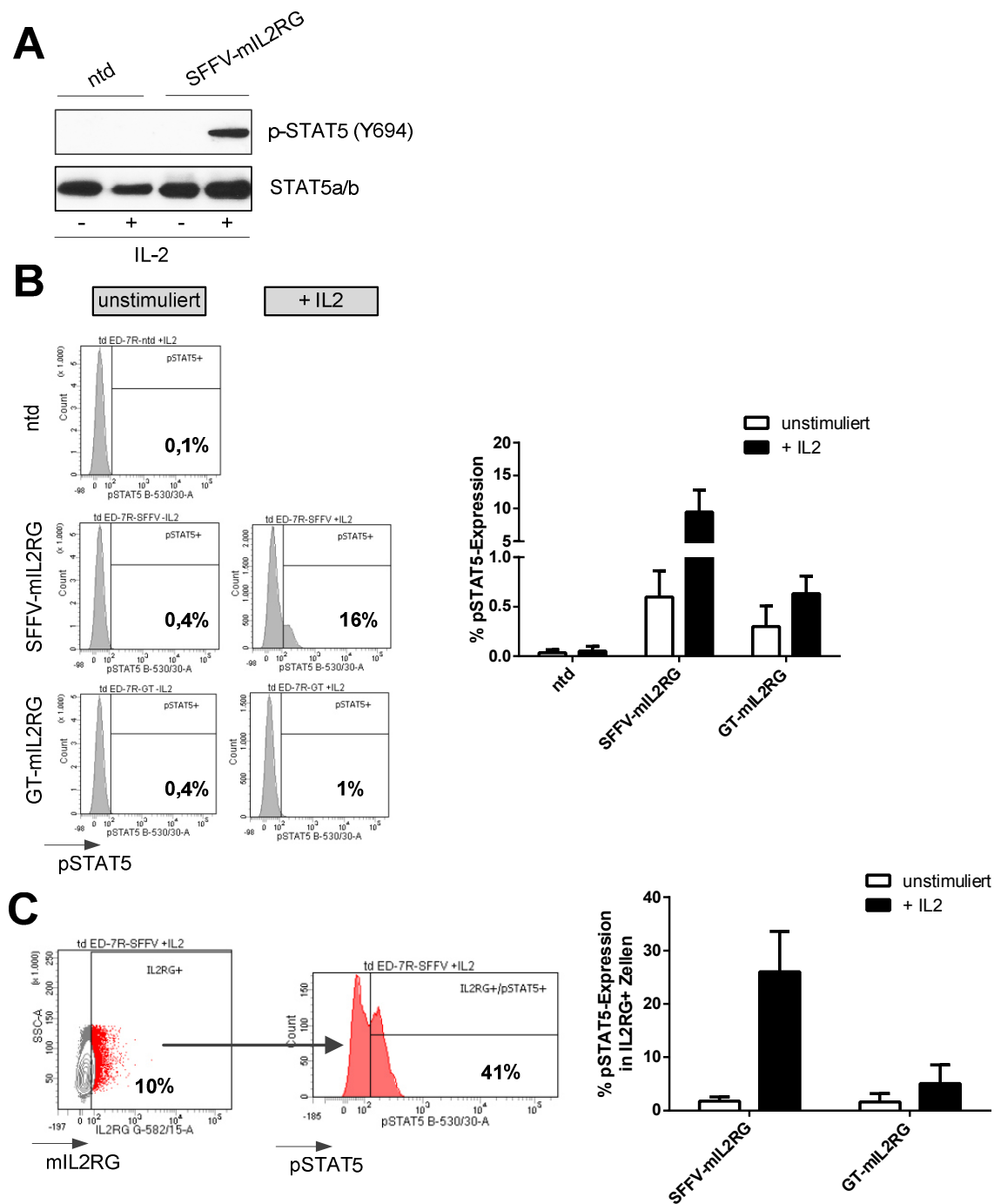
Mittels einer PCR auf genomische DNA, isoliert aus ED-7R-Zellen vier Tage nach Transduktion mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren (Abb. 4.11 C), konnte die provirale cDNA des *mIL2RGs* auch in den GT-IL2RG-Zellen nachgewiesen werden.

Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 (*signal transducer and activator of transcription*) und anschließende Dimerisierung der Untereinheiten STAT5a und STAT5b (vgl. Kapitel 1.2.3, Abb. 1.8) ist ein Schlüsselschritt in der  $\gamma$ c-Signaltransduktionskaskade, die von einer Reihe von Zytokinen beansprucht wird (vgl. Kapitel 1.2.3, Abb. 1.7) und ist deswegen ein zuverlässiger Parameter für ein intaktes  $\gamma$ c. Um eine Rekonstitution des IL2RG in ED-7R-Zellen durch die IL2RG-exprimierenden Vektoren zu beweisen, wurden die Zellen mit den einzelnen Vektoren transduziert und anschließend mit IL-2 stimuliert.

Während sich anders als in den ED-7R WT-Zellen in SFFV-mIL2RG transduzierten ED-7R-Zellen eine STAT5-Phosphorylierung auf Western Blots nachweisen ließ (Abb. 4.12 A), gelang dies nicht in vergleichbaren GT-mIL2RG transduzierten Zellen. Der mögliche Grund ist vermutlich die geringe Anzahl *IL2RG*<sup>+</sup>-Zellen und die insgesamt geringe *IL2RG*-Expression in GT-mIL2RG transduzierten Zellen (Abb. 4.11 A). Dennoch zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass zumindest in den SFFV-mIL2RG transduzierten Zellen eine funktionale  $\gamma$ c-Kette exprimiert wird. Um die möglicherweise geringen Mengen an pSTAT5 in GT-mIL2RG transduzierten ED-7R-Zellen nachweisen zu können, wurde die durchflusszytometrische Phosflow-Methode<sup>5</sup> benutzt. Hierbei wird pSTAT5 mit einem fluoreszenzkonjugiertem (Alexa Fluor-488) Antikörper nach Fixierung und Permeabilisierung selektiv angefärbt. Parallel können auch andere Oberflächenmarker, wie hier das *mIL2RG* gefärbt und anschließend per Durchflusszytometer analysiert werden (vgl. Kapitel 3.2.3).

---

<sup>5</sup> Phosflow der Firma BD Biosciences



**Abb. 4.12: Funktionalität des Transgens in einer IL2RG<sup>-/-</sup>-Zelllinie**

(A) Mit dem SFFV-mIL2RG-Konstrukt transduzierte und nicht transduzierte (ntd) ED-7R-Zellen wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach anschließender Gelelektrophorese und Western Blotting erfolgte die Detektion der Proteine pSTAT5 und STAT5a/b. Hier lässt sich nach Stimulation mit IL-2 ein klares Signal für pSTAT5 erkennen. (B) Repräsentative Histogramme der pSTAT5-Expression von unstimulierten und mit IL-2 stimulierten Proben von ntd, SFFV-mIL2RG und GT-mIL2RG innerhalb der Gesamtzellpopulation eines Experimentes (links). pSTAT5-Expression innerhalb der Gesamtzellpopulation aller Proben (C) Repräsentative FACS-Bilder der pSTAT5-Expression in der Population der IL2RG<sup>+</sup>-Zellen nach Stimulation mit IL-2 in der SFFV-mIL2RG Probe (links). (links) und die pSTAT5-Expression innerhalb der IL2RG<sup>+</sup>-Population der mit SFFV-

mIL2RG und GT-mIL2RG transduzierten ED-7R vor und nach der Stimulation mit IL-2 aus drei unabhängigen Experimenten (rechts).

(n=3, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes)

Wie exemplarisch für ein Experiment in Abb. 4.12 B links und für drei unabhängige Experimente in Abb. 4.12 B rechts zu sehen ist, konnte nach IL-2-Stimulation in 16 % der Gesamtpopulation der SFFV-mIL2RG transduzierten ED-7R-Zellen pSTAT5 detektiert werden, während in der unstimulierten Kontrolle kein pSTAT5 nachweisbar war. Im Gegensatz hierzu exprimierten nur 1 % der GT-mIL2RG transduzierten ED-7R-Zellen pSTAT5. Betrachtet man jedoch die pSTAT5-Expression isoliert in *IL2RG*<sup>+</sup>-Zellen (10 %) konnte in bis zu 41 % der SFFV-mIL2RG transduzierten Zellen pSTAT5 nachgewiesen werden (Abb. 4.12 C links). Fasst man die Ergebnisse aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten zusammen (Abb. 4.12 C rechts), lässt sich in ca. 25 % der SFFV-mIL2RG und ca. 5 % der GT-mIL2RG transduzierten Zellen phosphoryliertes STAT5 nachweisen. Diese Werte korrelieren sehr gut mit dem 5-fach niedrigeren Virustiter des Genfallen-Vektors. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Aktivierung des *IL2RG*-abhängigen Signalweges mit Genfallen-Vektoren zwar möglich ist, jedoch mit geringerer Effizienz.

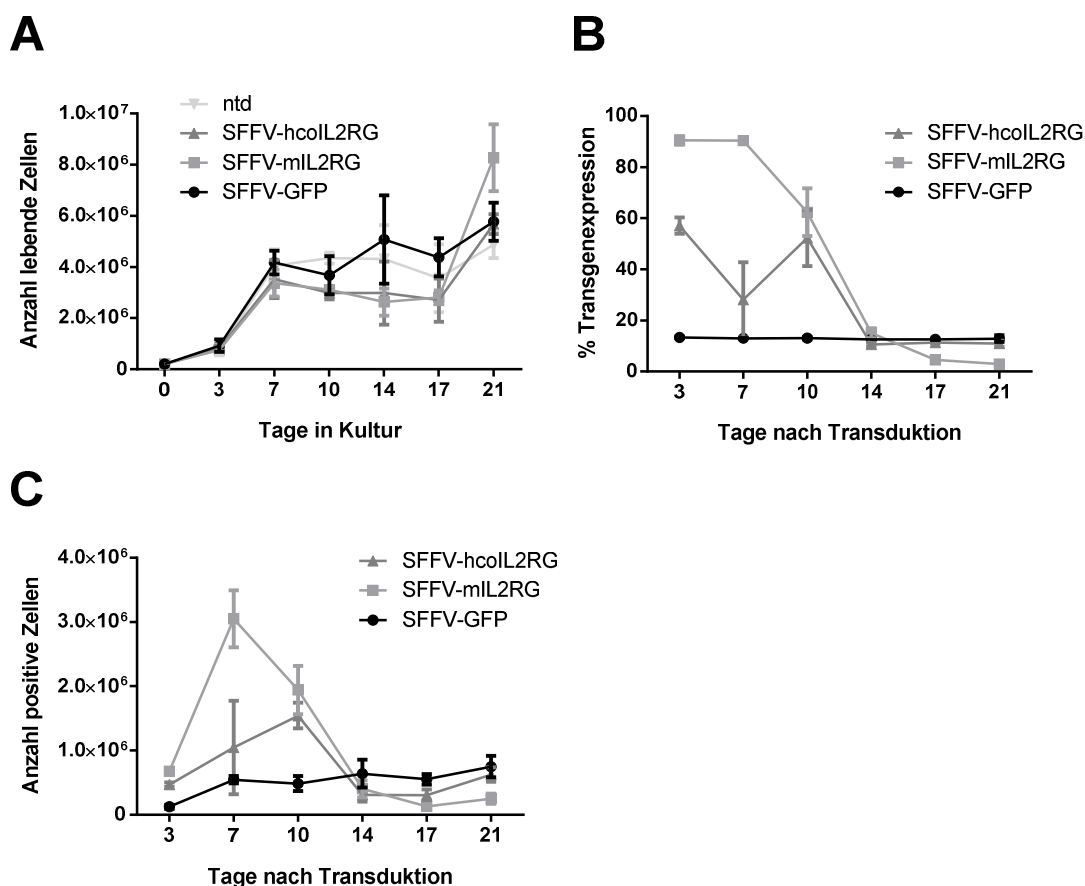
#### 4.1.5 Re-Expression von *IL2RG* in *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Zellen führt zu einem Wachstumsnachteil und Verlust der positiven Zellen

Die in Kapitel 4.1.4 beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass produktive Genfallen-Integrationen in ED-7R-Zellen stattfanden. Aufgrund ihrer geringen Effizienz bedarf es allerdings einer Selektion, um ausreichende Mengen an *IL2RG*<sup>+</sup>-Zellen zu erlangen. In mehreren Experimenten wurde versucht, *IL2RG*<sup>+</sup>-ED-7R Zellen mittels FACS zu sortieren und für weitere Analysen ähnlich wie die GT-gp91<sup>phox</sup> transduzierten Zellen zu expandieren (vgl. Abb. 4.5). Doch stellte sich heraus, dass eine Anreicherung der *IL2RG*<sup>+</sup>-Zellen, vermutlich wegen einer unerwarteten proliferationshemmenden Aktivität von *IL2RG*, nicht möglich war.

In einem Experiment, das in Abb. 4.13 dargestellt ist, wurde die Kinetik des Zellwachstums parallel zur *IL2RG*-Expression über einen längeren Zeitraum analysiert. Abb. 4.13 B und C zeigen, dass bereits mit der Positivkontrolle (SFFV-mIL2RG) sowohl die Transgenexpression als auch die Anzahl an positiven Zellen abnahm. Hingegen hatte die GFP-Expression in SFFV-GFP transduzierten ED-7R-Zellen weder auf Proliferation noch auf Transgenexpression einen wesentlichen Einfluss (Abb. 4.13 A, B und C).

Um auszuschließen, dass dies an einer möglichen Inkompatibilität zwischen murinem *IL2RG* und humanen Zielzellen liegt, wurden ED-7R-Zellen mit SFFV-hcoIL2RG transduziert und anschließend analysiert. Auch in diesem Ansatz kam es zu einer Reduktion der *IL2RG*-Expression (Abb. 4.13 B) und Anzahl der *IL2RG*<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 4.13 C), obwohl sich die

Gesamtzellzahl vervielfachte (Abb. 4.13 A). Dies kann als Indiz dafür gelten, dass die  $IL2RG^{+}$ -ED-7R-Zellen einen Wachstumsnachteil gegenüber den nicht transduzierten Zellen entwickeln. Deswegen war eine angestrebte Anreicherung von  $IL2RG$ -exprimierenden ED-7R-Zellen *in vitro* nicht möglich, worauf als Alternative die Möglichkeit einer *in vivo* Anreicherung im X-SCID-Mausmodell überprüft wurde (vgl. Kapitel 4.2).



**Abb. 4.13: Kinetik der mit Kontrollvektoren transduzierten ED-7R-Zellen unter Standardkulturbedingungen**

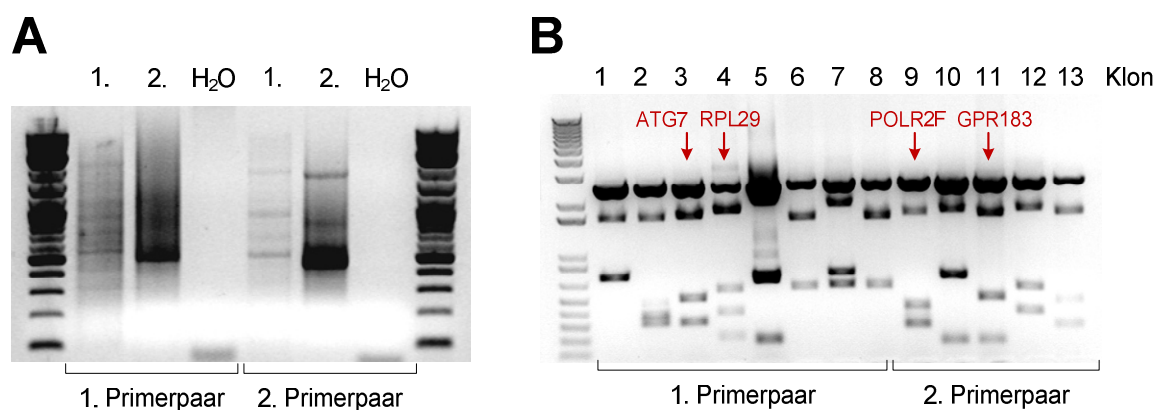
(A) Anzahl der vitalen ED-7R-Zellen der nicht transduzierten (ntd) Kontrolle sowie mit SFFV-mIL2RG, SFFV-hcoIL2RG und SFFV-GFP transduzierten Zellen ermittelt durch Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer. (B) Transgenexpression der Zellen ab Tag 3 nach Transduktion ermittelt durch Durchflusszytometrie. (C) Berechnete Anzahl positiver Zellen mit Hilfe der Gesamtzellzahl sowie der Transgenexpression zu den bestimmten Zeitpunkten.

(n=2, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

#### 4.1.6 Molekulargenetische Untersuchung von GT-mIL2RG Genfallen-Integrationen

Der Nachweis produktiver Genfallen-Integrationen erfolgte über 5' RACE-PCR (*rapid amplification of 5' cDNA ends*, RACE) - eine Methode mit der sich die am Integrationsort entstehenden Fusionstranskripte nachweisen lassen. Hierfür wurden PLB-985-Zellen mit GT-

mIL2RG transduziert und nach vier Tagen die Gesamt-RNA isoliert und mit dem *SMARTer RACE cDNA Amplification Kit*<sup>6</sup> amplifiziert (vgl. Kapitel 3.1.4). Erhaltene 5'RACE-Produkte wurden in den pGEM-T-Vektor kloniert und in *E. coli* transformiert („Shotgun cloning“). Anschließend wurden aus mehreren bakteriellen Klonen die Plasmide isoliert und deren Inserts nach PvuII-Kontrollverdau sequenziert (Abb. 4.14 B). Die *in silico* Analyse der erhaltenen Sequenzen (BLAT-Datenbank<sup>7</sup> der *University of California Santa Cruz* (UCSC) gegen das menschliche Genom) identifizierte in 6 von 22 Fusionstranskripte (Tab. 4.3). In den anderen Sequenzen konnte entweder keine Sequenz des Vektors gefunden werden oder die erhaltenen Sequenzen ließen sich nicht im menschlichen Genom finden.



**Abb. 4.14: Nachweis unterschiedlicher Integrationen von Genfallen-Vektoren in einer humanen Zelllinie durch eine 5'RACE**

PLB-985-Zellen wurden mit Virusüberstand des Konstruktes GT-mIL2RG transduziert, vier Tage nach Transduktion wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert, welche als Ausgangsmaterial für eine 5'RACE-PCR diente. (A) Die PCR-Produkte der 1. und 2. PCR-Reaktion auf einem Agarosegel. (B) Das PCR-Produkt der zweiten PCR wurde anschließend in pGEM-T kloniert und in *E. coli* transformiert. Nach blau-weiß-Selektion der bakteriellen Klone wurden die Plasmide mit PvuII kontrollverdaut und deren Inserts sequenziert. Die roten Pfeile zeigen Klone von vier Fusionstranskripten aus Tab. 4.3.

In 4 der 6 produktiven Genfallen-Integrationen befand sich der Vektor im 1. Intron, in den zwei anderen jeweils im 2. oder 8. Intron (Tab. 4.3). Außer der TOM1 Integration im 8. Intron wurden bei allen die *upstream* liegenden Exons an die Genfalle gespleißt, wobei es sich in 3 von 5 um nicht codierende Exons handelte (Tab. 4.3). Bei der NHP2 Integration konnte aufgrund der Sequenz keine Aussage getroffen werden, ob korrekt gespleißt wurde.

<sup>6</sup> Firma Takara/Clontech

<sup>7</sup> <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>

**Tab. 4.3: Getroffene Gene in humanen Zellen nach Transduktion mit dem Genfallen-Vektor GT-mIL2RG**

c: codierend, nc: nicht codierend, \*\*Anzahl der codierenden Aminosäuren im Exon *upstream* der Integration

Klon	Chromosom	ENSEMBL ID	Gen	Intron	c/nc	korrektes Spleißen
3	3	ENSG00000197548	ATG7	1	nc	ja
4	3	ENSG00000162244	RPL29	2	c (12)**	ja
9	22	ENSG00000100142	POLR2F	1	c (6)	ja
11	13	ENSG00000169508	GPR183	1	nc	ja
20	5	ENSG00000145912	NHP2	1	c (53)	?
21	22	ENSG00000100284	TOM1	8	-	ja

Da nur eine geringe Anzahl an Klonen analysiert wurde, lässt sich keine Aussage über die Effizienz treffen. Durch das Experiment konnte jedoch gezeigt werden, dass produktive Genfallenergebnisse stattfinden, die in der Expression des gewünschten Transgens resultieren könnten. Hierbei muss beachtet werden, dass es sich um eine Mischpopulation der transduzierten PLB-985-Zellen handelte, aus der zuvor nicht die positiven Zellen, d.h. die produktiven Integrationen selektiert wurden. Daher kann nicht gesagt werden, ob die nachgewiesenen Integrationen auch wirklich produktiv sind, da es sehr gut sein kann, dass die RNA zwar transkribiert, das Protein aber nicht translatiert wird. Um eine Selektion der produktiven Genfallenintegrationen zu erreichen, wurde eine *in vivo* Anreicherung im X-SCID-Mausmodell angestrebt.

## 4.2 Evaluierung von Genfallen-Vektoren *in vivo*

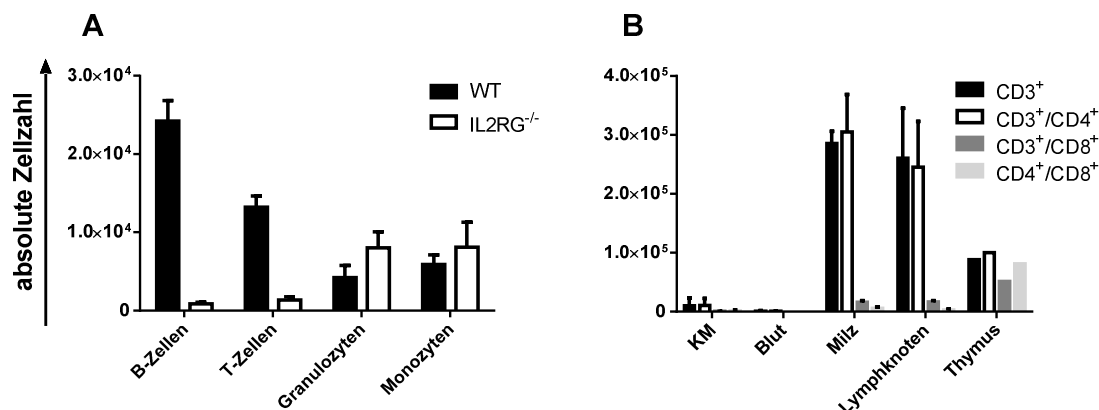
In den nachfolgenden Kapiteln wird die Performanz der GT-mIL2RG Genfalle in der immunologischen Rekonstitution von X-SCID-Mäusen (IL2RG<sup>-/-</sup>) im Vergleich zum SFFV-mIL2RG Kontrollvektor (vgl. Abb. 4.10) untersucht.

### 4.2.1 *Ex vivo* Gentherapie von IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäusen

Für die *in vivo* Transplantationsexperimente wurde ein IL2RG<sup>-/-</sup>-Mausmodell basierend auf dem C57BL/6-Hintergrund verwendet, in dem über homologe Rekombination Exon 3-8 des *IL2RG*-Gens durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt wurden. Dies führte durch den Verlust eines Großteils der extrazellulären und sämtlicher Transmembran- und zytoplasmatischer Domänen zu einem *IL2RG* Funktionsverlust. Homozygote Mäuse (IL2RG<sup>-/-</sup>) sind lebensfähig und fruchtbar, besitzen einen hypoplastischen Thymus mit einer 10-fach geringeren Lymphozytenzahl und weisen nur eine geringe Menge an reifen B- und T-Zellen in der Milz auf [93].



Es erfolgte zunächst eine Charakterisierung des  $IL2RG^{-/-}$  Phänotyps, wobei primär das periphere Blut und die hämolymphatischen Organe im Vordergrund standen.



**Abb. 4.15: Charakterisierung des Phänotyps der verwendeten  $IL2RG^{-/-}$ -Mäuse mittels Durchflusszytometrie**

(A) Absolute Zellzahl der verschiedenen Zelltypen (B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten und Monozyten) im Blut zweier *Knockout*-Mäuse ( $IL2RG^{-/-}$ ) im Vergleich zu zwei Wildtyp-Mäusen (WT). (B) Absolute Zellzahl verschiedener T-Zellsubpopulationen in unterschiedlichen Organen von zwei  $IL2RG^{-/-}$ -Mäusen.

(n=2, Mittelwert ± Standardabweichung)

Durch Kappen der Schwanzspitze wurde zwei Wildtyp- und zwei  $IL2RG^{-/-}$ -Mäusen Blut entnommen, nach Anfärben mit fluoreszenzmarkierten Zelltyp-spezifischen Oberflächen-Antikörpern (vgl. Abb. 1.1) durchflusszytometrisch analysiert.

B-Zellen wurden über das B220 Antigen, T-Zellen über den CD3 Oberflächenmarker charakterisiert. Granulozyten wurden über  $CD11b^+/Gr-1^+$ , Monozyten über  $CD11b^+$  identifiziert.  $IL2RG^{-/-}$ -Mäuse zeigten eine stark reduzierte Anzahl an B- und T-Zellen im peripheren Blut (PB), während sich die Anzahl an Granulozyten und Monozyten nicht wesentlich vom WT-PB unterschied (Abb. 4.15 A). Bei der Analyse von Organen aus  $IL2RG^{-/-}$ -Mäusen wurden erwartungsgemäß die meisten Lymphozyten in der Milz und in den Lymphknoten der Mäuse gefunden. Im Knochenmark (KM) und Blut konnte nur eine geringe Anzahl an T-Zellen detektiert werden. Ein wichtiger Punkt, der ebenso für die weiteren Versuche von Bedeutung sein wird, ist neben der erwartungsgemäßen Abwesenheit von  $CD3^+/CD8^+$ -T-Zellen das weitere Bestehen von  $CD3^+/CD4^+$ -T-Zellen. In der Literatur korreliert eine Zunahme der CD4-T-Zellen mit dem Alter der Mäuse [93]. Hiermit unterscheidet sich der Maus-Phänotyp vom humanen X-SCID Krankheitsbild, bei dem auch die CD4-T-Zellen fehlen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt drei 6-monatige Gentherapie-Experimente durchgeführt. Mit jedem Transplantationsexperiment kamen neue Erkenntnisse

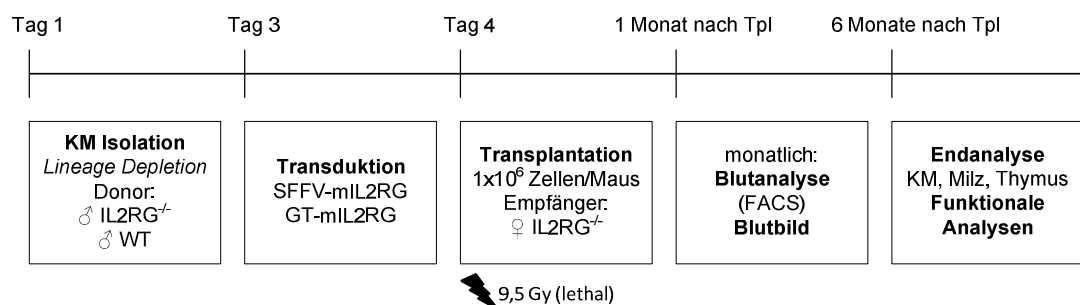
und Verbesserungsvorschläge auf, mit denen der *in vivo* Versuch im Laufe der Zeit durch Änderung bestimmter Parameter und Vorgehensweisen optimiert wurde (Tab. 4.4).

**Tab. 4.4: Charakteristika der drei Transplantationsexperimente**

Tpl: Transplantation, Gy: Gray, WT: Wildtyp, FACS: Durchflusszytometrie STAT5: *signal transducer and activator of transcription-5*, KM: Knochenmark, MACS: *magnetic activated cell sorting*

Experiment	Parameter und durchgeführte Analysen
Tpl. 1	Bestrahlung: sublethal (6 Gy)
	Kontrollen: WT-Mäuse, IL2RG <sup>-/-</sup> -Mäuse
	monatliche Analyse: - FACS-Färbung peripheres Blut
	Endanalyse (6 Monate): - Analyse von KM und Milz (FACS) - Isolation von T-Zellen aus der Milz per FACS (CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ) - pSTAT5 Expression nach Stimulation in T-Zellen
Tpl. 2	Bestrahlung: lethal (9,5 Gy)
	Kontrollen: WT-Mäuse, IL2RG <sup>-/-</sup> -Mäuse
	monatliche Analysen: - FACS-Färbung peripheres Blut - ab 3.Monat: Blutbild
	Endanalyse (6 Monate): - Analyse von KM und Milz (FACS) - Isolation von T-Zellen aus der Milz per MACS (Pan-T-Zellen) - Proliferations-Assay mit isolierten T-Zellen
Tpl. 3	Bestrahlung: lethal (9,5 Gy)
	Kontrollen: IL2RG <sup>-/-</sup> -Mäuse transplantiert mit WT-Zellen, IL2RG <sup>-/-</sup> -Mäuse
	monatliche Analysen: - FACS-Färbung peripheres Blut - Blutbild
	Endanalyse (6 Monate): - Analyse von KM und Milz (FACS) - Isolation von T-Zellen aus der Milz per MACS (Pan-T-Zellen) - Proliferations-Assay mit isolierten T-Zellen - pSTAT5 Expression nach Stimulation in T-Zellen - Integrationsanalyse

Durch die gewonnene Erfahrung konnte im dritten und letzten Versuch ein optimiertes Protokoll etabliert werden (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16: Schematischer Ablauf eines optimierten Transplantationsexperiments**

KM: Knochenmark, WT: Wildtyp, Gy: Gray, Tpl: Transplantation

Zunächst wurden Knochenmarkszellen aus Femur und Tibia von männlichen IL2RG<sup>-/-</sup>- oder C57BL/6-Wildtyp-Mäusen gewonnen und die Lin<sup>-</sup> Zellen durch negative Selektion über MACS-Säulen isoliert (vgl. Kapitel 3.2.1). Nach einer Zytokin-Cocktail (100 ng/ml mSCF, 100 ng/ml mFlt3L, 100 ng/ml hIL-11 und 20 ng/ml mIL-3) Prästimulation für 48 h in Serum-freien Medium [105] wurden die Lin<sup>-</sup>-Zellen mit SFFV-mIL2RG und GT-mIL2RG-Viren transduziert (MOI: 2,5, vgl. Kapitel 3.2.2). Am nächsten Tag wurden 1x10<sup>6</sup> transduzierte Lin<sup>-</sup>-Zellen in die Schwanzvene von lethal bestrahlten (9,5 Gy) weiblichen IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäuse injiziert. Ab der 4. Woche nach Transplantation erfolgten monatliche Blutuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie (Abb. 4.17) und Erstellung eines 4-fachen Differentialblutbildes<sup>8</sup> (Abb. 4.18).

<sup>8</sup> scil Vet abc Hämatologiegerät der Firma scil animal care company GmbH

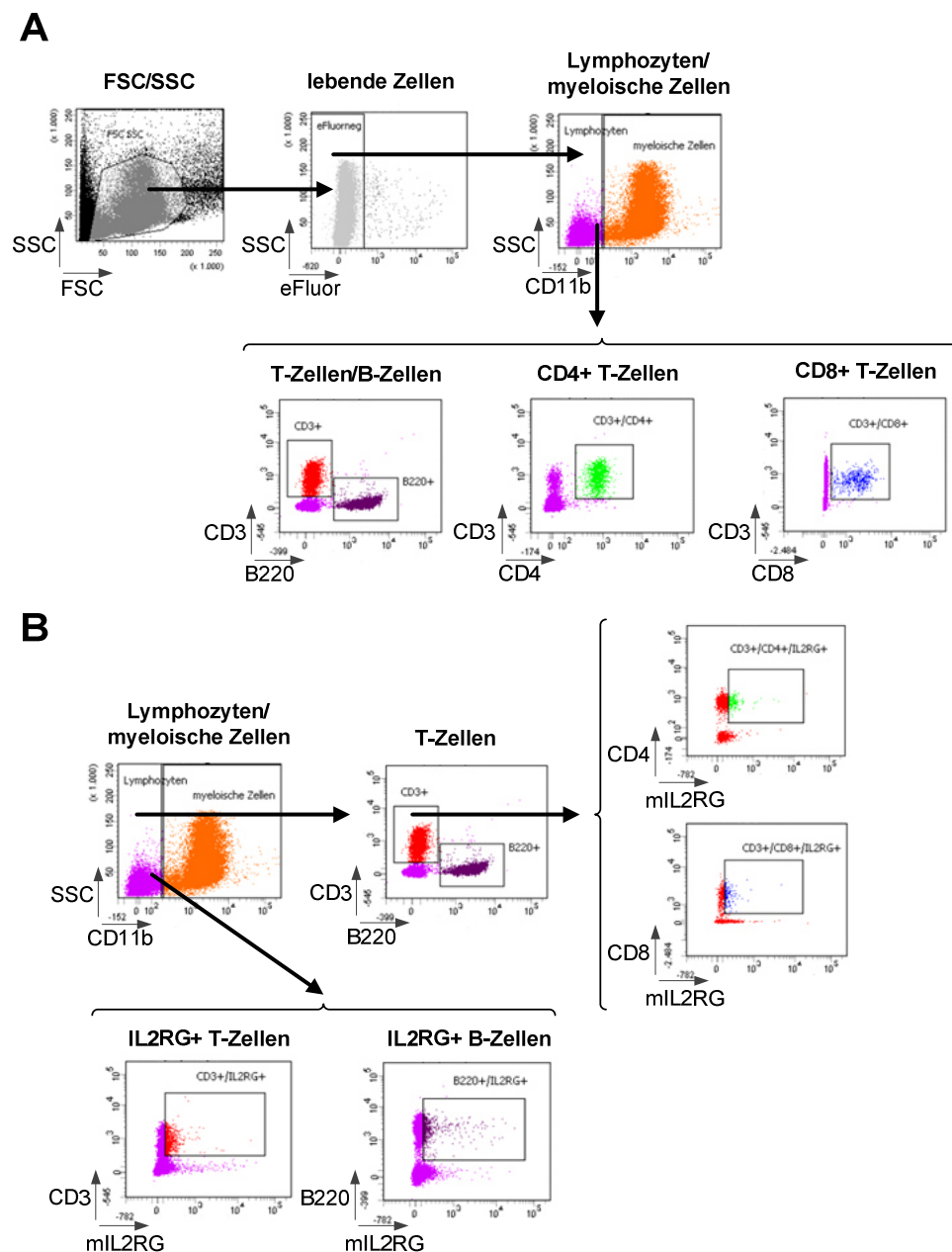


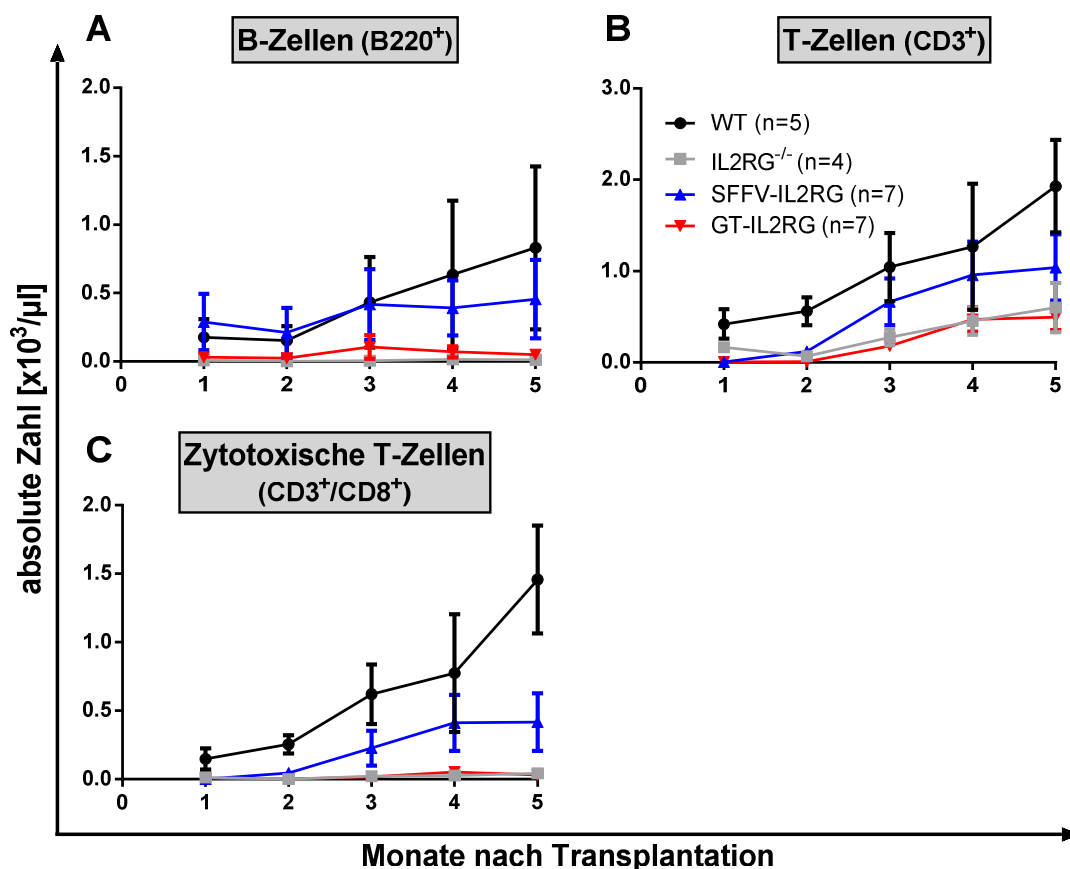
Abb. 4.17: Strategie zur Separation der einzelnen Zellpopulationen am Beispiel einer WT-Kontrollmaus

(A) Zuerst wurden die lebenden Zellen mit Hilfe eines Viabilitätsfarbstoffs unterschieden. Durch den myeloischen Oberflächenmarker CD11b konnten die Zellen in Lymphozyten (CD11b<sup>-</sup>) und myeloische Zellen (CD11b<sup>+</sup>) eingeteilt werden. Die Lymphozyten wurden weiter in T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) und B-Zellen (B220<sup>+</sup>) sowie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unterschieden. (B) Strategie zur Separation der IL2RG<sup>+</sup>-Zellpopulationen. Die Lymphozyten wurden aufgeteilt in IL2RG<sup>+</sup>-T-Zellen und IL2RG<sup>+</sup>-B-Zellen. Außerdem erfolgte die Untersuchung der IL2RG-Expression in der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Subpopulation.

SSC: Seitwärtsstreulicht, FSC: Vorwärtsstreulicht, eFluor: Viabilitätsfarbstoff

Im PB der mit Wildtyp (WT) oder SFFV-mIL2RG transduzierten Zellen transplantierte Mäuse konnte während des Experiments ein kontinuierlicher Anstieg an B-Zellen (B220<sup>+</sup>), T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) und zytotoxischen T-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) beobachtet werden. Die absolute

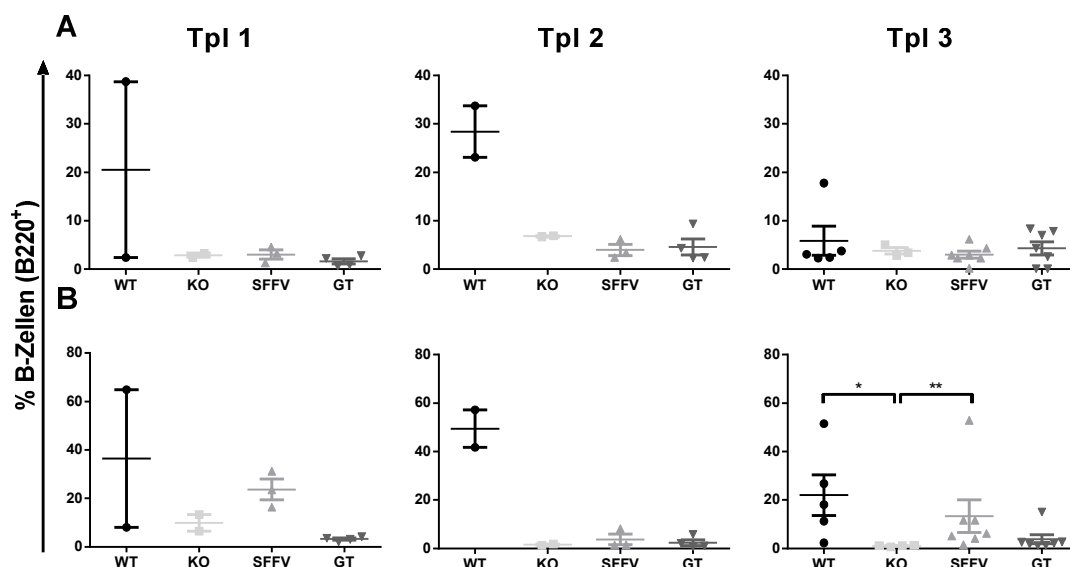
Zahl an B220<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>-Zellen und CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen in Blut von Mäusen, die mit GT-IL2RG transduzierten Zellen transplantiert wurden, zeigten hingegen keinen Unterschied im Vergleich zur unbestrahlten IL2RG<sup>-/-</sup>-Kontrollgruppe (Abb. 4.18).



**Abb. 4.18: Rekonstitution der B- und T-Lymphozyten im peripheren Blut**

IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit Lin<sup>-</sup>-Zellen aus Wildtypmäusen- oder mit transduzierten Lin<sup>-</sup>-Zellen aus IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäusen transplantiert. Prozentwerte und absolute Zellzahlen im peripheren Blut der behandelten Mäuse wurden monatlich mittels FACS und einem Blutbildmessgerät bestimmt. Absolute Zahlen von (A) B220<sup>+</sup>-B-Zellen, (B) CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und (C) CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, im peripheren Blut der einzelnen Versuchstiergruppen. Als Negativkontrolle dienten unbestrahlte nicht transplantierte IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäuse (graue Linie). (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes)

Sechs Monate nach Transplantation wurden die Tiere geopfert und zusätzlich zum PB, deren KM und Milz durchflusszytometrisch untersucht.

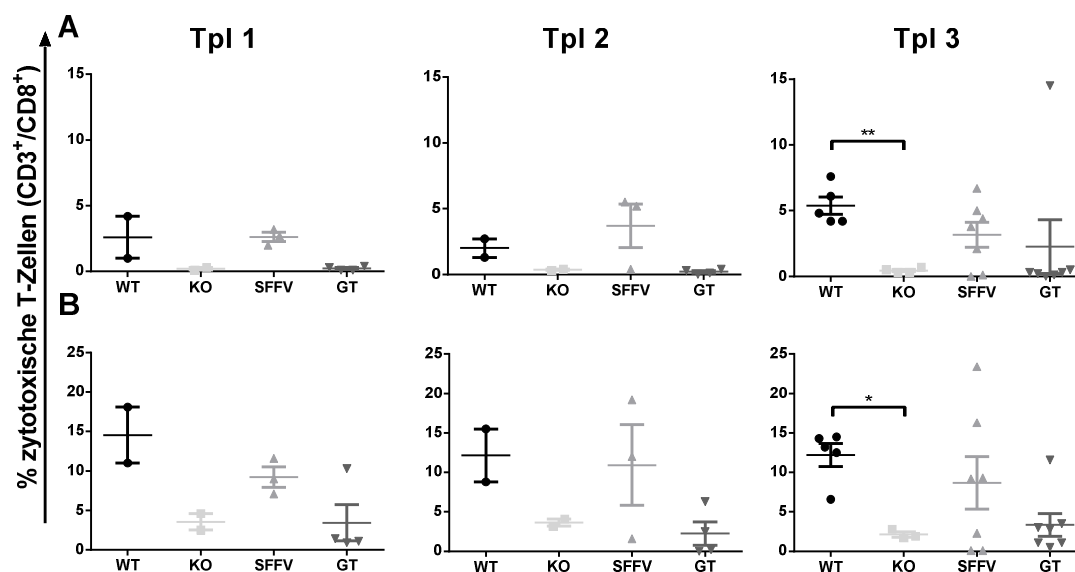


**Abb. 4.19: B-Zellen in Knochenmark und Milz nach Genthherapie**

Prozentwerte von B220<sup>+</sup>-Zellen in (A) KM und (B) Milz von Versuchstieren der drei unabhängigen Experimenten. Die Mäuse wurden transplantiert mit  $1 \times 10^6$  IL2RG<sup>-/-</sup>Lin<sup>-</sup>-Zellen transduziert mit Virusüberstand der SFFV-IL2RG- und GT-IL2RG-Konstrukten. Bei Tpl.1 und Tpl.2 dienen gleichaltrige WT-Mäuse als Kontrolle, während bei Tpl.3 IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäuse transplantiert mit Wildtyp-Zellen als Positivkontrolle dienten. Als Negativkontrolle wurden unbestrahlte nicht transplantierte IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet (KO).

(Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Mann-Whitney)

Grundsätzlich wurde beobachtet, dass bei unbehandelten Wildtyp-Mäusen (Tpl. 1 und Tpl. 2), große Schwankungen in der Ausbeute an B-Zellen aus KM und Milz auftraten (Abb. 4.19). Daher wurde im letzten Experiment (Tpl. 3) eine optimale Kontrolle in Form von bestrahlten IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäusen transplantiert mit Wildtyp-Zellen einbezogen. Im Knochenmark der Mäuse, die mit transduzierten Zellen (SFFV und GT) transplantiert wurden, war der Prozentsatz von B220<sup>+</sup>-Zellen vergleichbar mit der Negativkontrolle (KO) (Abb. 4.19 A). In der Milz hingegen, konnte eine signifikant höhere Anzahl an B-Zellen in den WT- und SFFV-Gruppen gegenüber der KO-Mäuse festgestellt werden (Abb. 4.19 B). Da die Größe der Versuchsgruppen im ersten und zweiten Transplantationsversuch noch nicht umfangreich genug waren ( $n = 2-4$ ), wurden statistische Signifikanzberechnungen nur im dritten und letzten Versuch ( $n = 5-7$ ) durchgeführt.



**Abb. 4.20: Zytotoxische T-Zellen in Knochenmark und Milz nach Gentherapie**

Prozentwerte von  $CD3^+/CD8^+$ -Zellen in (A) KM und (B) Milz von Versuchstieren der drei unabhängigen Experimente. Die Mäuse wurden mit  $1 \times 10^6$  transduzierten (SFFV-mIL2RG und GT-mIL2RG)  $IL2RG^{-/-}Lin^{-}$ -Zellen transplantiert. Als Negativkontrolle dienten unbestrahlte nicht transplantierte  $IL2RG^{-/-}$ -Mäuse (KO).

(Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Mann-Whitney)

Da durch eigene Erfahrungen im Umgang mit diesem Mausmodell sowie aus Beschreibungen in der Literatur bekannt ist, dass die  $IL2RG^{-/-}$ -Mäuse, besonders im hohen Alter,  $CD3^+/CD4^+$ -Zellen aufweisen, fokussierte sich die Analyse des T-Zellkompartimentes auf die  $CD3^+/CD8^+$ -Zellen (Abb. 4.20). Abb. 4.20 zeigt erhöhte  $CD3^+/CD8^+$ -Werte in KM und Milz der WT-Gruppen sowie der mit SFFV-mIL2RG transduzierten Gruppe. In der GT-Gruppe gab es in jedem der Experimente jeweils eine Maus mit deutlich erhöhten  $CD8^+$ -T-Zellen in der Milz. Im letzten Experiment konnte ein signifikant höherer Prozentsatz an  $CD3^+/CD8^+$ -Zellen in KM und Milz von WT-KM transplantierten versus nicht-transplantierten KO-Mäusen ermittelt werden. Innerhalb der SFFV-Gruppe sind größere Schwankungen zu beobachten, die bei *in vivo* Versuchen normal sind und deren Standardabweichungen durch eine größere Anzahl an Versuchstieren innerhalb einer Gruppe sowie durch mehrmals reproduzierte Experimente reduziert werden können.

Obwohl keine Angaben zur direkten  $IL2RG$ -Expression in gentherapierten Mäusen aus der Literatur bekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die  $IL2RG$ -Expression mit dem anti-CD132 ( $IL2RG$ ) Antikörper überprüft.

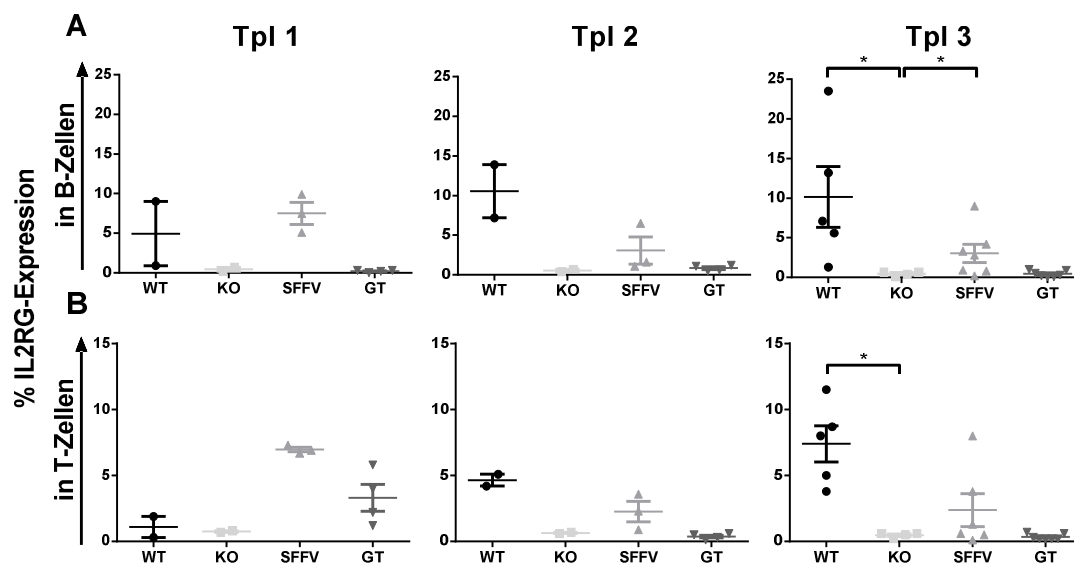


Abb. 4.21: IL2RG-Expression in B- und T-Zellen in der Milz

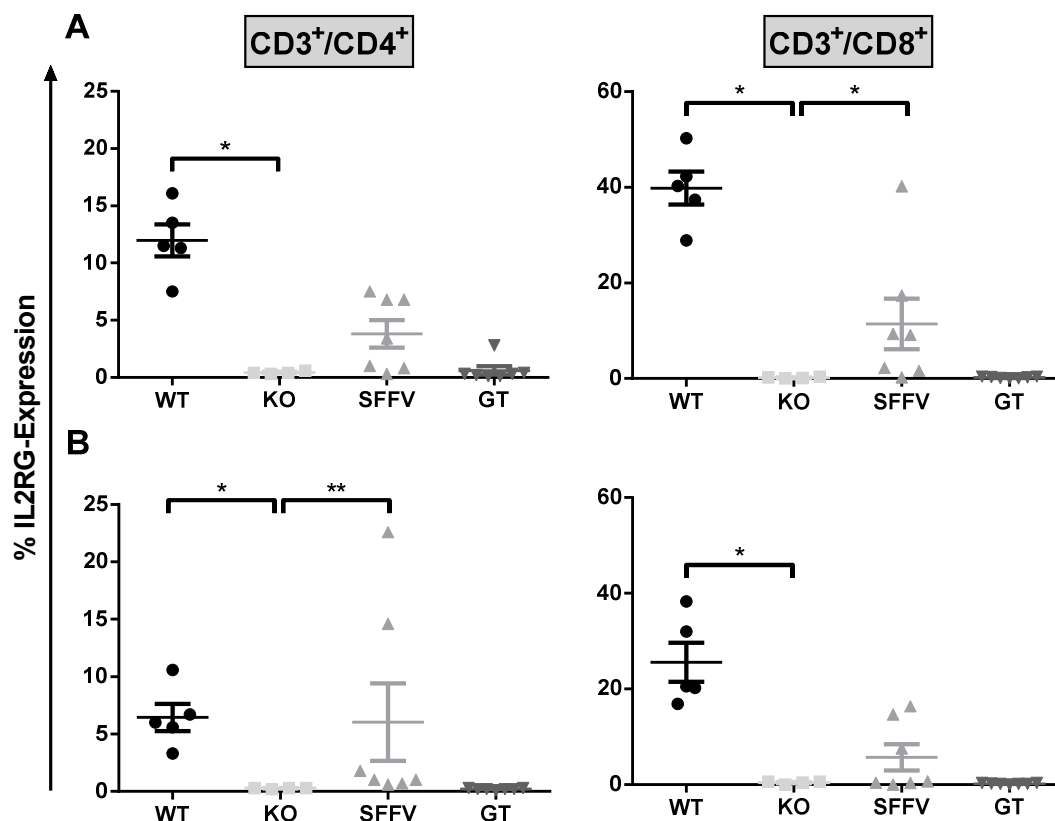
Prozentwerte von IL2RG<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der B-Zellpopulation (A) und T-Zellpopulation (B) in der Milz von Versuchstieren der drei unabhängigen Experimenten.

(Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes \* $p < 0,05$ , Mann-Whitney)

Innerhalb der B- und T-Zellpopulation in der Milz, charakterisiert durch B220<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>-Zellen, konnte in allen Experimenten eine Tendenz zur erhöhten *IL2RG*-Expression in den Wildtyp- und SFFV-Gruppen erkannt werden.

Im dritten Versuch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der WT- und der SFFV-Gruppe im Vergleich zur IL2RG<sup>-/-</sup>-Gruppe für die Population der B-Zellen sowie ein signifikanter Unterschied zwischen der WT-Gruppe im Vergleich zur KO-Gruppe für die CD3<sup>+</sup>-T-Zellen gezeigt werden. Für die GT-Gruppe konnte nur im ersten Experiment eine erhöhte Anzahl an CD3<sup>+</sup>/IL2RG<sup>+</sup>-Zellen in der Milz im Vergleich zur Negativkontrolle erzielt werden. In den anderen Experimenten unterscheidet sich die GT-Gruppe nicht von der unbehandelten KO-Gruppe (Abb. 4.21).



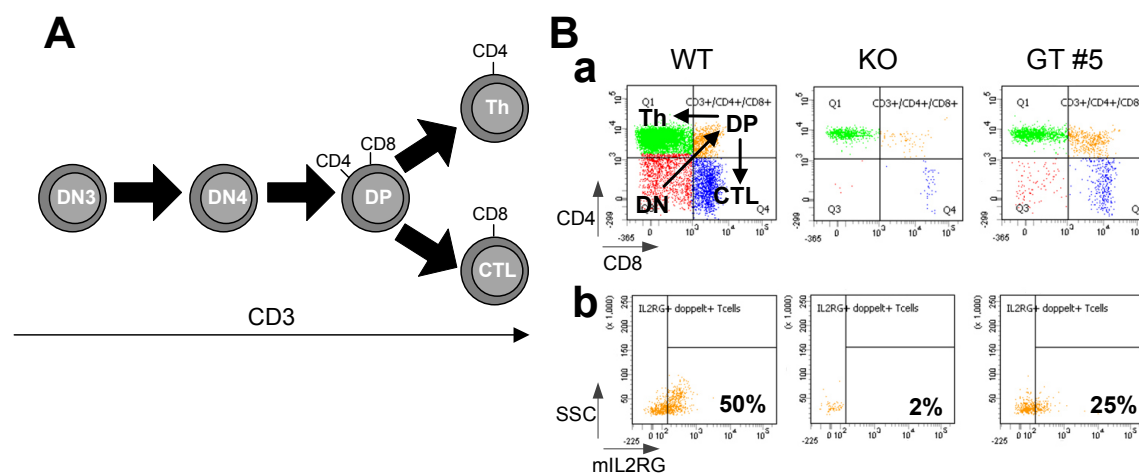


**Abb. 4.22: IL2RG-Expression in den T-Zellsubpopulationen in Knochenmark und Milz**  
 Prozentwerte von IL2RG<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation (links) und CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulation (rechts) im KM (**A**) und der Milz (**B**) von Versuchstieren des dritten Transplantationsexperiments.  
 (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes \*p<0,05, \*\*p<0,01)

Innerhalb der beiden T-Zellsubpopulationen ist die *IL2RG*-Expression im Vergleich zur KO-Kontrolle in KM und Milz der mit WT-KM transplantierten Mäuse signifikant erhöht. Darüber hinaus ist der Prozentsatz an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/IL2RG<sup>+</sup>-Zellen in Milz und der Prozentsatz an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/IL2RG<sup>+</sup>-Zellen im KM der SFFV-Gruppe im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht. In der GT-Gruppe allerdings konnte keine *IL2RG*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.22).

### Wiederherstellung der IL2RG-Expression während der T-Zellentwicklung im Thymus

Eine T-Zelle durchläuft während der Reifung im Thymus verschiedene Differenzierungsstufen, die mit der Expression bestimmter Oberflächenmarker einhergehen (vgl. Abb. 1.6). Mit Hilfe einer Färbung auf die Oberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD8 konnten die jeweiligen Stadien im Thymus der transplantierten Mäuse nachvollzogen werden (Abb. 4.23).



**Abb. 4.23: T-Zellentwicklung im Thymus transplanteder Mäuse**

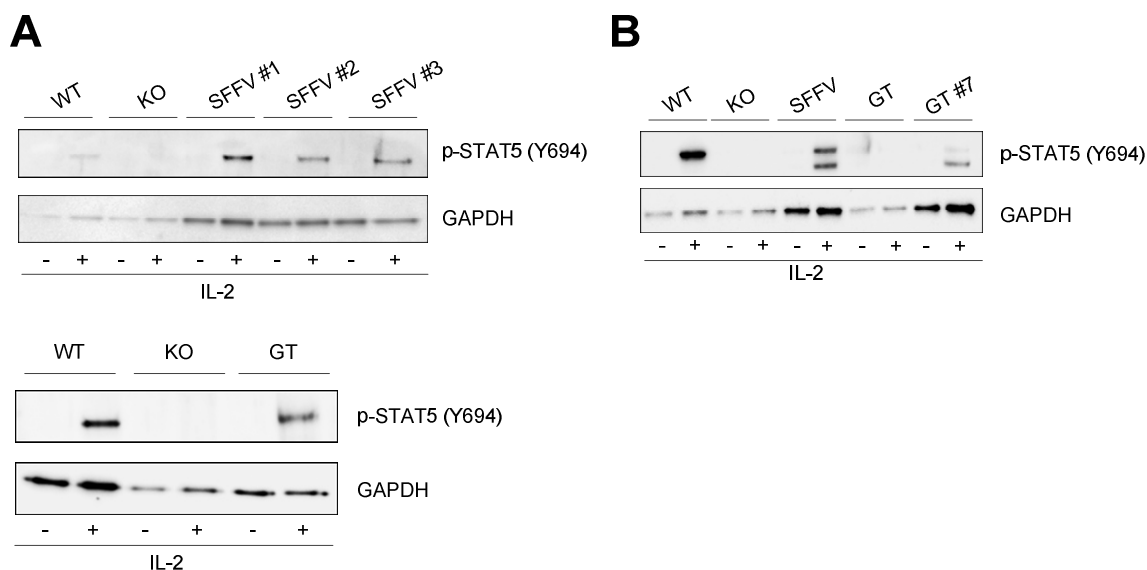
(A) Schematischer Ablauf der T-Zellentwicklung im Thymus und Expressionsprofil der T-Zelloberflächenmarker. CD3 wird ab dem Stadium DN3 exprimiert. Nach DN4 folgt das DP-Stadium, in dem die T-Zelle zunächst beide Oberflächenmarker (CD4 und CD8) exprimiert. Anschließend differenzieren die T-Zellen entweder in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th) oder in CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (CTL). (B) Repräsentative FACS-Bilder vom Thymus einer WT-, einer KO- und einer GT-Maus. In a) ist die charakteristische CD4/CD8-Färbung der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen gezeigt. b) IL2RG-Expression in den CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen. (n=1)

CD: cluster of differentiation, DN: doppelt negativ, DP: doppelt positiv, Th: T-Helferzelle, CTL: zytotoxische T-Zelle, WT: Wildtyp, KO: *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Maus, GT: Genfalle, SSC: Seitwärtsstreulicht, mIL2RG: murines IL2RG

Wie in Abb. 4.23 B b) zu sehen ist, konnten im isolierten Thymus einer GT-Maus CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, die zu 25 % *IL2RG*<sup>+</sup> waren. Im Gegensatz dazu, konnte, wie erwartet, keine *IL2RG*-Expression im doppelt positiven CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Stadium in der KO Kontrollmaus nachgewiesen werden. Diese Ausnahme liegt möglicherweise darin begründet, dass es durch eine nicht manifeste Infektion zu einer Amplifikation des T-Zell-Kompartiments und damit auch zu einer Expansion von GT-mIL2RG transduzierten Zellen kam.

### Wiederherstellung des intrazellulären IL-2-vermittelten Signalweges in *IL2RG*-rekonstituierten X-SCID T-Lymphozyten

Um nachzuweisen, dass in den transplantierten *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Mäusen durch die Genterapie der intrazelluläre IL-2-vermittelte Signalweg wiederhergestellt wurde und somit von einer Rekonstitution von funktionalen T-Lymphozyten auszugehen ist, wurden mit aus der Milz transplanteder Mäuse isolierten T-Zellen funktionale Tests in Gewebekultur durchgeführt. Zum einen erfolgte die Detektion von pSTAT5 nach Stimulation mit IL-2 mittels Western Blot (Abb. 4.24) und zum anderen wurde die Zellproliferation bzw. -viabilität nach Stimulation mit Zytokinen mit Hilfe der biolumineszenten Detektion der ATP-Level in den Zellen bestimmt (Abb. 4.25).



**Abb. 4.24: Detektion von pSTAT5 nach Stimulation mit IL-2 in T-Lymphozyten**

Western Blot mit Antikörpern gegen pSTAT5 und GAPDH nach Stimulation der isolierten T-Zellen aus den Versuchstieren des ersten (**A**) und des dritten (**B**) Transplantationsexperimentes. Ist keine Nummerierung angegeben, wurden die Zellen der Mäuse als Pool analysiert.

WT: Wildtyp, KO: IL2RG<sup>-/-</sup>-Maus, pSTAT5: phosphoryliertes STAT5, Y694: Tyrosin an Position 694, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GT: Genfalle, IL-2: Interleukin-2.

Nach Stimulation mit IL-2 konnte in allen Wildtyp-Kontrollzellen (WT) jedoch nicht in KO-Zellen pSTAT5 nachgewiesen werden (Abb. 4.24). In FACS sortierten CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus SFFV-Mäusen (#1 bis #3) sowie in einem T-Zell-Pool aus GT-Mäusen (n=4) konnte nach IL-2-Stimulation pSTAT5 im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 4.24 A).

In MACS sortierten T-Zellen aus einem zweiten Experiment, konnte sowohl im Pool der SFFV-Mäuse (n=7) als auch bei einer einzelnen Maus (#7) der GT-Gruppe ein Signal für pSTAT5 detektiert werden. Die im Pool analysierten Milzen der GT-Gruppe aus dem zweiten Experiment hingegen zeigten keine Rekonstitution des Signalweges nach Stimulation mit IL-2 (Abb. 4.24 B).

Um die *in vitro* Funktionalität der isolierten T-Lymphozyten aus den transplantierten Mäusen zu demonstrieren wurde ein Testsystem benutzt, das die Proliferation der Zellen basierend auf deren ATP-Gehalt misst. Dabei wird Luziferin und ATP in einer chemischen Reaktion durch das Enzym Luziferase in Licht umgewandelt und freigesetzt, was dann als Lumineszenz in einem Plattenleser detektiert werden kann<sup>9</sup>. Die Intensität der emittierten Lumineszenz wird in einem Luminometer gemessen und als relative Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) ausgegeben. Die T-Zellen wurden aus den Milzen der Versuchstiere mit Hilfe von MACS-*Beads* isoliert und drei Tage entweder mit (i) Standardmedium

<sup>9</sup> ViaLight plus Kit der Firma Lonza

(unstimuliert), (ii) Antikörpern ( $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28, AK) oder (iii) Antikörpern und IL-2 (AK+IL-2) inkubiert und anschließend mit Hilfe des ViaLight plus Kits analysiert.

Bei den sehr sensitiven Versuchen, in welchen Lumineszenz detektiert wird, treten häufig Schwankungen innerhalb des Experiments auf, was durch den großen Unterschied zwischen den gemessenen RLUs der jeweiligen unstimulierten Kontrollen deutlich wird (Abb. 4.25 A, schwarze Balken). Deswegen werden die Messergebnisse häufig als Stimulationsindex dargestellt, der das Verhältnis zwischen den RLUs von stimulierten zu unstimulierten Zellen einer Versuchsgruppe beschreibt.

Abb. 4.25 B zeigt, dass die T-Zellen aus den WT- und SFFV-Gruppen signifikant stärker nach AK und IL-2 Stimulation proliferierten als die T-Zellen der KO-Gruppe.

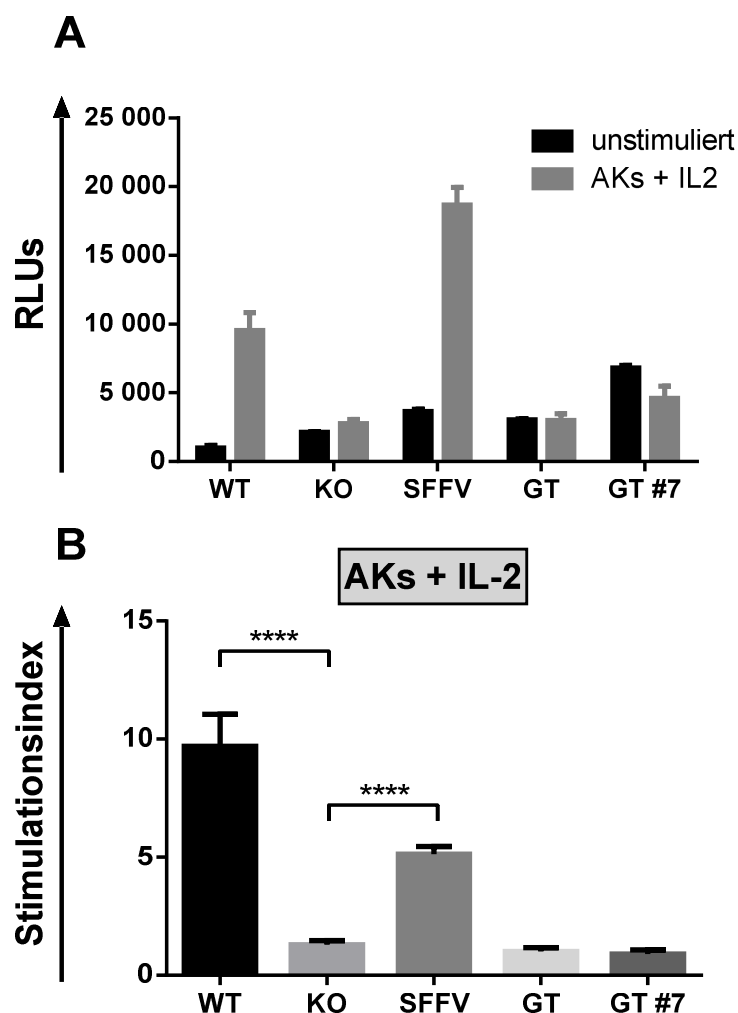


Abb. 4.25: In vitro Funktionalität der rekonstituierten T-Lymphozyten

(A) Dargestellt sind die in einem Luminometer gemessenen RLUs nach drei Tagen von unstimulierten und mit Antikörpern und IL-2 (AKs+IL-2) stimulierten T-Zellen aus WT-Mäusen, IL2RG<sup>-/-</sup>-Mäusen (KO) und den GT-IL2RG bzw. SFFV-IL2RG transplantierten Mäusen des dritten Transplantationsexperiments. (B) Der berechnete Stimulationsindex (Verhältnis der gemessenen

RLUs von stimulierten zu unstimulierten Zellen) der T-Zellen stimuliert mit AKs+IL-2. Die T-Zellen der Mäuse in den einzelnen Gruppen wurden zusammengefasst (WT: n=2, KO: n=2, SFFV: n=4 und GT: n=4) und nur eine Maus konnte einzeln gemessen werden (GT #7).

(Mittelwerte aus Triplikaten  $\pm$ Standardabweichung \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA)

### Bestimmung des *Engraftments* im Knochenmark der transplantierten Mäuse

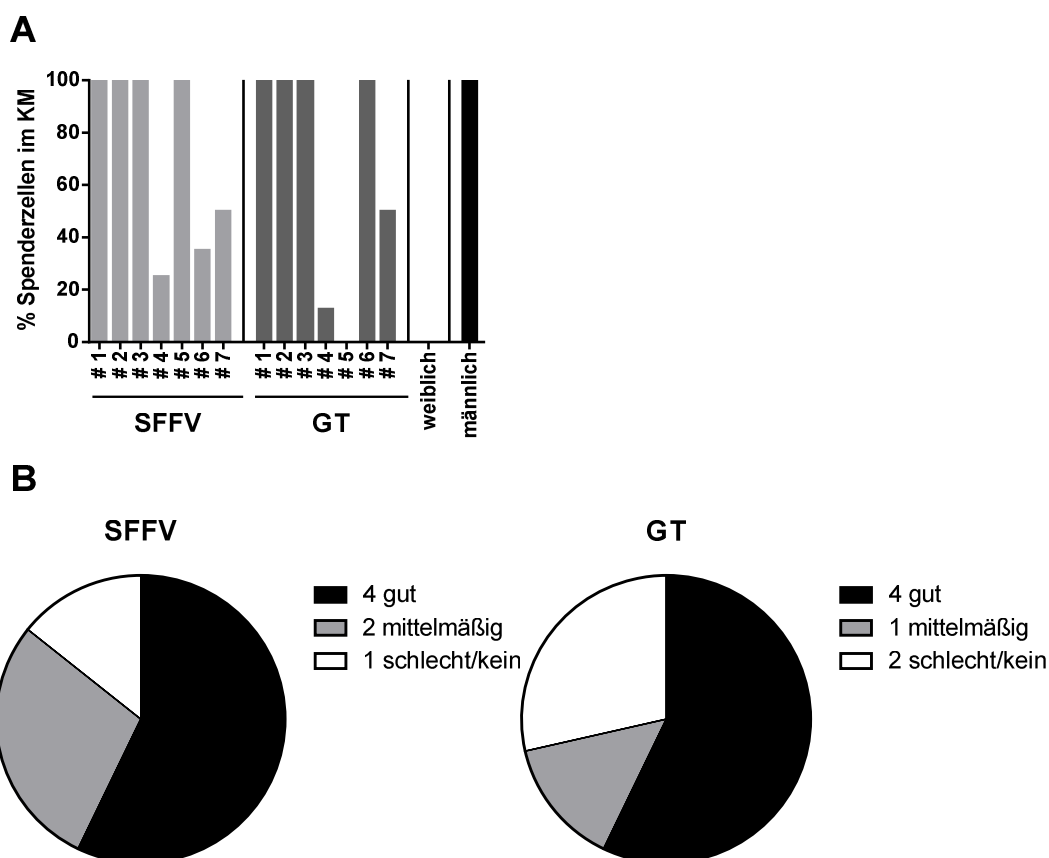
Die Beurteilung des *Engraftments*, das heißt den Prozentsatz an transduzierten Spenderzellen im Knochenmark des Empfängers, konnte hier aufgrund der Tatsache, dass männliche Spenderzellen in weibliche Empfänger transplantiert wurden, mit Hilfe der Y-chromosomalen SRY Region (*sex determining region on Y-chromosome*, SRY) bestimmt werden. Mit Hilfe einer qPCR gegen das SRY-Gen konnte der Chimärismus im KM der weiblichen Empfängermäuse ermittelt werden. Nach Isolation der DNA aus dem Gesamt-KM der transplantierten Mäuse aus dem dritten Transplantationsexperiment wurde eine Duplex-qPCR durchgeführt und die  $C_t$ -Werte jeder einzelnen Probe bestimmt. Dieser Wert entspricht dem Zyklus der PCR-Reaktion an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal den reaktionsspezifischen *Threshold* übersteigt. Die Mittelwerte jedes Triplikates wurden unter Anwendung der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode [118] zum murinen  $\beta$ -Aktin als Haushaltsgen ins Verhältnis gesetzt, um den Prozentsatz an männlichen Spenderzellen im KM der weiblichen Empfänger zu bestimmen. Als Kontrolle dienten männliche bzw. weibliche DNA aus nicht-transplantierten KO-Kontrollmäusen (Abb. 4.26 A). Konventionsgemäß wird das *Engraftment* in folgende drei Gruppen unterteilt:

**Tab. 4.5: Einteilung des *Engraftments* im Knochenmark der Mäuse**

Je nachdem wie viel Prozent an Spenderzellen im KM der Empfängermäuse zu finden war, wurde das *Engraftment* in drei Gruppen eingeteilt.

Spenderzellen im Empfänger-KM [%]	<i>Engraftment</i>
100 – 60	gut
60 – 30	mittelmäßig
< 30	schlecht/kein

Aufgrund dieser Unterteilung waren keine großen *Engraftment*-Unterschiede zwischen den SFFV- und GT-Gruppen zu erkennen (Abb. 4.26). Es gab in beiden Versuchsgruppen 4 Tiere, die ein gutes und 1-2 Tiere, die ein mittelmäßig bis schlechtes *Engraftment* zeigten. In der GT-Gruppe gab es zusätzlich eine Maus (#5), die kein *Engraftment* der transplantierten Zellen aufwies. Insgesamt kann festgehalten werden, dass die niedrigere *IL2RG*-Rekonstitutionseffizienz durch die Genfalle nicht auf einem suboptimalen *Engraftment* sondern auf der zu geringen Anzahl an produktiven Genfallenergebnissen in den transduzierten Zellen beruht.



**Abb. 4.26: Chimärismus im KM der transplantierten Mäuse aus dem dritten Transplantationsexperiment**

(A) Prozentwerte der Spenderzellen (männlich) im Gesamt-KM der sieben Empfängermause (weiblich) in den zwei Versuchsgruppen (SFFV und GT). Als Kontrolle diente KM einer nicht-transplantierten männlichen (Positivkontrolle) und einer nicht-transplantierten weiblichen KO-Maus (Negativkontrolle). (B) Verteilung des *Engraftments* unter den Versuchstieren unterschieden in gutes, mittelmäßiges und schlechtes/kein *Engraftment* der beiden Versuchsgruppen.

## 5 Diskussion

In klinischen Gentherapiestudien für primäre Immundefekte wurden hauptsächlich zwei Problematiken beobachtet: (i) Es kam zu einer vektorvermittelten Insertionsmutagenese und (ii) im Fall der Gentherapie von X-CGD nur zu einem transienten Behandlungserfolg durch den Verlust der Transgenexpression. Beide Probleme wurden mit der Entwicklung neuartiger Vektoren adressiert. Diese besitzen zum einen eine SIN-Konfiguration, welche schon eine deutlich sicherere Alternative darstellt, da dadurch eine Transaktivierung von benachbarten Onkogenen vermieden wird. Zum anderen wurden unterschiedliche Promotorelemente, wie z. B. das A2UCOE-Element (*ubiquitous chromatin opening element*, UCOE) eingesetzt, um eine stabilere Genexpression zu ermöglichen und den Expressionsverlust viraler Promotoren durch *Silencing* zu umgehen [119–121]. Die in dieser Arbeit getesteten Genfallen-Vektoren basieren ebenfalls auf SIN-Vektoren, besitzen jedoch keinen internen Promotor. Die Transgenexpression ist somit abhängig von einem endogenen Promotor an der Insertionsstelle. Dadurch soll eine robustere Transgenexpression erreicht und darüber hinaus die Insertionsmutagenese gemieden werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente werden auf den folgenden Seiten kritisch betrachtet, diskutiert und in den Kontext der aktuellen Literatur gestellt.

### 5.1 Das Effizienzproblem von Genfallen-Vektoren

Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass Genfallen-Vektoren im Vergleich zu Promotor-getriebenen Vektoren, eine geringere Effizienz aufweisen. Dies wurde erstmals in Vorversuchen mit gp91<sup>phox</sup> als Transgen deutlich. Es konnte nur nach mehrmaligem Sortieren eine vergleichbare Anzahl an gp91<sup>phox</sup>-positiven Granulozyten erzielt werden, die dann zwar ihrer funktionalen Aufgabe reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zu produzieren nachkommen konnten, dabei aber nur die Hälfte der Funktionalität der Positivkontrolle mit internem FES-Promotor zeigten. Wurde die Vektorkopienanzahl pro Zelle mit der gp91<sup>phox</sup>-Expression korreliert, waren die Genfallen-Vektoren 4-fach ineffizienter als der Promotor-Kontrollvektor (vgl. Abb. 4.5). Diese Resultate führten zu der Erkenntnis, dass Genfallen-Vektoren am besten in Kombination mit einer Selektionsstrategie eingesetzt werden sollten. Es gab mehrere Ansätze, diese Selektion und Expansion der transduzierten Zellen zu erreichen. Die Selektion durch FACS-Sortierung war zwar in Verbindung mit gp91<sup>phox</sup> und der Zelllinie PLB erfolgreich, konnte jedoch nicht für die *in vitro* Selektion der *IL2RG*<sup>+</sup>-Zellen genutzt werden. Der Grund dafür war, dass die transduzierten ED-7R-Zellen innerhalb der Gesamtpopulation einen Wachstumsnachteil gegenüber den nicht transduzierten Zellen (vgl. Kapitel 4.1.5) zeigten. Es scheint als hätte sich die ED-7R Zelllinie

im Laufe der Zeit an das Fehlen der  $\gamma$ -Kette adaptiert und möglicherweise alternative Mechanismen zum Ausgleich des Defektes entwickelt. So wirkte sich die Re-Expression von *IL2RG* gar nachteilig auf die Zellen aus. Dies konnte bereits in Versuchen mit Vektoren beobachtet werden, die durch einen LTR-ständigen SFFV-Promotor eine konstitutiv aktive *IL2RG*-Expression vermitteln. Infolgedessen wurde in einem ersten Ansatz eine Selektionsstrategie gewählt, mit der es möglich ist, transduzierte Zellen zur Proliferation und damit zu einer Expansion anzuregen. Idealerweise sollte diese Strategie auch *in vivo* mit Hilfe eines Mausmodells verwendet werden. Das *in vitro* Expansionssystem basierte auf dem humanen FKBP12 Protein, das in Gegenwart des chemischen Liganden AP20187 dimerisiert [90]. Als Signalweg wurde die über den Mpl-Rezeptor vermittelte Thrombopoietin-abhängige (TPO) Signaltransduktion gewählt [90].

Die Aktivierung des Fusionsproteins aus einem mutierten Derivat des FKBP12 (F36V) und der intrazellulären Domäne des Mpl-Rezeptors durch ein kleines chemisches Molekül (*chemical inducer of dimerisation*, CID) wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Dabei konnte *in vitro* eine Expansion von primären humanen und murinen Zellen beobachtet werden. Jin *et al.* beschrieben schon im Jahr 1998 eine gezielte Expansion von murinen Knochenmarkszellen durch die Verwendung eines FKBP12-Mpl Fusionsvektors nach Stimulation durch den chemischen Liganden FK1012. Die Zellen konnten dabei bis zu einem Jahr in Kultur gehalten und immer wieder restimuliert werden [122]. Ebenfalls war eine bis zu 186-fache Expansion von primären humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen durch den CID AP1903 möglich, wobei der Effekt jedoch im Gegensatz zum murinen System nur von transients Dauer war [123].

In der vorliegenden Arbeit konnte die faktorabhängige BaF3-Zelllinie nach Transduktion mit FKBP/Mpl exprimierenden Genfallen-Vektoren durch den CID AP20187 auf fast 100 % transduzierte Zellen expandiert werden.

Eine *in vivo* Expansion nach Transplantation transduzierter Zellen durch Gabe eines CID wurde ebenfalls häufig in der Literatur beschrieben. Nach Transplantation GFP und FKBP/Mpl exprimierender primärer mHSZ konnte in C57BL/6-Mäusen eine 3-fache Expansion von GFP<sup>+</sup>-Erythrozyten und -Thrombozyten sowie eine 1,5-fache Expansion von GFP<sup>+</sup>-Granulozyten nach AP20187-Behandlung beobachtet werden [88]. Auch in Hunden wurde eine AP20187-abhängige Expansion genetisch modifizierter Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten nach Transplantation transduzierter CD34<sup>+</sup>-Zellen gezeigt. Dieser Effekt war sogar bis zu neun Jahre nach Transplantation und repetitiver Gabe von AP20187 zu sehen [90,91]. Im Rahmen einer anderen Studie bei der Paviane als Versuchstiere dienten, konnte jedoch nur ein mäßiger Effekt der CID-abhängigen Expansion sowohl *in vitro* kultivierter CD34<sup>+</sup>-Zellen als auch transplantierte Zellen *in vivo* gezeigt werden [124].



Innerhalb dieser Arbeit war es nicht möglich mit selektierbaren Genfallen-Vektoren transduzierte primäre Mauszellen aus X-CGD<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Hilfe des CIDs AP20187 *ex vivo* zu expandieren. Die immortalisierte murine pro-B-Zelllinie BaF3 ist auf den Wachstumsfaktor IL-3 angewiesen und somit führt IL-3-Entzug in den Zellen zum Tod durch Apoptose. Der CID ersetzt dieses Wachstumssignal und es ist eine deutliche Expansion der positiven Zellen möglich. Im Kontext der Hämatopoese hingegen stimuliert IL-3 hauptsächlich als Wachstumsfaktor die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen in die myeloische Richtung und wird daher auch als multi-CSF (*colony stimulating factor*, CSF) bezeichnet. Diese Abhängigkeit besteht wahrscheinlich nur transient und somit spielt die richtige Wahl der Zytokine für das Kultivierungsmedium eine entscheidende Rolle. Des Weiteren stellt es ein großes Problem dar, Stamm- und Vorläuferzellen undifferenziert für die benötigte Selektionszeit in Kultur zu halten. Eine denkbare Erklärung für das Scheitern der Expansion könnte also eine Kombination einer zu geringen Rezeptorexpression in Genfall-transduzierten Vorläuferzellen und deren zu schnelle Differenzierung in Gewebekultur sein.

In Vorarbeiten sowie im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich eine andere Selektionsstrategie basierend auf dem Prolaktin-Rezeptor (PrIR) getestet, mit der ebenfalls zwar eine Expansion der Zelllinie BaF3, jedoch keine Expansion der primären mHSZ mit Hilfe von Genfallen-Vektoren beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es existieren weitere Signaltransduktionsdomänen, die erfolgreich in der Literatur beschrieben wurden und eine Alternative zum Mpl darstellen könnten. Blau *et al.* gelang es durch die Verwendung des Erythropoietin-Signalwegs (EPO) die Expansion von BaF3-Zellen [125]. Ähnliche Ergebnisse konnten mit spezifischen Signaltransduktionsdomänen des FGFR-1-Rezeptors [126] und cKit [127] erzielt werden. Auch eine Anwendung, bei der das nicht integrierende *Sleeping Beauty*-Transposon-System in Kombination mit dem F36VFGFR1-Fusionsprotein zum Einsatz kam, ist bekannt. Dabei konnte durch AP20187 eine positive Selektion von BaF3-Zellen innerhalb einer Woche realisiert werden [128]. Ergebnisse in hämatopoetischen Stammzellen, sind hierfür jedoch nicht bekannt.

Die Untersuchung des rekonstituierten Signalweges durch die Detektion von pSTAT5 nach IL-2-Stimulation in *IL2RG*<sup>-/-</sup>-Zellen gibt ebenfalls einen Hinweis darauf, dass es mit dem *IL2RG*-Genfallen-Konstrukt nicht möglich ist, ohne weitere Selektion eine ausreichende Transgenexpression zu gewährleisten. Entsprechend konnte pSTAT5 in GT-mIL2RG transduzierten ED-7R-Zellen auf Proteinebene per Western Blot nicht nachgewiesen werden. Ein weiteres Indiz dafür, dass es zwar möglich ist ein Transgen unter Kontrolle eines endogenen Promotors zu exprimieren, dies aber gleichzeitig mit einem sehr viel geringeren Expressionslevel einhergeht, lieferten die Ergebnisse des Phosflow-Versuchs (vgl. Abb. 4.12). Obwohl pSTAT5 in GT-mIL2RG transduzierten ED-7R-Zellen nach IL-2-Stimulation nachgewiesen werden konnte, war dessen Menge im Vergleich zur Positivkontrolle in der

Gesamtpopulation ca. 13-fach und in der *IL2RG*<sup>+</sup>-Population ca. 5-fach verringert. Deswegen wurde entschieden eine alternative Selektionsstrategie einzusetzen.

Dabei sollte der natürliche Selektionsdruck auf *IL2RG*<sup>+</sup>-Zellen in *IL2RG*<sup>-</sup>-Mäusen ausgenutzt werden. Die zuvor gezeigten Zellkulturergebnisse wurden jedoch erneut durch diese Transplantationsversuche bestätigt. Es konnte zwar in vereinzelt Mäusen eine erhöhte Anzahl an T- und B-Zellen in KM und Milz innerhalb der Genfallengruppe nachgewiesen werden, doch gelang dies nur im Einzelfall. Entsprechend ließen sich auch im Thymus einer Maus aus der GT-Versuchsgruppe *IL2RG*<sup>+</sup>-Zellen nachweisen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass ein nicht manifester Infekt über die Induktion einer Immunantwort zu einer klonalen Expansion von *IL2RG*<sup>+</sup>-T-Zellen geführt hat.

Diese Beobachtungen bestätigen wiederholt die sehr viel geringere Rekonstitutionseffizienz von Genfallen- gegenüber konventionellen, Promotor-getriebenen Konstrukten. Welche Maßnahmen zur Optimierung dieser *in vivo* Experimente in Zukunft zu Gunsten des Genfallen-Konstruktes getroffen werden könnten, werden im nachfolgenden Kapitel erläutert.

### 5.1.1 Optimierungsvorschläge

Als Folge der Erfahrungen, die im Verlauf dieser Arbeit gesammelt wurden und den daraus resultierenden Ergebnissen, sind unterschiedliche Optimierungsansätze denkbar.

#### Antibiotika-Resistenz

Eine möglicherweise erfolgreichere Selektion könnte durch ein internes Selektionsgen erzielt werden. Diese Strategie wurde schon in den ursprünglichen Genfallen-Vektoren in Form einer Neomycin-Resistenz verwendet und kam auch zu Beginn dieser Arbeit zum Einsatz (vgl. Kapitel 4.1.1). Durch ein solches Antibiotika-Resistenzgen könnte durch eine *in vitro* Selektion die Genfalle exprimierenden Zellen angereichert werden.

Es existieren unterschiedliche Antibiotika-Resistenzgene, die in Frage kommen könnten. Zusätzlich zum oben erwähnten Neomycin-Resistenzgen könnte auch das Nukleosid-Antibiotikum Puromycin mit dem entsprechenden Resistenzgen *PAC* (engl. *puromycin N-acetyl-transferase*) oder das Antibiotikum Phelomycin D1 (Handelsname: Zeocin<sup>TM</sup>) mit dem Resistenzgen *Sh ble* eingesetzt werden. Im Vergleich zu anderen Systemen ist durch Zeocin<sup>TM</sup> eine bessere Selektion mit weniger falsch positiven Klonen möglich. Außerdem zeigte Zeocin<sup>TM</sup> eine bessere Transgenstabilität nach Aussetzen des Selektionsdrucks [129]. Eine Selektion durch ein Antibiotika-Resistenzgen bietet den Vorteil, dass im Vorfeld einer Transplantation eine kurze *in vitro* Selektionsphase von 3 bis 5 Tagen durchgeführt werden kann [130]. Da eine solche *drug selection* jedoch auch mit einer erheblichen Toxizität gegenüber den Zielzellen verbunden ist, die bei sensiblen Primärzellen problematisch sein

könnte, wurde diese Strategie im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter in Betracht gezogen.

### Empfänger-Mausmodell

In dieser Arbeit wurden Tiere des Mausstammes B6.129S4-*Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/J* sowohl als Spender- als auch Empfängermause genutzt. Eine Charakteristik dieser Mäuse ist, dass sich ihr Phänotyp deutlich von dem des humanen X-SCID-Phänotyps unterscheidet. Das Fehlen von *IL2RG* hat, anders als beim Menschen, keinen totalen T-Zellverlust zur Folge und B6.129S4-*Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/J*-Mäuse besitzen noch CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Milz und Lymphknoten (vgl. Abb. 4.15). Es kann daher sein, dass die T-Zellen in diesen speziellen Nischen besonders geschützt sind und vor der Transplantation nicht alle endogenen Zellen durch die Bestrahlung eliminiert werden. Darauf deuten die Ergebnisse aus dem dritten Transplantationsversuch hin, bei dem männliche Spenderzellen in weibliche Empfängermause transplantiert wurden (vgl. Abb. 4.26). Es scheint als würden restliche Zellen im Empfängerorganismus mit den transplantierten Spenderzellen konkurrieren und zu einem schlechteren *Engraftment* führen. Dies kann einen geringen Selektionsdruck zur Folge haben, der jedoch für Genfallen-Vektoren unabdingbar ist. Des Weiteren eignet sich eine unbestrahlte *IL2RG<sup>-/-</sup>*-Maus nicht als ideale Negativkontrolle, da schwache Effekte, wie sie mit Genfallen-Vektoren zu erwarten sind, nicht deutlich genug abgrenzbar sind. Ein Wechsel des Empfänger-Mausmodells könnte ein Vorschlag zur Lösung dieser Probleme sein.

So könnten z. B. *IL2RG<sup>-/-</sup>*-Mäuse mit einer zusätzlichen Mutation im *Rag2*-Gen, die in einer kompletten Immundefizienz (T<sup>-</sup>B<sup>-</sup>NK<sup>-</sup>) resultiert, eine mögliche Alternative darstellen. In einer Publikation von Almarza *et al.* wurde dieses Mausmodell erfolgreich als Empfänger eingesetzt [105]. In zwei weiteren Studien [77,131] wurde eine Kreuzung zwischen der *IL2RG<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>*-Maus und der A/J-Maus (Mutation in der Komplementkomponente C5, die ebenfalls zu einer schwerwiegenden Immunschwäche führt) namens *IL2RG<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>c5<sup>-/-</sup>* generiert und als Empfängermause genutzt. In beiden Fällen konnten die genetisch modifizierten Zellen erfolgreich im Empfänger anwachsen und das Immunsystem rekonstituieren. Auch *IL2RG<sup>-/-</sup>*-Mäuse, die zum einen den immunphänotypischen SCID- und zum anderen den nicht-fettleibig-diabetischen-Hintergrund (*non-obese diabetic*, NOD) aufweisen, könnten als geeignetes Empfängermodell dienen. Diese Mäuse besitzen Mutationen in den Genen *Prkdc* und *IL2RG* (NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ*), was in einer kompletten und schwerwiegenden Immundefizienz resultiert [132]. Aus diesem Grund eignen sich diese sog. NSG-Mäuse als optimales *Engraftment*-Modell für die Transplantation humaner Stammzellen und haben in den letzten Jahren sehr stark an Bedeutung für Xenotransplantationsstudien gewonnen. Im Kontext von X-SCID verwendeten Horino *et al.* in einer Studie mit einem modifizierter *foamy virus*-Vektor NSG-Empfängertiere für die gentherapeutische Behandlung der murinen X-SCID [133].

### Lentivirale Vektoren

Als ein weiterer Angriffspunkt zur Optimierung könnte sich der Wechsel von  $\gamma$ -retroviralen zu lentiviralen Konstrukten erweisen. Lentivirale Vektoren (LV) zeichnen sich durch ihre Präferenz aus, regulative DNA-Elemente zu meiden [134,135]. Der Präintegrationskomplex (*preintegration complex*, PIC), bestehend aus der Integrase und der cDNA, wird vom zellulären Protein LEDGF/p75 (*lens epithelium-derived growth factor*, LEDGF) an transkriptionell aktive Bereiche geführt, was in einer überdurchschnittlich häufigen Integration in Introns resultiert [59,136].

Ein weiterer Vorteil von LVs ist ihre Fähigkeit auch Zellen mit geringer mitotischer Aktivität nach kurzer Stimulationsphase transduzieren zu können, da der PIC aktiv durch Poren der Zellkernmembran transportiert wird [137]. Die  $\gamma$ -retroviralen Vektoren sind dagegen auf die Auflösung der Kernmembran während der mitotischen Zellteilung angewiesen. Durch LVs ist also eine effizientere Transduktion von HSZ mit höheren Virustitern nach einer kürzeren *ex vivo* Stimulationsphase möglich.

Auch im Kontext von Genfallen ist eine Publikation bekannt, bei der die Effizienz von lentiviralen im Vergleich zu  $\gamma$ -retroviralen Genfallen-Vektoren verglichen wurde [138]. Hier konnte von Yamaguchi *et al.* gezeigt werden, dass aktive Gene von einer lentiviralen Genfalle effizienter getroffen werden, als von einer  $\gamma$ -retroviralen Genfalle, was ein wichtiger Punkt im Hinblick der gentherapeutischen Anwendung von Genfallen ist. Für eine effiziente Transgenexpression ist dabei wichtig, dass der endogene Promotor am Integrationsort aktiv ist.

### Andere Zellsysteme

Eine weitere Möglichkeit wäre der Wechsel zu einem anderen Zellsystem. Hier wurden hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus X-SCID Mäusen als Zielzellen für die genetische Modifikation eingesetzt. Die Transduktion induzierter, pluripotenter Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) mit Genfallen-Vektoren und die anschließende Differenzierung in hämatopoetische Vorläuferzellen oder reife Lymphozyten könnte eine Alternative darstellen.

Der Vorteil von iPSCs ist, dass sie nach einem spezifischen Reprogrammierungs-Protokoll durch die Überexpression bestimmter Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc) theoretisch aus allen somatischen Zellen (z. B. Fibroblasten) eines Patienten generiert werden können [139]. Jedoch ergeben sich auch Limitierungen bei der Nutzung von iPSCs im Kontext der gentherapeutischen Behandlung. So ist nach Transduktion mit viralen Vektoren eine stabile und persistierende Transgenexpression, besonders während der Differenzierung nicht leicht zu gewährleisten [140,141]. Um ihr Genom zu schützen, verfügen iPSCs über spezielle Abwehrmechanismen, die zu einem *Silencing* von viralen Sequenzen führen

[142,143]. Während der Differenzierung kommt es zu epigenetischen Chromatinveränderungen, die das geschlossene Heterochromatin zur Folge haben, was zu einer Repression der Transgenexpression führt.

Die größte Herausforderung für die klinische Anwendung der iPSCs besteht bisher allerdings in der Entwicklung effizienter Differenzierungsprotokolle. Die Ko-Kultivierung mit OP9-Stromazellen in Kombination mit SCF und TPO induziert *in vitro* die Differenzierung von iPSCs zu hämatopoetischen Vorläuferzellen [144]. Aufbauend auf dieser Erkenntnis ist im Kontext von X-SCID eine Publikation veröffentlicht worden, bei der eine *in vivo* Differenzierung von murinen sowie humanen iPSCs zu hämatopoetischen Vorläuferzellen in subkutanen Teratomen zu einer Rekonstitution von X-SCID Mäusen führte [145]. Dabei wurden zunächst iPSCs aus X-SCID-Mäusen durch einen IL2RG-exprimierenden  $\gamma$ -retroviralen Vektor generiert und anschließend eine klonale iPS-Zelllinie etabliert. Diese iPS-Zellen wurden dann X-SCID-Mäusen subkutan, zusammen mit OP9-Stromazellen [146] injiziert. Zwölf Wochen nach Injektion fand, aus den sich gebildeten Teratomen, eine Lymphozytenrekonstitution statt, wobei die X-SCID-Mäuse eine normale Anzahl reifer T-Zellen im peripheren Blut aufwiesen.

Auch eine *in vitro* T-Zell-Differenzierung der mit Genfallen transduzierten HSZ aus X-SCID-Mäusen durch das OP9-DL1-System wäre denkbar [147]. Dabei wird die spezielle Stromazelllinie OP9-DL1 eingesetzt, die ektopisch den Notch-Liganden *Delta-like 1* (DLL1) exprimiert. Damit können aus Knochenmark isolierte HSZs in T-Lymphozyten differenziert werden. Die Funktionalität dieser T-Lymphozyten könnte dann *in vitro* mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht werden, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen (vgl. Kapitel 3.2.4).

## 5.2 Vermeiden von aberrantem Spleißen im Kontext der Gentherapie

Die Genotoxizität von gentherapeutischen Vektoren kann sich nicht nur durch *Enhancer*-vermittelte Transaktivierung benachbarter Onkogene, sondern auch durch mutagene aberrante Spleißprodukte bemerkbar machen. Diese Insertionsmutagenese resultiert zwar seltener in einer klonalen Dominanz, darf aber im Kontext der Gentherapie nicht unterschätzt werden.

Zum ersten Mal beschrieben Montini *et al.* im Jahre 2009 ein onkogenes, aberrantes Spleißprodukt. Aus dem tumoranfälligen *Cdkn2a*<sup>-/-</sup>-Mausmodell (*cyclin-dependent kinase inhibitor*, Cdkn) wurden HSZ isoliert und anschließend mit einem lentiviralen Vektor der ersten Generation transduziert. Nach Transplantation der transduzierten HSZ konnte als Ursache eines entstandenen myeloiden Tumors, ein vom Vektor induziertes aberrantes Spleißprodukt identifiziert werden [148]. In diesem Fall integrierte der Vektor in das *Braf*-Gen

und erzeugte durch aberrantes Spleißen vom SD des Vektors zum SA des 13. Exons ein trunkiertes Braf, das durch das Fehlen der regulatorischen Domäne zu einem Onkogen wurde.

Ein weitere Publikation in 2012 berichtet über eine akute B-Zelleukämie (B-ALL), die in einem Mausmodell durch vektorvermittelte Gen-Inaktivierung hervorgerufen wurde [149]. Der verwendete lentivirale Vektor integrierte in das 8. Exon des *Ebf1*-Gens (*early b cell factor*, Ebf), das die B-Zelldifferenzierung reguliert. Verschiedenste aberrante Spleißprodukte, die in einer frühzeitigen Terminierung der Ebf1-mRNA resultierten und zu einem nahezu kompletten Funktionsverlust (80 %) führten, begünstigten die Entstehung der B-ALL [150,151].

Auch im Kontext einer klinischen Gentherapiestudie zur Behandlung der  $\beta$ -Thalassämie mit einem lentiviralen SIN-Vektor wurde über eine klonale Dominanz als Ursache von aberrantem Spleißen berichtet [152]. Im Jahr 2007 wurde ein Patient mit einem Vektor behandelt, bei dem die cDNA des therapeutischen  $\beta$ -*Globin*-Gens unter der Kontrolle eines, für die erythroide Reihe, spezifischen endogenen Promotors stand. Zusätzlich enthielt der Vektor zwei Kopien des Kernelements des Chromatin-Isolators *cHS4* (*chicken hypersensitivity site*, cHS), der zum einen eine Transaktivierung zellulärer Gene durch virale Sequenzen und zum anderen eine Ausbreitung von Heterochromatin in den Vektor verhindern sollte. Der Patient zeigte nach der Behandlung zwar eine klinische Verbesserung und wurde unabhängig von Erythrozyten-Infusionen, doch war dies Folge einer klonalen Expansion eines Klon, der eine Vektorintegration im *HMGA2*-Gen (*high-mobility group AT-hook*, HMGA) zeigte. *HMGA2*-Transkripte verloren durch aberrantes Spleißen *let-7* microRNA-Zielsequenzen, was den Abbau durch *let-7* verhinderte und zu einer HMGA2-vermittelten Zellproliferation führte [153].

Wird ein Genfallen-Vektor eingesetzt, ist die Expression des Transgens u. a. abhängig von einem korrekten Spleißvorgang von einem SD des betroffenen Gens zum SA des Vektors. Es kann also auch passieren, dass aberrant zu kryptischen Spleißstellen im Genom gespleißt wird, was in zellulärer Toxizität resultieren könnte. Bei der Analyse von, im Rahmen dieser Arbeit, generierten Genfallen-Integrationen wurde ebenfalls beispielhaft ein Klon nachgewiesen, bei dem nicht korrekt gespleißt wurde (vgl. Tab. 4.3). Dabei konnte eine Integration des Vektors in das Gen *NHP1* (*non-histon protein*, NHP) identifiziert werden, welche jedoch nicht in einem korrekten Spleiß zum SA des Vektors resultierte.

Da die meisten Gene, inklusive der Tumorsuppressorgene, innerhalb des humanen Genoms rezessiv vorliegen, führt eine heterozygote Genfallen-Mutation nur in wenigen Ausnahmefällen zur Ausprägung eines Phänotyps. Dazu zählen Integrationen in ein *single-copy*-Gen, X- oder Y-chromosomale sowie haploinsuffiziente Gene. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass „*loss-of-function*“-Mutationen in den Tumorsuppressorgenen, für die

gewebespezifische Haploinsuffizienzen bekannt sind [154], ohne ein kooperierendes Onkogen transformierende Wirkung haben. In diesem Kontext ist zu beachten, dass das Risiko einer Leukämieentstehung bei Patienten, die eine autologe Stammzelltransplantation in Folge einer nicht-hämatologischen Erkrankung, erhalten, sehr gering ist. Dies deutet darauf hin, dass aktivierende Onkogen-Mutationen in transplantierten hämatopoetischen Zellen selten sind [155]. Diese Argumente begünstigen die Idee, den gentherapeutischen Genfallen-Ansatz als eine sichere Alternative zur Standard-Methodik in Betracht zu ziehen.

### 5.3 Aussichtsreiche Alternativen für die Gentherapie

In den letzten Jahren gab es viele neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Gentherapie. Zum einen wurden bestehende Vektoren mit neuen Elementen ausgestattet die Effizienz und Sicherheit erhöhen. Zum anderen wurden alternative virale Vektoren in der Präklinik getestet. Schließlich wurden unter dem Sammelbegriff „*genome editing*“ Methoden entwickelt, die eine gezielte Reparatur eines mutierten Gens direkt in der erkrankten Zielzelle ermöglichen.

#### Alternative Vektoren

Eine erfolgsversprechende Alternative zu  $\gamma$ -retroviralen Vektoren könnten die  $\alpha$ -retroviralen Vektoren darstellen, die sich durch ein relativ neutrales Integrationsprofil auszeichnen und keine Präferenzen für regulative Bereiche oder transkriptionell aktive Gene aufweisen [156]. Darüber hinaus verfügen  $\alpha$ -Retroviren über eine kurze *Leader*-Region ohne Spleißsequenzen [157], was das Insertionsmutageneserisiko möglicherweise vermindert [158]. Im Kontext der gentherapeutischen Behandlung von X-CGD konnten Kaufmann *et al.* zeigen, dass SIN- $\alpha$ -retrovirale Vektoren keine aberranten Spleißprodukte produzieren und bereits wenige Kopien eine funktionale Korrektur des Gendefektes herbeiführen [157]. Eine weitere Alternative könnten nicht integrierende Vektorsysteme, wie z. B. die AAV-abgeleiteten Vektoren (*adeno-associated virus*, AAV) darstellen. Sie gelten jedoch vorrangig als attraktive Vektoren für die direkte *in vivo* Korrektur von Genen in post-mitotischen Geweben, wie z. B. der Retina, des zentralen Nervensystems, der Leber oder der Skelett- und Herzmuskulatur [26]. Der parentale, replikationsinkompetente, nicht pathogene AAV integriert in einen spezifischen Locus auf dem humanen Chromosom 19 [159]. Ein gentherapeutischer AAV-Vektor, der in der Klinik zum Einsatz kommt, ist frei von allen viralen ORFs, liegt also in episomaler Form vor und wird daher als ein nicht-integrierendes Vektorsystem bezeichnet. Zur Behandlung der Leberschen kongenitalen Amaurose (*Leber's congenital amaurosis*, LCA), einer Funktionsstörung der Retina, wurden AAVs erstmalig in drei unabhängigen Studien benutzt [160–162]. Auch für Erkrankungen des zentralen Nervensystems, z. B. Morbus Parkinson [163,164] oder Herzmuskelkrankheiten [165,166] gelten AAVs als erfolgreiche Genfähren.

Aufgrund ihrer Eigenschaften würden AAVs für die Behandlung monogener Bluterkrankungen eher nicht in Frage kommen.

### Vektorelemente

Durch den Einsatz bestimmter Vektorelemente kann die Expression des Therapiogens vor epigenetischen Repressionseffekten geschützt werden. So konnte beispielsweise mit dem bidirektionalen ubiquitären 1,5 kb Chromatinöffnungselement A2UCOE (*ubiquitous chromatin opening element*, UCOE) zusammen mit dem SFFV- und EF1 $\alpha$ -Promotoren eine positionsunabhängige und persistierende Transgenexpression in iPS-Zellen ermöglicht werden [121,167]. Die bidirektionale Eigenschaft der UCOEs wirkt sich jedoch negativ auf die Virusproduktion aus, was die klinische Applikation unter GMP-Bedingungen erschwert.

Als erfolgsversprechende Alternative könnte hier ein kürzlich entwickeltes minimales 0,7 kb CBX3-UCOE-Element dienen, das neben einer stabilen Transgenexpression auch eine bessere Viruspartikelproduktion ermöglicht [168].

Ähnliche Erfolge konnten mit Kerngerüst-/Kernmatrixanheftungsregionen (*scaffold or matrix attachment regions*, S/MARs) gezeigt werden, die durch Anheften der Kernmatrix den Vektor eingrenzen und dadurch Positionseffekte verhindern [169],[170].

Ein weiteres Element, mit dem Promotor-/Enhancer-Wechselwirkungen und Heterochromatinausbreitung vermieden werden können, ist der cHS4-Isolator (*chicken  $\beta$ -globin hypersensitive site 4*, cHS4) [171]. Dessen Effizienz ist jedoch zelltypabhängig [172] und in humanen HSZ eher gering [173]. Außerdem führte die Integration eines cHS4-Elements in den LTR eines lentiviralen Vektors zu reduzierten Virustitern [174,175].

### „Genome Editing“

Jede Integration eines viralen Vektors stellt generell ein mutagenes Ereignis dar, welches erhebliche Veränderungen in der Zelle zur Folge haben kann. Dies kann sich z. B. in aberranten Spleißvorgängen resultierend in unerwünschten Fusionstranskripten oder, besonders im Kontext der Genfallen-Vektoren, in einer Inaktivierung eines endogenen Genlokus äußern. Um diese Problematik zu umgehen, haben aktuelle Technologien ein gezieltes Bearbeiten einer Mutation im Genom (*genome editing*) zum Ziel. Somit kann das defekte Gen entweder direkt *in situ* repariert oder durch eine gesunde Kopie ersetzt werden. Dafür muss zuerst ein Doppelstrangbruch (*double-strand break*, DSB) der DNA erfolgen, der dann von der Zelle durch zwei Mechanismen repariert wird: (i) Bei der nicht-homologen Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) werden die DNA-Enden direkt religiert, was in Deletionen oder Insertionen unterschiedlicher Länge resultieren kann. (ii) Bei der Reparatur des DSB durch homologe Rekombination (*homology-directed repair*, HDR) muss zusätzlich eine Donor-DNA mit homologen Bereichen zur Verfügung gestellt werden,



die anschließend integriert wird. Je nachdem welche Art der Mutation vorliegt, sind sogar beide Reparaturwege für eine therapeutische Anwendung denkbar (Abb. 5.1).

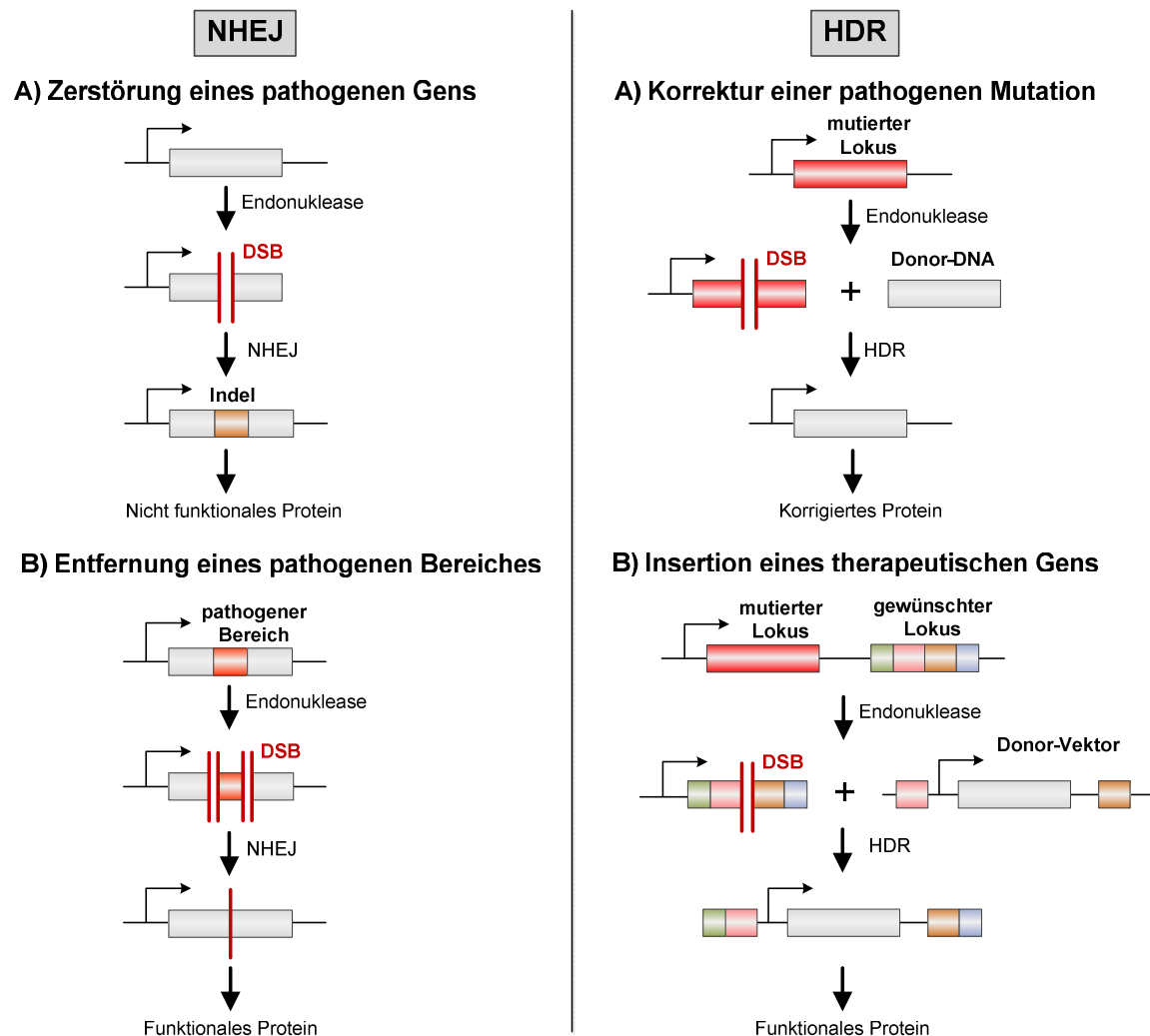


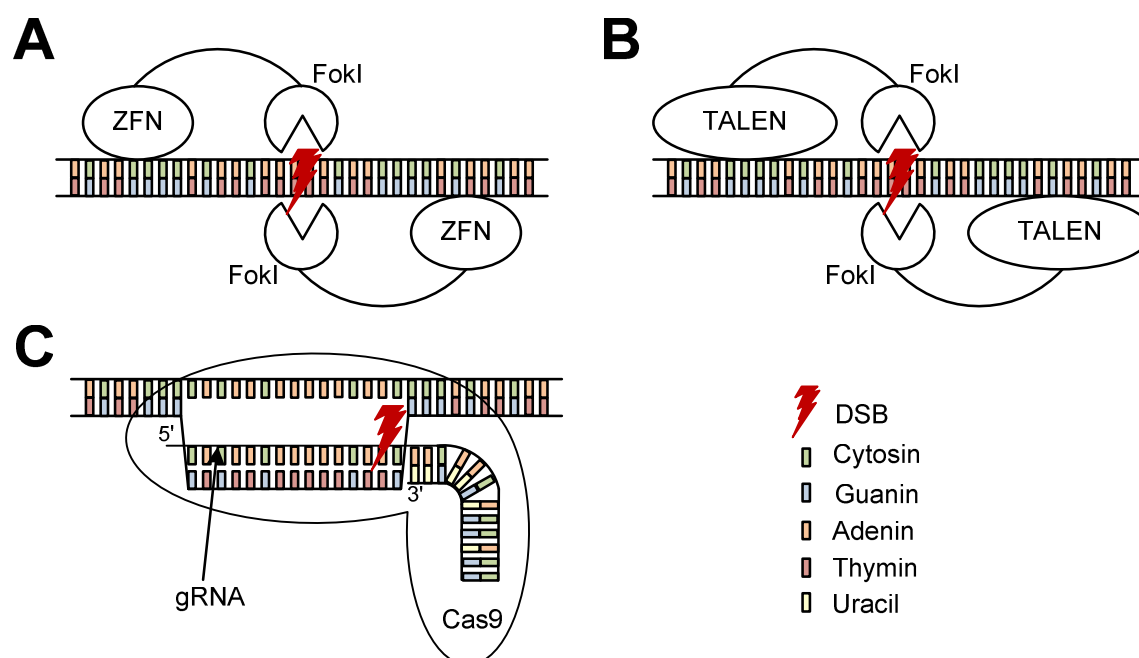
Abb. 5.1: Möglichkeiten der therapeutischen Anwendung des „Genome Editings“

Näher erläutert im Text. NHEJ: *non-homologous end joining*, DSB: Doppelstrangbruch, HDR: *homology-directed repair* (modifiziert nach [176]).

Ohne Donor-DNA kann durch NHEJ entweder ein Krankheitsgen inaktiviert oder ein pathogener Bereich eines Gens entfernt werden (Abb. 5.1 links). Im ersten Fall ist das Ergebnis ein nicht funktionales Protein. Dieses Vorgehen könnte eine therapeutische Option für Erkrankungen darstellen, die durch eine „*gain-of-function*“-Mutation entstehen, wie z. B. bei Chorea Huntington [176]. Ebenfalls möglich ist eine NHEJ-basierte Rekonstitution des funktionalen Proteins bei bestimmten neurodegenerativen Erkrankungen, den sog. Trinukleotiderkrankungen, bei denen sich Basentriplets intragenisch expandieren und somit einen pathogenen Bereich formen [177]. Beispiel hierfür sind die spinocerebellären Ataxien, die durch zwei DSB und das anschließende Herausschneiden der sich wiederholenden Sequenzen durch *Genome Editing* behandelt werden könnten [176].

Bei einer therapeutischen Anwendung des HDR existieren ebenfalls zwei Möglichkeiten. Entweder in Kombination mit einer Donor-DNA oder eines Donor-Vektors. Der Donor-Vektor, bestehend aus Homologiearmen, Promotor, Transgen und Polyadenylierungssignal (Abb. 5.1 rechts), wird über HDR in den Locus eingebaut. Die Donor-DNA dient lediglich als Template zur HDR-getriebenen Korrektur von Punktmutationen. Alternativ zum endogenen Locus können über HDR gesunde Genkopien in sog. „safe harbor“-Loci eingeschleust werden. In einem „safe harbor“-Locus findet eine aktive Transkription statt, die Zerstörung des Locus hat jedoch keine erkennbaren phänotypischen Folgen. Beispiele hierfür sind der ROSA26 oder AAVS1-Locus [178].

Um einen DSB in der DNA zu verursachen, können verschiedene semisynthetische Endonukleasen eingesetzt werden, welche sich hinsichtlich ihrer DNA-Erkennungsmechanismen unterscheiden (Abb. 5.2) [176,179].



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung der synthetischen Endonukleasen**

Nähere Erläuterungen im Text. ZFN: Zinkfinger-nuklease, *FokI*: bakterielles Restriktionsenzym, TALEN: *transcription activator-like effector nuclease*, gRNA: *single guide RNA*, Cas9: CRISPR *associated protein 9*, DSB: Doppelstrangbruch (modifiziert nach [179]).

Die Zinkfinger-nukleasen (ZFNs) entsprechen der älteren Generation von Designer-Nukleasen und bestehen aus einem Paar von Endonukleasedomänen des bakteriellen *FokI* Enzyms, flankiert von zwei lokusspezifischen DNA-Bindedomänen [179]. Die Herstellung von ZFNs ist sehr aufwendig [176] und das Risiko von unspezifischen „off-target“-Mutationen ist relativ hoch [180–182]. Im Kontext der Erkrankung X-SCID sind jedoch mehrere Studien bekannt, in denen der defekte endogene *IL2RG*-Locus in diversen Zelltypen gezielt durch ZFNs und HDR korrigiert wurde [183–185]. In einer dieser Studien wurden sowohl die ZFNs als auch

die Donor-DNA über einen Integrase-defizienten lentiviralen Vektor in humane HSZ und ES-Zellen eingebracht [183]. In einer anderen Studie gelang die Korrektur des mutierten *IL2RG*-Gens in humanen HSZ eines X-SCID-Patienten. Die korrigierten HSZ ermöglichten in transplantierten NSG-Mäusen eine Rekonstitution der normalen Hämatopoese [184].

Die Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektornukleasen (*transcription activator-like effector nucleases*, TALENs) sind Fusionsproteine einer DNA-bindenden Domäne mit einer Endonuklease. Die DNA-bindende Domäne stammt ursprünglich aus Bakterien der Gattung *Xanthomonas* und besteht aus einer Sequenz von 33 - 35 Aminosäuren, der sog. *Tal effector*-Domäne [186]. Die Positionen 12 und 13 der *Tal effector*-Domäne sind variabel und für die Erkennung von Nukleotiden in der DNA verantwortlich. Als nicht-spezifische DNA-Endonuklease wird hier ebenfalls *FokI* verwendet, weshalb TALENs eine zu ZFNs ähnliche Struktur aufweisen. Sie sind jedoch einfacher herzustellen [179] und besitzen vermutlich ein minimiertes Risiko für „*off-target*“-Mutationen [187,188]. Bisher ist allerdings nur eine Studie bekannt, bei der ein direkter Vergleich zwischen ZFNs und TALENs erfolgte [189]. Gegen den, mit HIV-assoziierten humanen *CCR5*-Lokus gerichtete TALENs zeigten im Vergleich zu korrespondierenden ZFNs eine minimierte „*off-target*“-Aktivität im sequenzähnlichen *CCR2*-Lokus. Auch im Zusammenhang mit *IL2RG* existiert eine Publikation, die eine erfolgreiche Korrektur des endogenen Locus in der humanen T-Zelllinie Jurkat mit Hilfe von spezifischen TALENs und HDR zeigt [190].

Die neuste und populärste Entwicklung auf dem Gebiet des „*Genome Editings*“ ist das CRISPR-assoziierte Nuklease Cas9-System (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*, CRISPR). Dabei wird eine sog. sgRNA (*single guide RNA*) eingesetzt, um das bakterielle *CRISPR associated protein 9* (Cas9) zu einer gewünschten Sequenz im Genom zu leiten. Cas9 hat den Ursprung im nativen Immunsystem des Bakteriums *Streptococcus pyogenes* und führt dort zur Zerstörung fremder DNA. Cas9 erkennt eine spezifische Sequenzfolge (*protospacer-adjacent motif*, PAM) und führt 3 bp *upstream* dieser PAM-Sequenz zu einem DSB [191]. Die Vorteile des CRISPR/Cas9-Systems bestehen in dessen hoher Effizienz in Zellen jeglicher Art, inklusive Säugerzellen und in der Einfachheit der Herstellung. Je nach genutzter sgRNA kann die Anzahl an potentiellen „*off-target*“-Effekten allerdings noch stark variieren [192,193], weshalb sich die aktuelle Forschung auf die Weiterentwicklung und Optimierung des Systems für den klinischen Einsatz fokussiert.

#### 5.4 Weitere Möglichkeiten zur Überprüfung der Funktionalität von Genfallen-Vektoren

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde die Rekonstitution des Lymphozytenkompartiments sowie dessen Funktionalität auf Proliferations- und Signaltransduktionsebene im X-SCID-Mausmodell analysiert. Es gibt allerdings noch weitere Möglichkeiten, um die Funktionalität

und Sicherheit von Vektoren für die gentherapeutische Behandlung zu beurteilen, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden.

Häufig wird in Studien die Polyklonalität der T-Zellen durch die Analyse des *TCR rearrangements* überprüft. Eine polyklonale T-Zellpopulation ist in der Lage ein vielfältiges und funktionales Repertoire an Antigenrezeptoren zu erzeugen [194]. Dieses kann über eine PCR mit Primern spezifisch für die konstanten und variablen Regionen der TCR-Ketten nachgewiesen und nach anschließender Sequenzierung in charakteristischen *Peak*-Mustern dargestellt werden [195].

Eine mehrfach beschriebene Möglichkeit um die Rekonstitution der humoralen Immunantwort und damit die Funktionalität von B-Zellen zu überprüfen, ist die Detektion spezifischer Antikörper (z. B. IgG, IgG1 und IgG2a) im Serum gentherapeutisch behandelter Mäuse durch einen sog. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) [77,105,131].

Da in der vorliegenden Arbeit vor allem ein Effekt im zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Zellkompartiment zu beobachten war, könnte eine Untersuchung der zytolytischen Aktivität der CTLs *in vitro*, der sog. CTL-Assay durchgeführt werden [196].

Bei der Analyse der Thymusdrüsen aus den behandelten Versuchstieren konnte bei einer Maus der Genfallen-Gruppe eine markante Anreicherung von *IL2RG*<sup>+</sup>-T-Zellen beobachtet werden. Dies war wahrscheinlich aufgrund einer Aktivierung des Immunsystems durch eine asymptomatische Infektion möglich. Eine vergleichbare Induktion einer Immunantwort kann auch durch Verabreichung von Toxinen artifiziell erreicht werden. Huston *et al.* ermittelten die Antikörper-spezifische T-Zell-abhängige Immunantwort nach mehrmaliger Gabe von Tetanustoxoid und die T-Zell-unabhängige Immunantwort nach einmaliger Gabe von Pneumokokken-Antigenen mit Hilfe eines Serum-ELISA [194]. Diese Herausforderung an das Immunsystem der Mäuse könnte im Kontext der Genfallen-Vektoren zu einer vermehrten Bildung reaktiver T-Zellen und damit zu einer verbesserten *in vivo* Selektion führen.

Bei der Beurteilung der Sicherheit eines viralen Vektors spielt sein genotoxisches Potential und damit das Risiko des klonalen Auswachsens eines dominanten Klons durch Insertionsmutagenese eine wichtige Rolle. Es besteht die Möglichkeit *in vitro* durch einen standardisierten Immortalisationsansatz, dem sog. IVIM (*in vitro immortalization assay*, IVIM) die klonale Dominanz nach Transduktion mit viralen Vektoren zu bestimmen [197]. Damit könnte der Genfallen-Vektor im Vergleich zu einem Promotor-getriebenen Vektor analysiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Vorarbeiten in diese Richtung durchgeführt (Daten nicht gezeigt), die jedoch noch keine klare Aussage zuließen. Für diesen standardisierten Test stellt die geringe Effizienz der Genfallen-Vektoren erneut ein Hindernis dar, welches einer intensiven Optimierung bedarf.

Die anfängliche Hypothese bestand darin, durch Genfallen-Vektoren eine physiologische Genexpression ohne das Risiko einer onkogenen Transaktivierung aufgrund eines exogenen Promotors zu erzielen, um somit ein sichereres Werkzeug für die Gentherapie zu entwickeln. Jedoch konnte in mehreren Experimenten gezeigt werden, dass Genfallen-Vektoren eine sehr viel geringere Effizienz als Vektoren mit internem Promotor ausweisen. Es wurden unterschiedliche Ansätze unternommen, um eine Selektion der produktiven Integrationen zu erreichen. Doch weder durch die gewählten *in vitro* Selektionsmethoden, noch durch den erhofften stärkeren natürlichen Selektionsvorteil *in vivo* war es möglich, eine ausreichende Anzahl an positiven Zellen und einer damit verbundene Rekonstitution zu gewährleisten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und der daraus gewonnenen Resultate, Genfallen-Vektoren zu diesem Zeitpunkt keine geeignete Alternative für die gentherapeutische Behandlung monogener Erkrankungen darstellen. Es existiert jedoch eine Vielzahl an ambitionierten Alternativen und innovativen Technologien (vgl. Kapitel 5.3, „*Genome Editing*“), denen eine aussichtsreiche Zukunft im Feld der Gentherapie vorhergesagt wird.



---

## Literaturverzeichnis

1. Finch CA, Harker LA, Cook JD (1977) Kinetics of the formed elements of human blood. *Blood* 50 (4): 699–707.
2. Chotinantakul K, Leeanansaksiri W (2012) Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone marrow research* 2012: 270425.
3. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97 (11): 3333–3341.
4. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J et al. (1991) Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 77 (8): 1717–1722.
5. Ogawa M (2002) Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Experimental hematology* 30 (1): 3–6.
6. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7): 2804–2808.
7. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I et al. (2011) Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science (New York, N.Y.)* 333 (6039): 218–221.
8. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (10): 5320–5325.
9. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM (1995) A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86 (10): 3745–3753.
10. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM (1993) Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* 82 (9): 2664–2672.
11. Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 4 (1): 11–22.
12. Janeway CA (2001) How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (13): 7461–7468.
13. Murphy KP, Travers P, Walport MJ (2014) *Janeway Immunologie*. Berlin, Berlin u. a.: Springer Spektrum. 1093 p.
14. Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357 (9270): 1777–1789.

15. Lodoen MB, Lanier LL (2005) Viral modulation of NK cell immunity. *Nature reviews. Microbiology* 3 (1): 59–69.
16. Boehm T, Swann JB (2014) Origin and evolution of adaptive immunity. *Annual review of animal biosciences* 2: 259–283.
17. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B, Nagasawa T (2004) Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20 (6): 707–718.
18. Nagasawa T (2006) Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature reviews. Immunology* 6 (2): 107–116.
19. Di Santo, J P, Rodewald HR (1998) In vivo roles of receptor tyrosine kinases and cytokine receptors in early thymocyte development. *Current opinion in immunology* 10 (2): 196–207.
20. Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, Visan I, Guidos CJ (2010) Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annual review of immunology* 28: 343–365.
21. Labrecque N, Baldwin T, Lesage S (2011) Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection. *Immunology and cell biology* 89 (1): 16–26.
22. O'Brien RL, Born WK (2015) Dermal  $\gamma \delta$  T cells - What have we learned. *Cellular immunology*.
23. Terabe M, Berzofsky JA (2007) NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends in immunology* 28 (11): 491–496.
24. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, van Eden W (2011) A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. In: Nijkamp F, Parnham MJ, editors. *Principles of Immunopharmacology*. Basel: Birkhäuser Basel. pp. 15–27.
25. Mukherjee S, Thrasher AJ (2013) Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. *Gene* 525 (2): 174–181.
26. Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M (2013) Gene therapy on the move. *EMBO molecular medicine* 5 (11): 1642–1661.
27. Qasim W, Gaspar HB, Thrasher AJ (2009) Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies. *Gene therapy* 16 (11): 1285–1291.
28. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Boyle J, Curnutte J et al. (2000) Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine* 79 (3): 155–169.
29. Grez M, Reichenbach J, Schwäble J, Seger R, Dinauer MC et al. (2011) Gene therapy of chronic granulomatous disease: the engraftment dilemma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (1): 28–35.
30. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B et al. (2010) Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nature medicine* 16 (2): 198–204.



31. Badour K, Zhang J, Siminovitch KA (2003) The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation. *Immunological reviews* 192: 98–112.
32. Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A, Witzel M, Schwarzer A et al. (2014) Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome—long-term efficacy and genotoxicity. *Science translational medicine* 6 (227): 227ra33.
33. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP et al. (2013) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science (New York, N.Y.)* 341 (6148): 1233151.
34. Buckley RH (2004) Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annual review of immunology* 22: 625–655.
35. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T et al. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science (New York, N.Y.)* 270 (5235): 475–480.
36. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B et al. (2009) Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *The New England journal of medicine* 360 (5): 447–458.
37. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Zhang F et al. (2011) Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Science translational medicine* 3 (97): 97ra80.
38. Candotti F, Shaw KL, Muul L, Carbonaro D, Sokolic R et al. (2012) Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood* 120 (18): 3635–3646.
39. Puck JM, Deschênes SM, Porter JC, Dutra AS, Brown CJ et al. (1993) The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency, SCIDX1. *Human molecular genetics* 2 (8): 1099–1104.
40. Liao W, Lin J, Leonard WJ (2013) Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 38 (1): 13–25.
41. Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A (2005) Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annual review of medicine* 56: 585–602.
42. Leonard WJ (1996) The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annual review of medicine* 47: 229–239.
43. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM (1997) Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (7): 3168–3171.
44. Malek TR, Castro I (2010) Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33 (2): 153–165.

45. Gilmour KC, Fujii H, Cranston T, Davies EG, Kinnon C et al. (2001) Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood* 98 (3): 877–879.
46. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ (1998) Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nature genetics* 20 (4): 394–397.
47. Leonard WJ (2001) Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nature reviews. Immunology* 1 (3): 200–208.
48. Puck JM, Pepper AE, Henthorn PS, Candotti F, Isakov J et al. (1997) Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 89 (6): 1968–1977.
49. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y et al. (1994) Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science (New York, N.Y.)* 266 (5187): 1045–1047.
50. Friedmann MC, Migone TS, Russell SM, Leonard WJ (1996) Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (5): 2077–2082.
51. Liao W, Lin J, Wang L, Li P, Leonard WJ (2011) Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nature immunology* 12 (6): 551–559.
52. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z et al. (2007) Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26 (3): 371–381.
53. Ballesteros-Tato A, León B, Graf BA, Moquin A, Adams PS et al. (2012) Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 36 (5): 847–856.
54. Lin JX, Leonard WJ (2000) The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 19 (21): 2566–2576.
55. Geng X, Zhang R, Yang G, Jiang W, Xu C (2012) Interleukin-2 and autoimmune disease occurrence and therapy. *European review for medical and pharmacological sciences* 16 (11): 1462–1467.
56. Malek TR, Bayer AL (2004) Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature reviews. Immunology* 4 (9): 665–674.
57. Büning H (2013) Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey. *EMBO molecular medicine* 5 (1): 1–3.
58. Maetzig T, Galla M, Baum C, Schambach A (2011) Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses* 3 (6): 677–713.
59. Schroder AR, Shinn P, Chen HM, Berry C, Ecker, JR et al. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110 (4): 521–529.

60. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M (2010) 20 years of gene therapy for SCID. *Nature immunology* 11 (6): 457–460.
61. Hirschhorn R, Yang DR, Puck JM, Huie ML, Jiang C et al. (1996) Spontaneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nature genetics* 13 (3): 290–295. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/ng0796-290>.
62. Stephan V, Wahn V, Le Deist F, Dirksen U, Broker B et al. (1996) Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells. *The New England journal of medicine* 335 (21): 1563–1567.
63. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP et al. (2010) Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 363 (4): 355–364.
64. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile, G, Gross F, Yvon E et al. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science (New York, N.Y.)* 288 (5466): 669–672.
65. Hacein-Bey S, Basile GD, Lemerle J, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (1998) gammac gene transfer in the presence of stem cell factor, FLT-3L, interleukin-7 (IL-7), IL-1, and IL-15 cytokines restores T-cell differentiation from gammac(-) X-linked severe combined immunodeficiency hematopoietic progenitor cells in murine fetal thymic organ cultures. *Blood* 92 (11): 4090–4097.
66. Soudais C, Shiho T, Sharara LI, Guy-Grand D, Taniguchi T et al. (2000) Stable and functional lymphoid reconstitution of common cytokine receptor gamma chain deficient mice by retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 95 (10): 3071–3077.
67. Otsu M, Anderson SM, Bodine DM, Puck JM, O'Shea JJ et al. (2000) Lymphoid development and function in X-linked severe combined immunodeficiency mice after stem cell gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 1 (2): 145–153.
68. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Adams S et al. (2011) Long-term persistence of a polyclonal T cell repertoire after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Science translational medicine* 3 (97): 97ra79.
69. Fischer A, Hacein-Bey Abina S, Touzot F, Cavazzana M (2015) Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Clinical genetics*.
70. Thrasher AJ, Hacein-Bey-Abina S, Gaspar HB, Blanche S, Davies EG et al. (2005) Failure of SCID-X1 gene therapy in older patients. *Blood* 105 (11): 4255–4257.
71. Chinen J, Davis J, De Ravin, Suk See, Hay BN, Hsu AP et al. (2007) Gene therapy improves immune function in preadolescents with X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 110 (1): 67–73.
72. Cicalese MP, Aiuti A (2015) Clinical Applications of Gene Therapy for Primary Immunodeficiencies. *Human gene therapy* 26 (4): 210–219.

73. Schmidt M, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Zaoui K, Ball C et al. (2007) High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nature methods* 4 (12): 1051–1057.
74. Pannell D, Ellis J (2001) Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors. *Reviews in medical virology* 11 (4): 205–217.
75. Santilli G, Almarza E, Brendel C, Choi U, Beilin C et al. (2011) Biochemical correction of X-CGD by a novel chimeric promoter regulating high levels of transgene expression in myeloid cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (1): 122–132.
76. Hacein-Bey-Abina S, Pai S, Gaspar HB, Armant M, Berry CC et al. (2014) A modified  $\gamma$ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 371 (15): 1407–1417.
77. Thornhill SI, Schambach A, Howe SJ, Ulaganathan M, Grassman E et al. (2008) Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *MOLECULAR THERAPY* 16 (3): 590–598.
78. Zychlinski D, Schambach A, Modlich U, Maetzig T, Meyer J et al. (2008) Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (4): 718–725.
79. De Ravin, S. S., Choi U, Theobald N, Lee J, Wang H et al. (2013) Lentiviral gene transfer for treatment of children >2 years old with X-linked severe combined immunodeficiency. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* (21): S118.
80. Friedrich G, Soriano P (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & development* 5 (9): 1513–1523.
81. Schnütgen F, Ehrmann F, Ruiz-Noppinger P, Melchner H von (2011) High throughput gene trapping and postinsertional modifications of gene trap alleles. *Methods (San Diego, Calif.)* 53 (4): 347–355.
82. Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP (2001) Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nature reviews. Genetics* 2 (10): 756–768.
83. Schebelle L, Wolf C, Stribl C, Javaheri T, Schnütgen F et al. (2010) Efficient conditional and promoter-specific in vivo expression of cDNAs of choice by taking advantage of recombinase-mediated cassette exchange using FLEX gene traps. *Nucleic acids research* 38 (9): e106.
84. De-Zolt S, Altschmied J, Ruiz P, Melchner H von, Schnütgen F (2009) Gene-trap vectors and mutagenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 530: 29–47.
85. Mueller PR, Wold B (1989) In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science (New York, N.Y.)* 246 (4931): 780–786.

86. Laufs S, Gentner B, Nagy KZ, Jauch A, Benner A et al. (2003) Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* 101 (6): 2191–2198.
87. Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Ozawa K (2002) Selective expansion of transduced cells for hematopoietic stem cell gene therapy. *INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY* 76 (4): 299–304.
88. Jin L, Zeng H, Chien S, Otto KG, Richard RE et al. (2000) In vivo selection using a cell-growth switch. *Nature genetics* 26 (1): 64–66.
89. Zeng H, Masuko M, Jin LQ, Neff T, Otto KG et al. (2001) Receptor specificity in the self-renewal and differentiation of primary multipotential hemopoietic cells. *Blood* 98 (2): 328–334.
90. Neff T, Horn PA, Valli VE, Gown AM, Wardwell S et al. (2002) Pharmacologically regulated in vivo selection in a large animal. *Blood* 100 (6): 2026–2031.
91. Okazuka K, Beard BC, Emery DW, Schwarzwaelder K, Spector MR et al. (2011) Long-term regulation of genetically modified primary hematopoietic cells in dogs. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (7): 1287–1294.
92. Belay E, Miller CP, Kortum AN, Torok-Storb B, Blau CA et al. (2015) A hyperactive Mpl-based cell growth switch drives macrophage-associated erythropoiesis through an erythroid-megakaryocytic precursor. *Blood* 125 (6): 1025–1033.
93. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL et al. (1995) Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2 (3): 223–238.
94. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X et al. (1995) Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nature genetics* 9 (2): 202–209.
95. Palacios R, Steinmetz M (1985) IL3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* 41 (3): 727–734.
96. Kumaki S, Ishii N, Minegishi M, Tsuchiya S, Cosman D et al. (1999) Functional role of interleukin-4 (IL-4) and IL-7 in the development of X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 93 (2): 607–612.
97. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36 (1): 59–74.
98. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW et al. (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330 (6148): 576–578.

99. Tucker KA, Lilly MB, Heck L, Rado TA (1987) Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* 70 (2): 372–378.
100. Zhen L, King AA, Xiao Y, Chanock SJ, Orkin SH et al. (1993) Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (21): 9832–9836.
101. Hartley JW, Rowe WP (1975) Clonal cells lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses. *Virology* 65 (1): 128–134.
102. Nolan GP (1996) Phoenix helper-free retrovirus producer lines. Available: <http://web.stanford.edu/group/nolan/index.html>.
103. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18): 8392–8396.
104. Segura MM, Garnier A, Durocher Y, Coelho H, Kamen A (2007) Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification. *Biotechnology and bioengineering* 98 (4): 789–799.
105. Almarza E, Zhang F, Santilli G, Blundell MP, Howe SJ et al. (2011) Correction of SCID-X1 using an enhancerless Vav promoter. *Human gene therapy* 22 (3): 263–270.
106. Zhang CC, Lodish HF (2005) Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during ex vivo expansion. *Blood* 105 (11): 4314–4320.
107. Hacein-Bey-Abina S, Kalle C von, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N et al. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science (New York, N.Y.)* 302 (5644): 415–419.
108. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M et al. (2008) Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of clinical investigation* 118 (9): 3143–3150.
109. Mukherjee S, Thrasher AJ (2011) Progress and prospects: advancements in retroviral vector design, generation, and application. *Human gene therapy* 22 (10): 1171–1174.
110. Romano G (2012) Development of safer gene delivery systems to minimize the risk of insertional mutagenesis-related malignancies: a critical issue for the field of gene therapy. *ISRN oncology* 2012: 616310.
111. Moiani A, Miccio A, Rizzi E, Severgnini M, Pellin D et al. (2013) Deletion of the LTR Enhancer/Promoter Has No Impact on the Integration Profile of MLV Vectors in Human Hematopoietic Progenitors. *PloS one* 8 (1).
112. Minskaia E, Ryan MD (2013) Protein coexpression using FMDV 2A: effect of "linker" residues. *BioMed research international* 2013: 291730.

113. Kim JH, Lee S, Li L, Park H, Park J et al. (2011) High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS ONE* 6 (4): e18556.
114. Gebauer M, Melchner H von, Beckers T (2001) Genomewide trapping of genes that encode secreted and transmembrane proteins repressed by oncogenic signaling. *Genome Res.* 11 (11): 1871–1877.
115. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108 (2): 193–199.
116. Mayo LA, Curnutte JT (1990) Kinetic microplate assay for superoxide production by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods in enzymology* 186: 567–575.
117. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U et al. (2006) Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nature medicine* 12 (4): 401–409.
118. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402–408.
119. Williams S, Mustoe T, Mulcahy T, Griffiths M, Simpson D et al. (2005) CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC biotechnology* 5: 17.
120. Zhang F, Frost AR, Blundell MP, Bales O, Antoniou MN et al. (2010) A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (9): 1640–1649.
121. Pfaff N, Lachmann N, Ackermann M, Kohlscheen S, Brendel C et al. (2013) A ubiquitous chromatin opening element prevents transgene silencing in pluripotent stem cells and their differentiated progeny. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31 (3): 488–499.
122. Jin L, Siritanaratkul N, Emery DW, Richard RE, Kaushansky K et al. (1998) Targeted expansion of genetically modified bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (14): 8093–8097.
123. Richard RE, Wood B, Zeng H, Jin L, Papayannopoulou T et al. (2000) Expansion of genetically modified primary human hemopoietic cells using chemical inducers of dimerization. *Blood* 95 (2): 430–436.
124. Richard RE, De Claro, R Angelo, Yan J, Chien S, Recum H von et al. (2004) Differences in F36VMpl-based in vivo selection among large animal models. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 10 (4): 730–740.
125. Blau CA, Peterson KR, Drachman JG, Spencer DM (1997) A proliferation switch for genetically modified cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (7): 3076–3081.

126. Whitney ML, Otto KG, Blau CA, Reinecke H, Murry CE (2001) Control of myoblast proliferation with a synthetic ligand. *The Journal of biological chemistry* 276 (44): 41191–41196.
127. Jin L, Asano H, Blau CA (1998) Stimulating cell proliferation through the pharmacologic activation of c-kit. *Blood* 91 (3): 890–897.
128. Kacherovsky N, Harkey MA, Blau CA, Giachelli CM, Pun SH (2012) Combination of Sleeping Beauty transposition and chemically induced dimerization selection for robust production of engineered cells. *Nucleic acids research* 40 (11): e85.
129. Lanza AM, Kim DS, Alper HS (2013) Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells. *Biotechnology journal* 8 (7): 811–821.
130. Kowarz E, Löscher D, Marschalek R (2015) Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnology journal* 10 (4): 647–653.
131. Ginn SL, Liao, Sophia H. Y., Dane AP, Hu M, Hyman J et al. (2010) Lymphomagenesis in SCID-X1 Mice Following Lentivirus-mediated Phenotype Correction Independent of Insertional Mutagenesis and gamma c Overexpression. *MOLECULAR THERAPY* 18 (5): 965–976.
132. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL (2007) Humanized mice in translational biomedical research. *Nature reviews. Immunology* 7 (2): 118–130.
133. Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun S et al. (2013) Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PloS one* 8 (8): e71594.
134. Cattoglio C, Pellin D, Rizzi E, Maruggi G, Corti G et al. (2010) High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood* 116 (25): 5507–5517.
135. Cattoglio C, Facchini G, Sartori D, Antonelli A, Miccio A et al. (2007) Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 110 (6): 1770–1778.
136. Gijssbers R, Ronen K, Vets S, Malani N, Rijck J de et al. (2010) LEDGF hybrids efficiently retarget lentiviral integration into heterochromatin. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (3): 552–560.
137. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A et al. (1993) A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365 (6447): 666–669.
138. Yamaguchi T, Morikawa A, Miyoshi H (2012) Comparison of gene-trapping efficiency between retroviral and lentiviral vectors in mouse embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 425 (2): 297–303.
139. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5): 861–872.



140. Herbst F, Ball CR, Tuorto F, Nowrouzi A, Wang W et al. (2012) Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (5): 1014–1021.
141. Hotta A, Ellis J (2008) Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *Journal of cellular biochemistry* 105 (4): 940–948.
142. Wolf D, Goff SP (2009) Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature* 458 (7242): 1201–1204.
143. Wolf D, Goff SP (2007) TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 131 (1): 46–57.
144. Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ (2002) HoxB4 Confers Definitive Lymphoid-Myeloid Engraftment Potential on Embryonic Stem Cell and Yolk Sac Hematopoietic Progenitors. *Cell* 109 (1): 29–37.
145. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H et al. (2013) Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (7): 1424–1431.
146. Kodama H, Nose M, Niida S, Nishikawa S (1994) Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Experimental hematology* 22 (10): 979–984.
147. Holmes R, Zúñiga-Pflücker JC (2009) The OP9-DL1 system: generation of T-lymphocytes from embryonic or hematopoietic stem cells in vitro. *Cold Spring Harbor protocols* 2009 (2): pdb.prot5156.
148. Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Bartholomae CC et al. (2009) The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *The Journal of clinical investigation* 119 (4): 964–975.
149. Heckl D, Schwarzer A, Haemmerle R, Steinemann D, Rudolph C et al. (2012) Lentiviral vector induced insertional haploinsufficiency of Ebf1 causes murine leukemia. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (6): 1187–1195.
150. Lukin K, Fields S, Lopez D, Cherrier M, Ternyak K et al. (2010) Compound haploinsufficiencies of Ebf1 and Runx1 genes impede B cell lineage progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (17): 7869–7874.
151. Heltemes-Harris LM, Willette, Mark J L, Ramsey LB, Qiu YH, Neeley ES et al. (2011) Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of experimental medicine* 208 (6): 1135–1149.

152. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K et al. (2010) Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature* 467 (7313): 318–322.
153. Cleynen I, Van de Ven, Wim J M (2008) The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *International journal of oncology* 32 (2): 289–305.
154. Payne SR, Kemp CJ (2005) Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* 26 (12): 2031–2045.
155. Hake CR, Graubert TA, Fenske TS (2007) Does autologous transplantation directly increase the risk of secondary leukemia in lymphoma patients. *Bone marrow transplantation* 39 (2): 59–70.
156. Moiani A, Suerth JD, Gandolfi F, Rizzi E, Severgnini M et al. (2014) Genome-wide analysis of alpharetroviral integration in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Genes* 5 (2): 415–429.
157. Kaufmann KB, Brendel C, Suerth JD, Mueller-Kuller U, Chen-Wichmann L et al. (2013) Alpharetroviral vector-mediated gene therapy for X-CGD: functional correction and lack of aberrant splicing. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (3): 648–661.
158. Suerth JD, Maetzig T, Brugman MH, Heinz N, Appelt J et al. (2012) Alpharetroviral Self-inactivating Vectors: Long-term Transgene Expression in Murine Hematopoietic Cells and Low Genotoxicity. *MOLECULAR THERAPY* 20 (5): 1022–1032.
159. Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadts-Humme S, Hallek M (2008) Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The journal of gene medicine* 10 (7): 717–733.
160. Bainbridge, James W B, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R et al. (2008) Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* 358 (21): 2231–2239.
161. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB et al. (2008) Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Human gene therapy* 19 (10): 979–990.
162. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F et al. (2008) Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* 358 (21): 2240–2248.
163. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P et al. (2007) Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet (London, England)* 369 (9579): 2097–2105.

164. Leone P, Shera D, McPhee, Scott W J, Francis JS, Kolodny EH et al. (2012) Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Science translational medicine* 4 (165): 165ra163.
165. Kratlian RG, Hajjar RJ (2012) Cardiac gene therapy: from concept to reality. *Current heart failure reports* 9 (1): 33–39.
166. Tilemann L, Ishikawa K, Weber T, Hajjar RJ (2012) Gene therapy for heart failure. *Circulation research* 110 (5): 777–793.
167. Ackermann M, Lachmann N, Hartung S, Eggenschwiler R, Pfaff N et al. (2014) Promoter and lineage independent anti-silencing activity of the A2 ubiquitous chromatin opening element for optimized human pluripotent stem cell-based gene therapy. *Biomaterials* 35 (5): 1531–1542.
168. Müller-Kuller U, Ackermann M, Kolodziej S, Brendel C, Fritsch J et al. (2015) A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic acids research* 43 (3): 1577–1592.
169. Saunders F, Sweeney B, Antoniou MN, Stephens P, Cain K (2015) Chromatin function modifying elements in an industrial antibody production platform--comparison of UCOE, MAR, STAR and cHS4 elements. *PloS one* 10 (4): e0120096.
170. Heng, Henry H Q, Goetze S, Ye CJ, Liu G, Stevens JB et al. (2004) Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *Journal of cell science* 117 (Pt 7): 999–1008.
171. Barkess G, West AG (2012) Chromatin insulator elements: establishing barriers to set heterochromatin boundaries. *Epigenomics* 4 (1): 67–80.
172. Benabdellah K, Gutierrez-Guerrero A, Cobo M, Muñoz P, Martín F (2014) A chimeric HS4-SAR insulator (IS2) that prevents silencing and enhances expression of lentiviral vectors in pluripotent stem cells. *PloS one* 9 (1): e84268.
173. Uchida N, Washington KN, Lap CJ, Hsieh MM, Tisdale JF (2011) Chicken HS4 insulators have minimal barrier function among progeny of human hematopoietic cells transduced with an HIV1-based lentiviral vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (1): 133–139.
174. Nielsen TT, Jakobsson J, Rosenqvist N, Lundberg C (2009) Incorporating double copies of a chromatin insulator into lentiviral vectors results in less viral integrants. *BMC biotechnology* 9: 13.
175. Urbinati F, Arumugam P, Higashimoto T, Perumbeti A, Mitts K et al. (2009) Mechanism of reduction in titers from lentivirus vectors carrying large inserts in the 3'LTR. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (9): 1527–1536.
176. Cox, David Benjamin Turitz, Platt RJ, Zhang F (2015) Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine* 21 (2): 121–131.

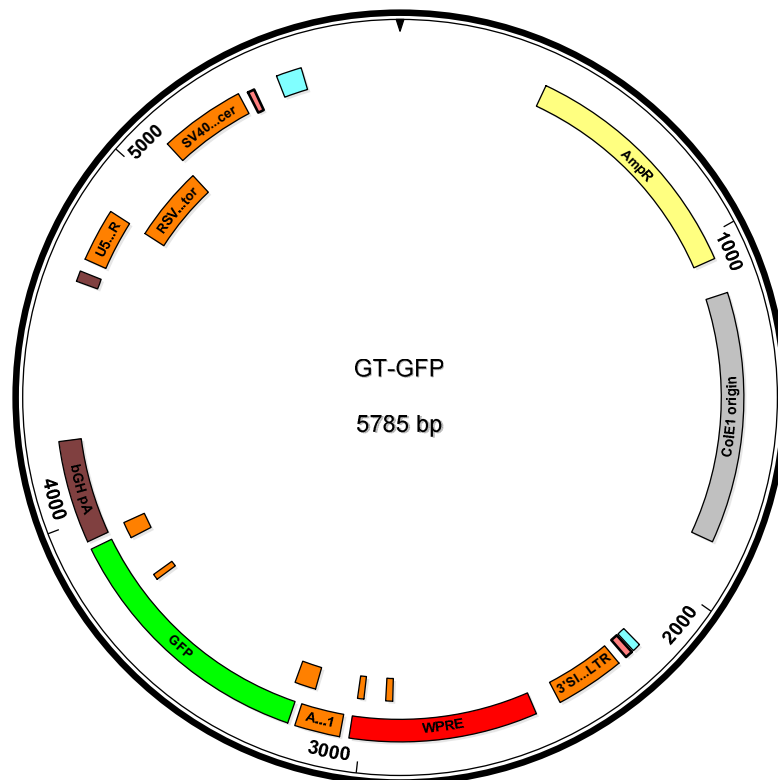
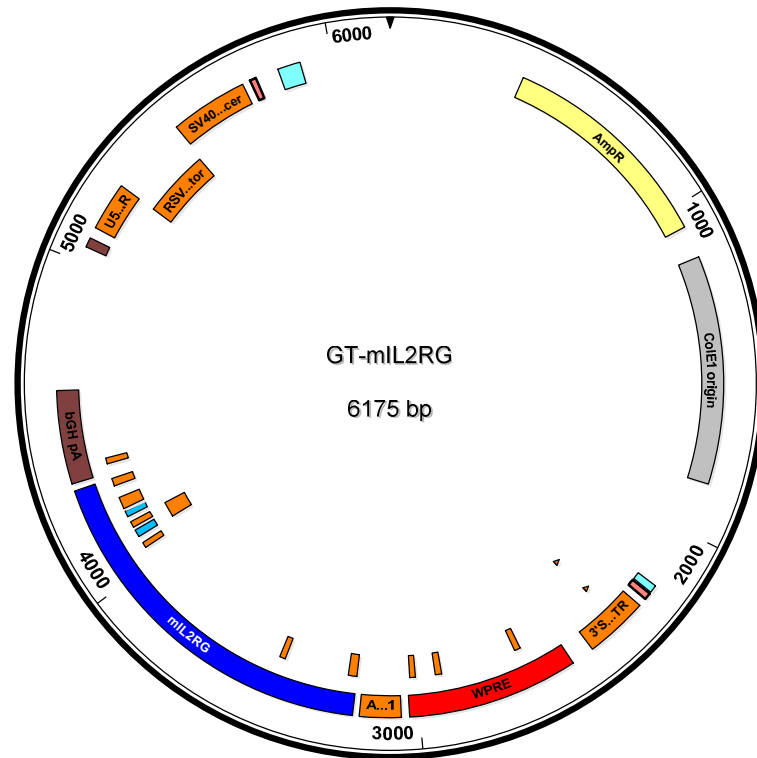
177. Orr HT, Zoghbi HY (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30: 575–621.
178. Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD (2012) Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nature reviews. Cancer* 12 (1): 51–58.
179. Ott de Bruin, Lisa M, Volpi S, Musunuru K (2015) Novel Genome-Editing Tools to Model and Correct Primary Immunodeficiencies. *Frontiers in immunology* 6: 250.
180. Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M et al. (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology* 27 (9): 851–857.
181. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P et al. (2011) An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nature biotechnology* 29 (9): 816–823.
182. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR (2011) Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature methods* 8 (9): 765–770.
183. Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee Y et al. (2007) Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nature biotechnology* 25 (11): 1298–1306. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1353>.
184. Genovese P, Schirotti G, Escobar G, Di Tomaso T, Firrito C et al. (2014) Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* 510 (7504): 235–240.
185. Urnov FD, Miller JC, Lee Y, Beausejour CM, Rock JM et al. (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature <London>* 435 (7042): 646–651. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/nature03556>.
186. Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science (New York, N.Y.)* 333 (6051): 1843–1846.
187. Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z et al. (2014) Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell stem cell* 15 (1): 12–13.
188. Suzuki K, Yu C, Qu J, Li M, Yao X et al. (2014) Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell stem cell* 15 (1): 31–36.
189. Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T et al. (2011) A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic acids research* 39 (21): 9283–9293.
190. Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, Morio T, Takada S et al. (2014) Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into IL2RG locus. *Scientific reports* 4: 5043.

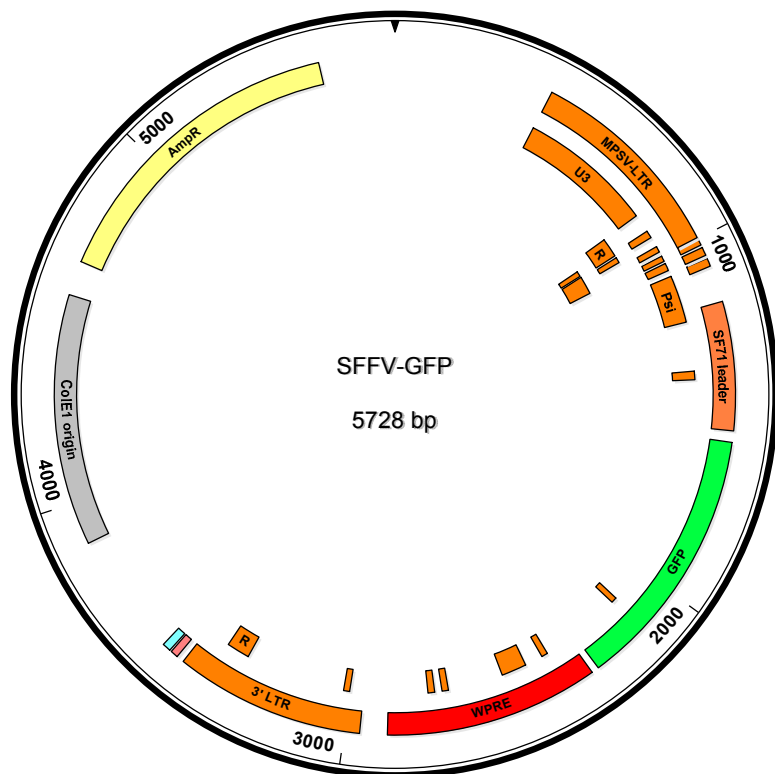
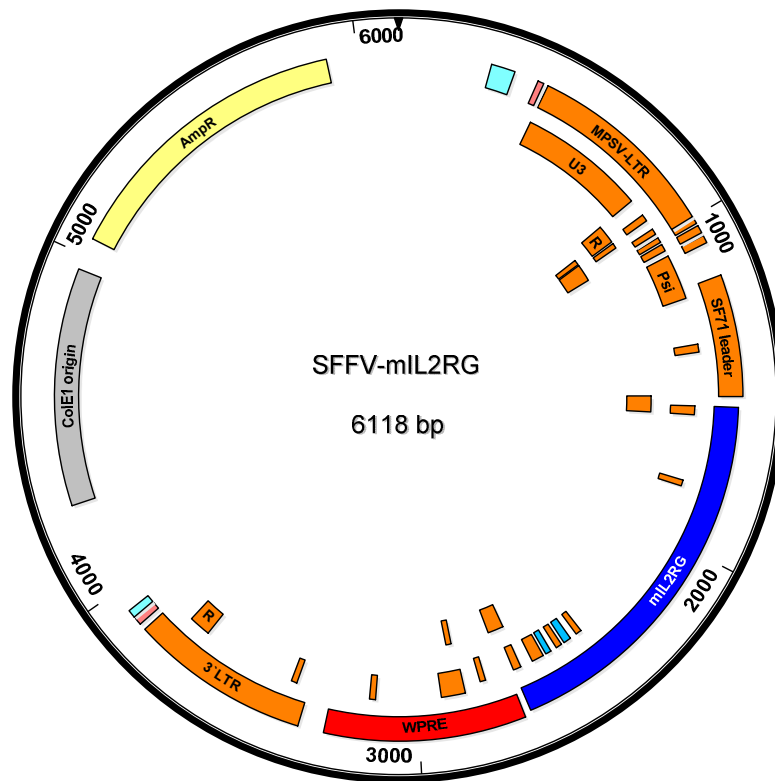
191. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (New York, N.Y.) 337 (6096): 816–821.
192. Kucsu C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M (2014) Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature biotechnology* 32 (7): 677–683.
193. Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD et al. (2014) Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature biotechnology* 32 (7): 670–676.
194. Huston MW, van Til, Niek P, Visser TP, Arshad S, Brugman MH et al. (2011) Correction of murine SCID-X1 by lentiviral gene therapy using a codon-optimized IL2RG gene and minimal pretransplant conditioning. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (10): 1867–1877.
195. Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zöller M et al. (1993) The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (9): 4319–4323.
196. Hung CF, Cheng WF, Hsu KF, Chai CY, He L et al. (2001) Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer research* 61 (9): 3698–3703.
197. Modlich U, Bohne J, Schmidt M, Kalle C von, Knöss S et al. (2006) Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 108 (8): 2545–2553.



## Anhang

## Plasmidkarten







## Abkürzungsverzeichnis

AAV	<i>adeno-associated virus</i>
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosin-Desaminase
AK	Antikörper
APC	<i>antigen-presenting cells</i>
as	<i>antisense</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
bGH	<i>bovine growth hormone</i>
bp	Basenpaar
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Oberflächenmarker
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CEO	Fusion des Neomycin-Resistenzgens mit dem humanen CD2
CGD	<i>chronic granulomatous disease</i> , septische Granulomatose
CID	<i>chemical inducer of dimerization</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CMV	Cytomegalievirus
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine 12</i>
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	<i>double negative</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	<i>double positive</i>
DSB	Doppelstrangbruch
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ES	embryonale Stammzelle
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell-sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	Fötale Kälberserum
Flt3L	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
for	<i>forward</i>
FSC	<i>forwardscatter</i>
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
GALV	<i>gibbon ape leukemia virus</i>
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GGTC	<i>German Gene Trap Consortium</i>
GOI	<i>gene of interest</i> , Therapiegen
GT	<i>gene trap</i> , Genfalle

Gy	Gray
hcoIL2RG	codon-optimierte Variante des humanen <i>IL2RG</i>
HDR	<i>homology-directed repair</i>
hIL-11	humanes Interleukin-11
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IL2RG	Interleukin-2-Rezeptor- $\gamma$ , <i>common gamma chain</i> ( $\gamma c$ )
IL-7	Interleukin-7
iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IVIM	<i>in vitro immortalization assay</i>
JAK3	Janus-Kinase-3
kb	Kilobasenpaar
KM	Knochenmark
KO	Knock-out
LEDGF	<i>lens epithelium-derived growth factor</i>
Lin <sup>-</sup>	Linienmarker negativ
LMO2	<i>LIM domain only 2</i>
LM-PCR	<i>ligation mediated</i> Polymerase-Kettenreaktion
LT	<i>long term</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LV	lentiviraler Vektor
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MEP	<i>megakaryocyte-erythroid progenitor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mIL2RG	murines <i>IL2RG</i>
mIL-3	murines Interleukin-3
MPP	<i>multipotent progenitors</i>
MuLV	<i>murine leukemia virus</i>
NADPH	Nikotinamid-Dinukleotidphosphat
NEO	Neomycinresistenzgen
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NK	Natürliche Killerzelle
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
pA	Polyadenylierungssequenz
PB	peripheres Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PEI	Polyethylenimin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
rev	<i>reverse</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rotationen pro Minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	reverse Transkription
s	<i>sense</i>
S/MARs	<i>scaffold or matrix attachment regions</i>
SA	Spleißakzeptor
Sca-1	Stammzellantigen-1
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	Spleißdonor
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFEM	serumfreies Medium
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
SIN	<i>self-inactivating</i>
SRY	<i>sex determining region on Y-chromosome</i>
SSC	<i>sidescatter</i>
ST	short-term
STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription-5</i>
T2A	2A Peptid des <i>Thosea asigna</i> Virus
Tab.	Tabelle
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i>
T-ALL	akute T-Zell Leukämie
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tpl	Transplantation
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TSS	Transkriptionsstartstelle
TU	<i>transducing units</i>
UCOE	<i>ubiquitous chromatin opening element</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
VCN	<i>vector copy number</i>
VSV-G	Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
WT	Wildtyp
ZFN	Zinkfinger nuklease



## Kongressbeiträge

**Carolin Nowak**, Stephan Schultze-Strasser, Frank Schnütgen, Linping Chen-Wichmann, Stefan Stein, Manuel Grez und Harald von Melchner. *Development of a gene trap gene therapy approach enabling the inducible expansion of genetically modified hematopoietic precursor cells*. Posterpräsentation, 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DGGT), März 2012, Frankfurt am Main

**Carolin Nowak**, Frank Schnütgen, Manuel Grez und Harald von Melchner. *Gene trap vectors as an alternative gene therapy approach correcting X-linked severe combined immunodeficiency*. Posterpräsentation, 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DGGT), März 2014, Ulm

**Carolin Nowak**. *Development of gene trap vectors as an alternative gene therapy approach correcting monogenic blood disorders*. Vortrag, LOEWE/CGT Summer School, September 2014, Bad Nauheim



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Molekulare Hämatologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Harald von Melchner am Universitätsklinikum der Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Harald von Melchner für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Mit seiner fachlichen Betreuung und den wertvollen Ratschlägen hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Rolf Marschalek danke ich herzlich für die offizielle Betreuung dieser extern durchgeführten Arbeit sowie seiner konstruktiven Diskussionsbereitschaft.

Für die engagierte Betreuung im Labor und hilfreiche thematische Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. Frank Schnütgen bedanken. Dies gilt ebenso für Dr. Stephan Schultze-Strasser, der mir besonders zu Beginn immer beratend zur Seite stand und durch dessen Vorarbeiten diese Arbeit erst ermöglicht wurde.

Ich bedanke mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG von Melchner für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, besonders bei Julia Mühl, Dr. Ana Tomasovic und Duran Sürün. Dr. Olesya Vakhrusheva danke ich sehr herzlich für ihre Hilfsbereitschaft bei den Transplantationsversuchen. Zudem danke ich allen Mitarbeitern der Molekularen Hämatologie, insbesondere Maria Viel, dem Herzstück der Arbeitsgruppe, für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung in jeder Situation.

Dr. Manuel Grez danke ich für eine hervorragende Kooperation und thematische Betreuung während meiner Zeit am Georg-Speyer-Haus. Bei der kompletten AG Grez möchte ich mich sehr herzlich für die zahlreichen Diskussionen und äußerst hilfreiche Unterstützung bedanken, insbesondere bei Dr. Stefan Stein, Dr. Isabell Qualigano-Lo Coco und Dr. Joachim Schwäble.

Bei Hana Kunkel möchte ich mich ganz besonders für ihre liebevolle Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen bedanken, mit der sie einen wichtigen Beitrag zum Vollenden dieser Arbeit geleistet und die Zeit am Georg-Speyer-Haus zu etwas Besonderem gemacht hat.

Der gesamten AG Rieger, besonders Dr. Maike Rehage, Sanne Wingert und Nadine Hätscher danke ich für die nützlichen Ratschläge und Beratung in fachlichen Fragestellungen jeglicher Art.

Außerdem danke ich Dr. Sebastian Newrzela und seiner T-Zell-Lymphom-Gruppe für die Hilfsbereitschaft bei der Isolierung und Kultivierung primärer T-Zellen. Für die Unterstützung bei der Durchführung des *in vitro* immortalizationsassays bedanke ich mich bei Dr. Ute Modlich und Franziska Schenk vom Paul-Ehrlich-Institut in Langen.

Ein ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt den wichtigen Menschen in meinem Leben, die während der letzten Jahre immer an mich geglaubt und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Meinen Freunden Uta, Nadine und Kim, die zu jeder Zeit verstanden haben wie es mir geht und die mich mit ihren aufbauenden und optimistischen Gesprächen immer wieder von neuem motivieren konnten. Meinem Freund Alex, der mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet und mir mit seiner ruhigen, ausgeglichenen Art enorm geholfen hat. Meinen Eltern, meinem Bruder Yannick sowie meiner gesamten Familie für den bedingungslosen Rückhalt, die nötige Kraft und unermüdliche Unterstützung.



## **Eidesstaatliche 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 01.12.2015

Carolin Nowak

