

Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes  
zur Behandlung der Hämophilie A mittels  
FVIII-transduzierter hämatopoetischer Stammzellen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Christian Herder**  
aus Düsseldorf

Frankfurt am Main, 2003

(D F 1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig  
Prof. Dr. E. Seifried

Datum der Disputation: 18.12.2003

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Hämophilie A – Krankheitsbild und gegenwärtige Therapie</b>	<b>1</b>
1.1.1	Hämophilie A und Blutgerinnung	1
1.1.2	Klinisches Bild	2
1.1.3	Diagnose	3
1.1.4	Therapie	4
<b>1.2</b>	<b>Molekulare Grundlagen der Hämophilie A</b>	<b>6</b>
1.2.1	FVIII-Gen	6
1.2.2	FVIII-Protein	7
1.2.3	Mutationen im FVIII-Gen und ihre Konsequenzen auf Proteinebene	11
<b>1.3</b>	<b>Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung der Hämophilie A</b>	<b>13</b>
1.3.1	Potentielle Vorteile einer Gentherapie	13
1.3.2	Physiologische und rekombinante Expression von FVIII	14
1.3.3	Tiermodelle der Hämophilie A	16
1.3.4	Vektorsysteme in der Gentherapie	17
1.3.5	Präklinische und klinische Studien	19
<b>1.4</b>	<b>Hämatopoetische Stammzellen als Zielzellen einer Gentherapie</b>	<b>24</b>
<b>1.5</b>	<b>Lentiviraler Gentransfer</b>	<b>28</b>
1.5.1	Gentransfer in HSC	28
1.5.2	Eigenschaften lentiviraler Vektorsysteme	29
<b>1.6</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>36</b>
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
2.1.2	Reagenzien für zell- und molekularbiologische Arbeiten	37
2.1.3	Oligonukleotide	40
2.1.4	Plasmide und Vektoren	41
2.1.5	Bakterienstämme	44
2.1.6	Medien für die Kultur von Bakterien	45
<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>46</b>
2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	46
2.2.2	Kultivierung und Transfektion von 293T-Zellen und Produktion von lentiviralen Partikeln	46
2.2.2.1	Kultivierung von 293T-Zellen	46
2.2.2.2	Transiente Transfektion von 293T-Zellen	47
2.2.2.3	Produktion von Virusüberstand	48
2.2.2.4	Konzentration von Virusüberstand mit Ultrafiltration und Ultrazentrifugation	49
2.2.3	Transduktion von 293T-Zellen und Bestimmung des Titers lentiviraler Vektorpräparationen	50

2.2.4	Kultivierung humaner hämatopoetischer Zelllinien	51
2.2.4.1	Zelllinien	52
2.2.4.2	Kultivierung von humanen hämatopoetischen Zelllinien	52
2.2.4.3	Transduktion von humanen hämatopoetischen Zelllinien	52
2.2.5	Kultivierung von Maus-Knochenmarkzellen	52
2.2.5.1	Mäuse	52
2.2.5.2	Isolation von Maus-KMZ	53
2.2.5.3	Anreicherung von HSC durch magnetische Zellseparation (MACS)	53
2.2.5.4	Kultivierung von Maus-KMZ	54
2.2.5.5	Transduktion von Maus-KMZ	54
2.2.5.6	Progenitorzell-Assay (MethoCult-Assay)	55
2.2.6	Kultivierung humaner primärer hämatopoetischer Zellen	56
2.2.6.1	Isolation von PBMC durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	56
2.2.6.2	Anreicherung von CD34 <sup>+</sup> -HSC durch MACS	56
2.2.6.3	Kultivierung von HSC	57
2.2.6.4	Transduktion von HSC	57
2.2.6.5	Progenitorzell-Assay (MethoCult-Assay)	57
2.2.6.6	Differenzierung von Granulozyten aus CD34 <sup>+</sup> -Zellen	58
2.2.6.7	Differenzierung und Transduktion von Makrophagen aus PBMC	58
2.2.7	Differenzierung von humanen Endothelzellen	59
2.2.7.1	Kultivierung und Transduktion von HUVEC	59
2.2.7.2	Differenzierung von Endothelprogenitorzellen aus humanen CD34 <sup>+</sup> -Zellen	60
2.2.7.3	Expansion von Endothelzellen	60
2.2.7.4	Transduktion von Endothelzellen	61
2.2.7.5	Matrigel-Assay	61
2.2.7.6	Dil-Ac-LDL-Markierung	61
2.2.8	Durchflußzytometrische Analyse und Selektion von Zellen	62
2.2.8.1	Detektion der EGFP-Expression in transduzierten Zellen	62
2.2.8.2	Selektion EGFP-positiver Zellen (MoFlo)	62
2.2.8.3	Analyse der Expression von Oberflächenantigenen durch Antikörpermarkierung	63
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>65</b>
2.3.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	65
2.3.1.1	Transformation	65
2.3.1.2	Plasmid-Mikropräparation (Detergenz-Lyse)	65
2.3.1.3	Plasmid-Minipräparation (Alkalische Lyse)	66
2.3.1.4	Plasmid-Maxipräparation (Anionenaustauschersäulen)	66
2.3.1.5	Herstellung kompetenter Bakterienstämme	66
2.3.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung	67
2.3.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese	67
2.3.3.1	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	67
2.3.3.2	Isolation von DNA aus Agarosegelen	68
2.3.4	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	68
2.3.4.1	Restriktion von Plasmid-DNA	68
2.3.4.2	Dephosphorylierung linearer DNA	69
2.3.4.3	Modifikation überhängender DNA-Enden	69
2.3.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten	70
2.3.5	Amplifikation von DNA-Sequenzen durch PCR	70
2.3.5.1	Isolation genomischer DNA aus Säugerzellen	70
2.3.5.2	Amplifikation von DNA durch PCR	71
2.3.5.3	Quantifizierung von integrierter DNA in Zellen	71

2.3.6	Detektion von mRNA durch RT-PCR	73
2.3.6.1	Isolation von Gesamt-RNA und polyA <sup>+</sup> -RNA aus Säugerzellen	73
2.3.6.2	Detektion spezifischer mRNAs durch RT-PCR	74
2.3.7	Detektion von FVIII auf Proteinebene	74
2.3.7.1	Konzentration von FVIII-Kulturüberstand durch Ultrafiltration	75
2.3.7.2	Quantifizierung von FVIII:C mit Einstufen-Gerinnungstest	76
2.3.7.3	Quantifizierung von FVIII:C mit chromogenem Assay	77
2.3.7.4	FVIII:Ag-ELISA	77
2.3.7.5	Detektion von FVIII durch SDS-PAGE und Western Blot	77
<b>2.4</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>80</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>81</b>
<b>3.1</b>	<b>Konstruktion von BDD FVIII-Expressionsvektoren</b>	<b>81</b>
3.1.1	Deletion der B-Domäne	81
3.1.2	Expression von FVIII und BDD FVIII im Expressionsvektor pcDNA3	83
3.1.3	Expression von BDD FVIII in lentiviralen Vektoren	86
<b>3.2</b>	<b>FVIII-Expression in hämatopoetischen Zelllinien</b>	<b>88</b>
3.2.1	Transduktion von hämatopoetischen Zelllinien	88
3.2.2	Anreicherung von transduzierten hämatopoetischen Zellen	89
3.2.3	Charakterisierung der BDD FVIII-Expression in hämatopoetischen Zelllinien	91
<b>3.3</b>	<b>FVIII-Expression in primären hämatopoetischen Zellen</b>	<b>94</b>
3.3.1	FVIII-Gentransfer in primäre humane Zellen	95
3.3.1.1	CD34-positive Zellen als Zielzellen	95
3.3.1.2	Differenzierung von Granulozyten aus lentiviral transduzierten CD34 <sup>+</sup> -Zellen	103
3.3.1.3	Transduktion von Makrophagen	105
3.3.2	FVIII-Gentransfer in primäre Mauszellen	106
<b>3.4</b>	<b>FVIII-Expression in primären Endothelzellen</b>	<b>111</b>
3.4.1	FVIII-Expression in lentiviral transduzierten HUVEC	111
3.4.2	FVIII-Expression in lentiviral transduzierten EPC	113
3.4.2.1	Differenzierung von Endothelzellen aus CD34 <sup>+</sup> -Nabelschnurblutzellen	113
3.4.2.2	Lentivirale Transduktion und FVIII-Expression in Nabelschnurblut-EPC	116
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>123</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes für die Hämophilie A</b>	<b>123</b>
<b>4.2</b>	<b>FVIII-Expression in hämatopoetischen Zelllinien</b>	<b>125</b>
4.2.1	Klonierung eines lentiviralen FVIII-Vektors	125
4.2.2	Lentiviraler FVIII-Gentransfer in hämatopoetische Zelllinien	126
4.2.3	Vergleich der Daten mit anderen FVIII-Expressionssystemen	128

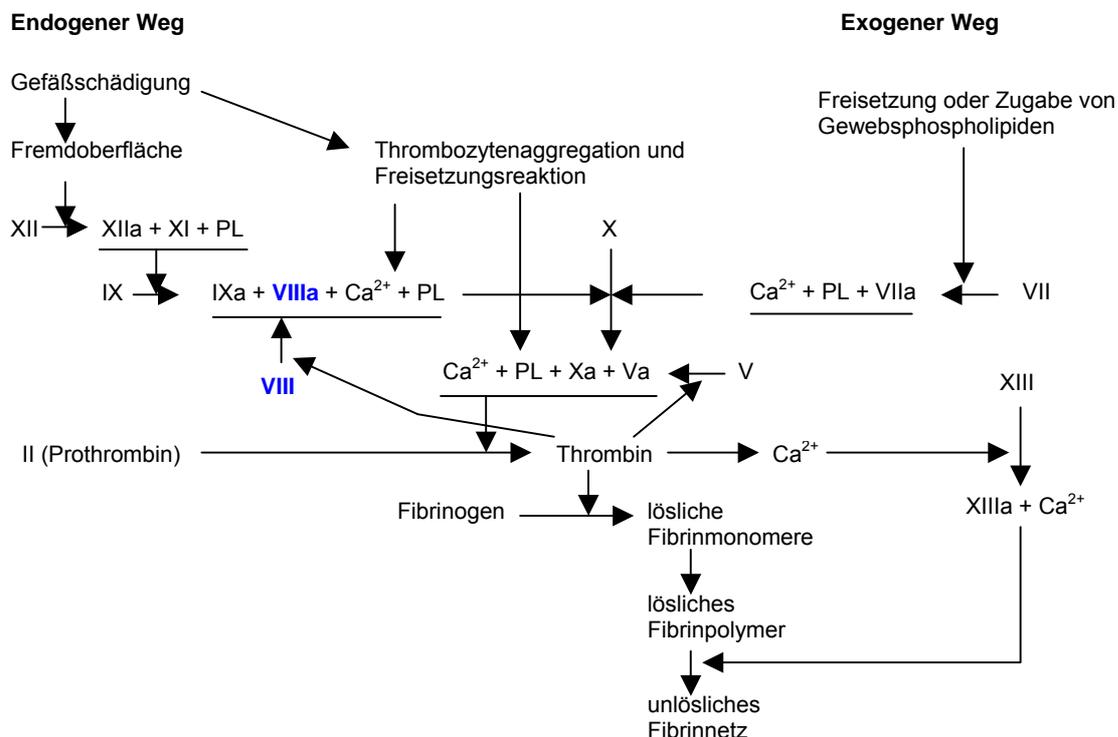
<b>4.3</b>	<b>FVIII-Expression in primären hämatopoetischen Zellen</b>	<b>130</b>
4.3.1	Fehlende Sekretion von FVIII in primären hämatopoetischen Zellen	130
4.3.2	Intrazelluläre Akkumulation von FVIII in primären hämatopoetischen Zellen: Besonderheit des FVIII-Sekretionswgs	130
<b>4.4</b>	<b>FVIII-Expression in Endothelzellen</b>	<b>136</b>
4.4.1	Endothelzellen als Zielzellen einer Hämophilie A-Gentherapie	136
4.4.2	Differenzierung von EPC aus CD34 <sup>+</sup> -Nabelschnurblutzellen	137
4.4.3	Lentiviraler Gentransfer und FVIII-Expression in EPC aus Nabelschnurblut	139
4.4.4	Vergleich der Nabelschnurblut-EPC mit BOEC	140
4.4.5	Rekombinante FVIII-Expression durch Endothelzellen <i>in vivo</i> ?	141
<b>4.5</b>	<b>Gentherapie der Hämophilie A: Perspektiven</b>	<b>144</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>174</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>175</b>
	<b>Publikationen und Kongreßbeiträge</b>	<b>178</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>180</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>181</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämophilie A – Krankheitsbild und gegenwärtige Therapie

### 1.1.1 Hämophilie A und Blutgerinnung

Die Hämophilie A ist die häufigste erbliche Störung der Blutgerinnung. Die Ursache für die Erkrankung liegt in der fehlenden oder verminderten Aktivität des Faktor VIII (FVIII)-Proteins, das eine zentrale Rolle im plasmatischen Gerinnungssystem spielt (Abb. 1.1). Durch Gewebeschädigung und Freisetzung von Phospholipiden aus Thrombozyten oder Gefäßen und umliegendem Gewebe wird eine Kette von enzymatischen Reaktionen im Plasma in Gang gesetzt. Die beteiligten Faktoren liegen als inaktive Proteine vor, aus denen durch Proteolyse aktive Serinproteasen bzw. essentielle Kofaktoren werden, die in gerinnungsaktiven Komplexen miteinander und mit aktivierten Thrombozyten zusammenwirken. Am Ende der Kaskade steht die Generierung von Thrombin, das die Bildung von Fibrinmonomeren katalysiert (Mann, 1999; Heemskerk et al., 2002).



**Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade.** Die zentralen gerinnungsaktiven Komplexe zur Bildung von FXa und Thrombin sind im Schema unterstrichen. Das System enthält eine Reihe von positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen, die in diesem Schema nicht dargestellt sind (nach Begemann, 1999).

FVIII ist ein Protein ohne eigene enzymatische Aktivität, das als Kofaktor unverzichtbar für die Aktivität der Serinprotease Faktor IX (FIX) ist, die Faktor X zu Xa aktiviert. Da FVIII und FIX in einem gemeinsamen Komplex in der Gerinnungskaskade aktiv sind, besitzen beide Defizienzen (im Fall des FIX-Mangels Hämophilie B genannt) sehr ähnliche klinische Symptome (Kaufman, 1999).

### **1.1.2 Klinisches Bild**

Das klinische Erscheinungsbild der Hämophilie A wird bestimmt von einer vermehrten Blutungsneigung und der Unstillbarkeit von Blutungen nach Verletzungen oder operativen Eingriffen. Charakteristisch für die Hämophilie A sind im weiteren Krankheitsverlauf wiederkehrende Blutungen in Gelenke (vor allem Knie, Knöchel und Ellenbogen) und Muskulatur, die schwerwiegende Entzündungen verursachen und zu Gelenkdeformation und Verkrüppelung führen können. Sowohl spontane als auch posttraumatische oder iatrogene Blutungen sind für die Patienten ohne Behandlung oft lebensgefährlich (World Federation of Hemophilia, 2002). Der Schweregrad der Erkrankung korreliert häufig mit dem Anteil an FVIII-Aktivität im Plasma der Patienten (Tab. 1.1). Etwa die Hälfte der Patienten leidet unter schwerer Hämophilie mit weniger als 1% FVIII-Plasmaaktivität im Vergleich zum Bevölkerungsdurchschnitt. Bei ungefähr 10% der Patienten wird eine mittelschwere Hämophilie mit 1-5% FVIII-Aktivität diagnostiziert, und 30-40% der Patienten haben eine leichte Form der Hämophilie. Menschen mit FVIII-Spiegeln über 30% des Normwertes zeigen meist keine Symptome (Antonarakis, 1998; World Federation of Hemophilia, 2002). Aufgrund der Lokalisation des FVIII-Gens auf dem X-Chromosom und des rezessiven Erbgangs sind fast nur Männer von der Krankheit betroffen. Heterozygote Trägerinnen besitzen in der Regel verringerte FVIII-Spiegel von 30-70%, die klinisch unauffällig bleiben (Kasper, 2000). Die Inzidenz in der Bevölkerung liegt bei ungefähr 100-200 Fällen je 1 Million männliche Neugeborene (Nathwani & Tuddenham, 1992).

Nachdem in den frühen 1980er Jahren in Westeuropa und Nordamerika 60-70% der Hämophilie A-Patienten durch kontaminierte Blutprodukte mit HIV infiziert wurden, ist AIDS immer noch die häufigste Todesursache dieser Patientengruppe. Weitere Spätfolgen der Behandlung mit kontaminierten Produkten vor 1986 sind Lebererkrankungen aufgrund von Infektionen mit den Hepatitis B- und C-Viren (HBV bzw. HCV) (Lee, 1996; Giangrande, 1998; Mannucci & Giangrande, 2000). Zudem konnte eine Studie aus den USA zeigen, daß Hämophilie A-Patienten im Vergleich zu einem Normalkollektiv ein signifikant erhöhtes Risiko besitzen, an Herzinfarkt, Krebs oder Nierenerkrankungen zu versterben (Soucie et al., 2000).

<b>FVIII-Aktivität im Plasma</b>	<b>Klassifikation</b>	<b>Symptome</b>
<1%	Schwer	Häufig spontane Muskel- und Gelenkblutungen und posttraumatische Blutungsepisoden; Gelenkdeformation und Verkrüppelung bei unzureichender Behandlung
1-5%	Mittelschwer	Blutungsepisoden nach Verletzungen oder operativen Eingriffen, selten spontane Blutungen
5-30%	Leicht	Verstärkte Blutungsneigung postoperativ oder nach Verletzungen

**Tab. 1.1. Korrelation zwischen FVIII-Plasmaaktivität und Schweregrad der Hämophilie A** (Hoffbrand et al., 1997; Kasper, 2000). Die Angaben zur FVIII-Aktivität beziehen sich auf den Durchschnitt eines Normalkollektivs von 100%, wobei die Schwankungen des Normalbereichs mit etwa 40-180% recht groß sein können (Kasper, 2000).

Bei Zugang zu optimalen Therapiemöglichkeiten (einschließlich „sicheren“ Präparaten ohne virale Kontamination) liegt die Lebenserwartung eines Hämophilie A-Patienten ungefähr zehn Jahre unter dem jeweiligen nationalen Durchschnitt. Ohne Behandlung versterben jedoch viele Patienten innerhalb der ersten zwei Lebensjahrzehnte (Antunes, 2002; World Federation of Hemophilia, 2002).

### 1.1.3 Diagnose

Die wichtigsten Laborbefunde, die auf eine Hämophilie A hindeuten, sind eine verringerte FVIII-Plasmakonzentration, die in der Regel als Aktivität (FVIII:C), nicht als Protein-Antigenkonzentration (FVIII:Ag) bestimmt wird, und bei schweren Hämophilien eine Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) (siehe 2.3.7).

Des Weiteren stehen mit der Polymerasekettenreaktion (PCR), der DNA-Sequenzierung, der Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) und verschiedenen anderen molekulargenetischen Methoden Verfahren zur Verfügung, mit denen die molekulare Ursache der Hämophilie A (siehe 1.2) in fast jedem Patienten genau charakterisiert werden kann (Oldenburg, 2001). Nach der Gewinnung fötaler Zellen durch Chorionzottenbiopsie, Amniozentese oder Punktion der Nabelschnurvene ist so auch eine pränatale Diagnose möglich (Hoffbrand et al., 1997).

### 1.1.4 Therapie

Die Therapie der Wahl besteht in der Infusion von FVIII-Konzentraten, die entweder FVIII aus Spenderplasma oder rekombinant hergestellten FVIII enthalten (siehe auch 1.2), wobei die Infusionen nur bei Bedarf oder gerade bei Patienten mit schwerer Hämophilie im Rahmen einer Dauerbehandlung zur Vorbeugung von Gelenkschädigungen prophylaktisch gegeben werden können (Berntorp, 1996; Lee, 1999). In Ländern, in denen FVIII-Konzentrate nicht in ausreichender Menge verfügbar sind, werden Kryopräzipitate und Frischplasma-Präparate aus Spenderblut verwendet (Srivastava, 1998; Srivastava, 1999).

Bei Patienten mit leichter und mittelschwerer Hämophilie A kann Desmopressin (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin; DDAVP) verabreicht werden, das durch Freisetzung von FVIII und von Willebrand-Faktor (vWF) zu moderater Erhöhung des FVIII-Plasmaspiegels führt. DDAVP wird mitunter mit Tranexaminsäure oder  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure gegeben, die die DDAVP-vermittelte Freisetzung von fibrinolytisch aktivem Plasminogen-Aktivator inhibieren (Cash et al., 1974; Villar et al., 2002).

Die wichtigste Nebenwirkung der Infusion von FVIII-Konzentraten oder anderen FVIII-haltigen Produkten besteht in der Ausbildung von inhibitorischen Allo-Antikörpern (Inhibitoren) gegen FVIII-Epitope durch den Empfänger. Obwohl verschiedene Zahlen zur Inzidenz der Inhibitorbildung veröffentlicht sind, besteht jedoch ein Konsens über die Größenordnung von 20-30% bei Hämophilie A-Patienten (Ehrenforth et al., 1992; Lusher, 1993; Scharrer et al., 1999), wobei die Inzidenz oft von der Art der zugrundeliegenden Mutation des FVIII-Gens und somit vom Schweregrad der Hämophilie abhängt (siehe 1.2).

Bei Patienten mit Inhibitoren ist die Effizienz der FVIII-Substitutionstherapie mit zunehmendem Inhibitortiter deutlich erschwert. In solchen Fällen müssen entweder erhebliche Mengen an FVIII gegeben werden, um den FVIII-Plasmaspiegel merklich zu erhöhen, oder man muß auf FVIII-unabhängige Therapiemöglichkeiten zurückgreifen. Wichtige Therapieoptionen bei akuten Blutungen von Patienten mit hohem Inhibitortiter bestehen in der Gabe von aktivierten Prothrombin-Komplex-Konzentraten aus Humanplasma (Sjamsedin et al., 1981; Roberts, 1999), porcinem FVIII (Gatti & Mannucci, 1984; Kernoff et al., 1984) oder rekombinatem FVIIa (Roberts, 1999; Ingerslev et al., 1999; Brackmann et al., 2000).

In etwa 60-80% der Patienten kann eine Immuntoleranz gegen FVIII induziert werden, so daß der Inhibitor verschwindet (Ghirardini et al., 1996; Mariani et al., 1994; DiMichele, 1998). Das erste Protokoll (das „Bonn-Protokoll“ von Brackmann & Gormsen, 1977) bestand in der Infusion extrem hoher FVIII-Mengen über einen Zeitraum von mindestens mehreren

Monaten. Dieses Protokoll wurde u. a. durch Nilsson und Kollegen („Malmö-Protokoll“; Nilsson et al., 1988) durch vorangehende Immunadsorption des Inhibitors und kombinierte Gabe von FVIII, Cyclophosphamid und Immunglobulinen modifiziert.

Die Bildung von Antikörpern (allerdings von Auto-, nicht Allo-Antikörpern) kommt in äußerst seltenen Fällen (etwa ein Fall je Million Menschen pro Jahr) auch spontan vor. Bei dieser Form der erworbenen Hämophilie A insbesondere bei älteren Menschen, Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Frauen unmittelbar nach der Geburt kann mit den gleichen Protokollen zur Induktion von Immuntoleranz gearbeitet werden (Sallah, 1997; Boggio & Green, 2001)

Neben der Induktion von Inhibitoren bei der FVIII-Substitutionstherapie verbleibt ein Restrisiko der Transmission von Infektionskrankheiten. Nach heutigem Kenntnisstand sind jedoch aufgrund der verwendeten Screening- und Virusinaktivierungsmethoden von Spenderblut Infektionen mit viralen Erregern wie HIV, HBV und HCV durch Blutprodukte wie Faktor VIII-Konzentrate in den Industrieländern nahezu ausgeschlossen (Teitel, 2000; Evatt et al., 2002; Roth & Seifried, 2002). Daß durch Albumin in FVIII-Konzentraten aus Plasma oder in rekombinanten Produkten spongiforme Enzephalopathien wie die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung übertragen werden können, ist zur Zeit noch nicht nachgewiesen (Evatt et al., 2002; Farrugia, 2002). Anders sieht die Situation in Entwicklungs- und Schwellenländern aus, in denen die mangelnde finanzielle Ausstattung der nationalen Gesundheitssysteme eine optimale Versorgung der Patienten mit FVIII-Konzentraten unmöglich macht. Vielfach werden noch Kryopräzipitate und Frischplasma eingesetzt (Srivastava, 1999). Gerade angesichts der oft hohen Prävalenzen von HBV, HCV und HIV ist allerdings das Risiko einer Infektion des Patienten deutlich höher.

Durch den allgemeinen Gebrauch von rekombinanten FVIII-Präparaten, die keine menschlichen und nur noch Spuren von tierischen Proteinen enthalten, sollte es möglich sein, das Restrisiko der Übertragung bekannter oder noch nicht charakterisierter humanpathogener Erreger weiter zu minimieren (Mannucci & Giangrande, 2000). Allerdings führen die hohen Kosten sowohl von Plasma-FVIII-Konzentraten wie auch von rekombinanten Produkten derzeit noch dazu, daß nur etwa 25% der Hämophilie A-Patienten weltweit adäquat behandelt werden können (Srivastava, 1998; Antunes, 2002).

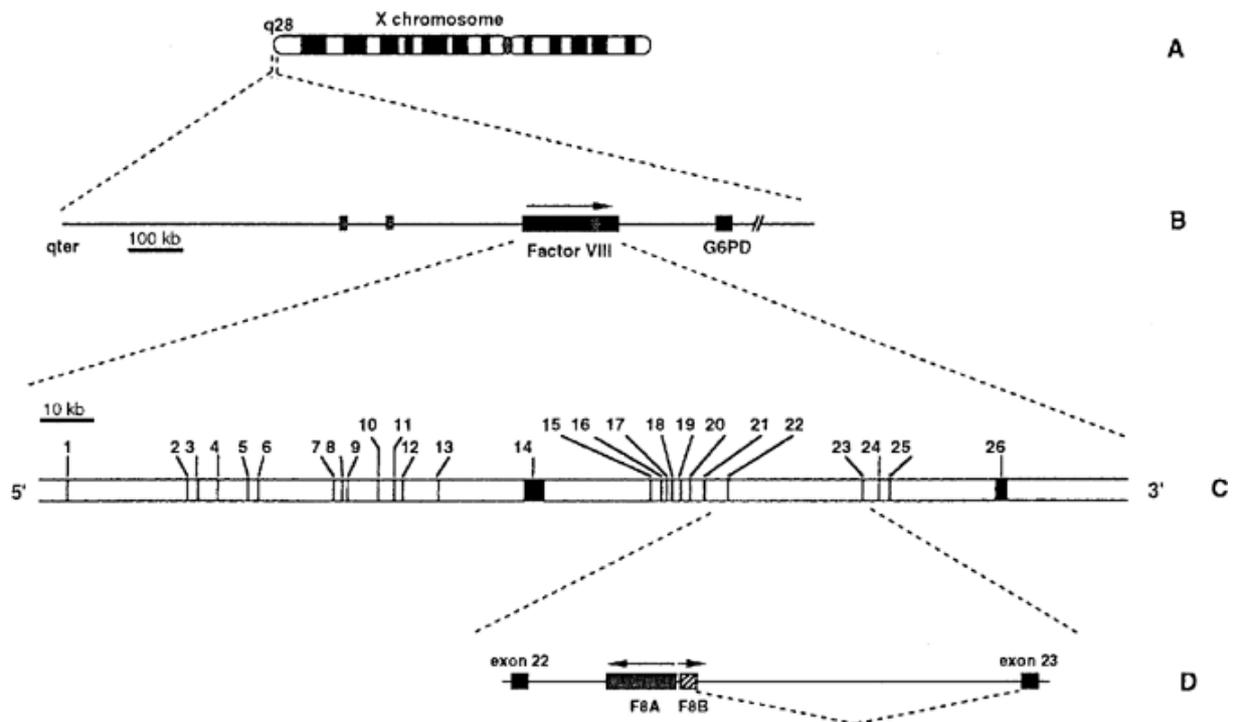
## 1.2 Molekulare Grundlagen der Hämophilie A

Für das Verständnis der Hämophilie A sind die Beschreibung des Genlocus (1.2.1) und des transkribierten Proteins (1.2.2) sowie der Mutationen innerhalb dieses Locus und ihre Konsequenzen auf Proteinebene (1.2.3) erforderlich.

### 1.2.1 FVIII-Gen

Der FVIII-Genlocus liegt etwa 1 Mb entfernt vom distalen Ende des langen Arms des X-Chromosoms (Xq28; Abb. 1.2A, B). Die FVIII-cDNA konnte bereits 1984 kloniert werden (Toole et al., 1984; Gitschier et al., 1984): Der Genlocus umfaßt 186 kb mit 26 Exons, die in der Länge von 69 bis 3106 bp variieren (Abb. 1.2C). Das mRNA-Transkript besteht aus etwa 9010 Nukleotiden und enthält eine kurze 5'-untranslatierte Region (150 Basen), ein offenes Leseraster mit Stopcodon (7056 Basen) und eine lange 3'-untranslatierte Region (Wood et al., 1984).

Innerhalb des Introns 22 gibt es zwei weitere Gene F8A und F8B, die durch einen bidirektionalen Promotor zwischen diesen Sequenzen auch transkribiert werden (Abb. 1.2D; Levinson et al., 1990; Levinson et al., 1992b). Die F8A-Sequenz ist ein intronloses Gen von weniger als 2 kb (Levinson et al., 1990), die zusammen mit dem Promotor als int22h-1 bezeichnet wird (Naylor et al., 1995). Zu int22h-1 gibt es zwei zu 98% identische Sequenzen mit einer Länge von 9,5 kb außerhalb des FVIII-Locus (int22h-2 und int22h-3, zwischen dem FVIII-Locus und dem Xq-Telomer, Abb. 1.2B), die homologe Rekombinationen und chromosomale Inversionen ermöglichen (siehe 1.2.3; Levinson et al., 1990; Lakich et al., 1993; Naylor et al., 1995). F8A wird in vielen Zelltypen transkribiert und liegt ebenfalls in der Maus vor (Levinson et al., 1992a). Bisher sind jedoch weder Funktionen des Transkriptes noch des Proteins bekannt. Von F8B als 5'-Exon entsteht ein Transkript, das ebenfalls die Exons 23-26 des FVIII-Gens enthält (Naylor et al., 1995). Auch in diesem Fall sind die Funktionen von mRNA und Protein nicht beschrieben.



**Abb. 1.2. Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisation und der Struktur des FVIII-Gens.** Der Genlocus liegt etwa 1 Mb vom Xq-Telomer entfernt (A, B) und besteht aus 26 Exons (C). Im Intron 22 befinden sich mit F8A und F8B zwei weitere offene Leseraster, von denen F8A als intronloses Minigen vorliegt, während von F8B aus ein Transkript in 3'-Richtung entsteht, das auch die Exons 23-26 umfaßt (D). Die Pfeile geben die Richtung der Transkription an. In (B) ist in Form von zwei kleinen Kästchen dargestellt, daß es zwischen dem Xq-Telomer und dem FVIII-Locus noch zwei Sequenzen gibt, die zu F8A homolog sind (aus Antonarakis, 1998).

### 1.2.2 FVIII-Protein

Von der FVIII-mRNA wird ein Polypeptid mit 2351 Aminosäuren (AS) translatiert. Die ersten 19 Aminosäuren besitzen die Funktion eines Signalpeptids für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Export aus der Zelle (Toole et al., 1984). Im ER liegt das FVIII-Protein nach Abspaltung des Signalpeptides zunächst als Protein mit 2332 AS und einem Molekulargewicht von etwa 300 kDa (265 kDa ohne Glykosylierungsanteil) vor (Vehar et al., 1984).

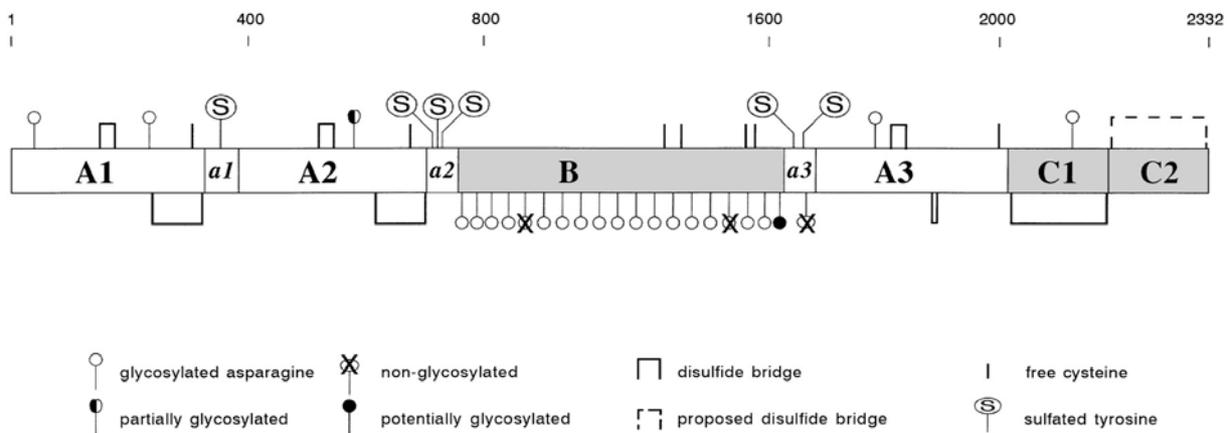
Die Struktur des FVIII-Proteins wird geprägt durch die Aufteilung in verschiedene Domänen, die zum Teil interne Homologie aufzeigen. Die Domänenstruktur ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt. Zwischen den Domänen A1 (AS 1-329), A2 (AS 380-711) und A3 (AS 1649-2019) gibt es Sequenzhomologien von etwa 30%. Weitere Homologien bestehen unter

anderem zu Domänen der Proteine Ceruloplasmin und Faktor V (Vehar et al., 1984; Koschinsky et al., 1986; Kane & Davie, 1986). Die A-Domänen werden an den Carboxyl- bzw. Aminotermini durch je eine saure Region mit einer hohen Dichte der negativ geladenen Aminosäuren Asp und Glu flankiert (a1-a3, siehe Abb. 1.3).

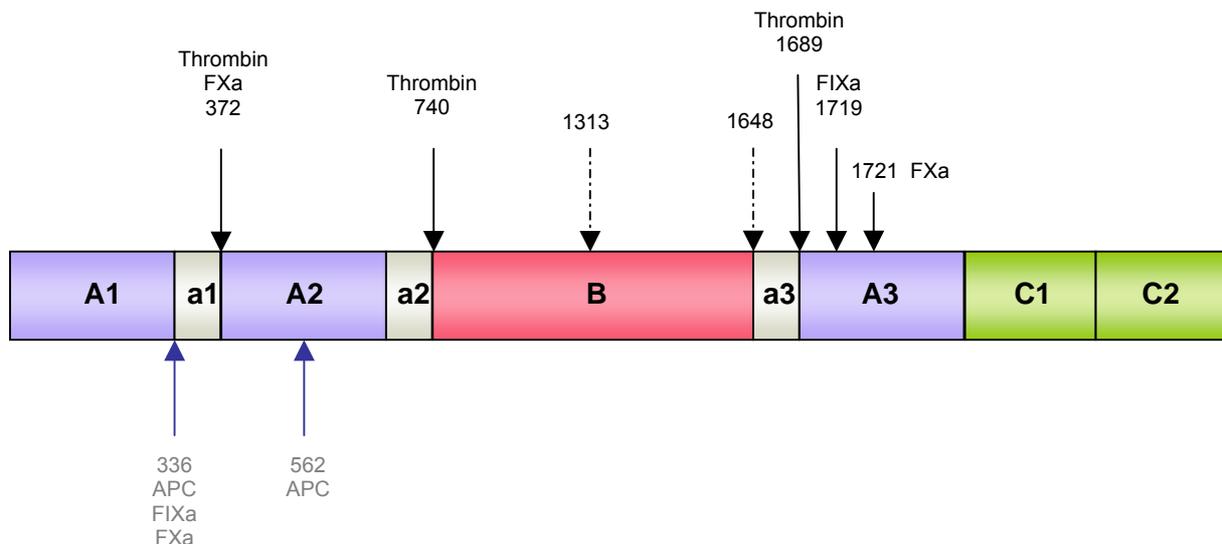
Zwischen den Domänen A2 und A3 liegt die B-Domäne (AS 740-1648), die komplett durch das Exon 14 kodiert wird. Zu ihr sind keine homologen Domänen bekannt, und für die FVIII-Funktion in der Gerinnung scheint sie verzichtbar zu sein (Toole et al., 1986; Eaton et al., 1986b).

Am Carboxylende des FVIII befinden sich die homologen Domänen C1 (AS 2020-2172) und C2 (2173-2332), die ebenfalls Homologie zum Faktor V und zu Ketten des Discoidin I aufweisen (Vehar et al., 1984; Kane et al., 1987).

Innerhalb der Zelle und nach der Sezernierung muß das FVIII-Protein mit der Domänenstruktur A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 noch verschiedene posttranslationale Modifikationsschritte durchlaufen, um als aktiver Kofaktor zur Gerinnung beitragen zu können (Lenting et al., 1998).



**Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Domänenstruktur und der posttranslationalen Prozessierung des FVIII-Proteins.** Angegeben sind neben den Domänen und den sauren Regionen (a1-a3) die N-Glykosylierungsstellen, die sulfatierten Tyrosinreste sowie freie Cysteine und Disulfidbrücken (aus Lenting et al., 1998).



**Abb. 1.4. Proteolytische Aktivierung und Inaktivierung von FVIII.** FVIII zirkuliert im Plasma überwiegend als Heterodimer aus leichter Kette (a3-A3-C1-C2) und schwerer Kette (A1-a1-A2-a2-B). Die Länge der schweren Kette variiert aufgrund begrenzter Proteolyse, die an den Positionen Arg1313 und Arg1648 schon innerhalb der Zelle stattfinden kann (gestrichelte Pfeile). Zur Aktivierung sind weitere Spaltungen durch Serinproteasen im Plasma erforderlich (durchgezogene schwarze Pfeile), so daß FVIIIa als Heterotrimer von A1-a1, A2-a2 und A3-C1-C2 vorliegt. Die blauen Pfeile zeigen Spaltungen an, die zu Inaktivierung und Abbau des Proteins führen (modifiziert nach Lenting et al., 1998).

Die Sequenz des FVIII-Proteins enthält 25 potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen sich 18 in der B-Domäne befinden (Toole et al., 1984; Moussalli et al., 1999). Die Glykosylierung im ER ist Voraussetzung für die Interaktion von FVIII mit Proteinen wie ERGIC-53 (Endoplasmatisches Retikulum-Golgi-Intermediäres Kompartiment-53) und den Chaperonen Calnexin und Calreticulin, die für den intrazellulären Transport vom ER in den Golgi-Apparat von zu sezernierenden Proteinen wichtig sind (Moussalli et al., 1999; Nichols et al., 1998; Pipe et al., 1998).

Im Golgi-Apparat erfolgt die O-Glykosylierung. Neben der Glykosylierung findet dort auch eine Sulfatierung des Proteins statt. Sechs Tyrosinreste innerhalb der sauren Regionen (AS 346, 718, 719, 723, 1664, 1680) sind sulfatiert (Pittman et al., 1992), und zumindest einige der Sulfate sind notwendig für die effiziente Spaltung und Aktivierung durch Thrombin sowie für die hochaffine Bindung an von Willebrand-Faktor (vWF, siehe unten) und somit für volle FVIII-Aktivität (Michnick et al., 1994; Kjalke et al., 1995).

Sowohl innerhalb der Zelle als auch im Plasma unterliegt das FVIII-Protein schließlich einer Reihe von proteolytischen Spaltungen, die erst zur Aktivierung und dann zur Inaktivierung führen (Abb. 1.4). Nach der intrazellulären Spaltung, die nach den Arginin-Resten 1313 und 1648 erfolgen kann, liegt das FVIII-Protein im Plasma zuerst als Heterodimer vor, das aus einer leichten Kette mit den Domänen A3-C1-C2 (etwa 80 kDa) und einer schweren Kette mit den Domänen A1-A2 und Teilen der B-Domäne (90 bis 220 kDa) besteht.

Beide Ketten sind nicht-kovalent durch ein Metallion verbunden, wobei noch nicht klar ist, welche Spezies im FVIII im Plasma vorliegt. Es ist bekannt, daß aufgereinigte schwere und leichte Ketten zusammen mit Mn(II) oder Ca(II) aktiven FVIII ergeben (Fay, 1999), aber auch für Cu(I) wird eine Rolle in dieser Bindung diskutiert (Bihoreau et al., 1993; Tagliavacca et al., 1997).

Am Ort der Blutgerinnung erfolgt die endgültige Aktivierung durch Thrombin oder FXa, die innerhalb der schweren Kette hinter den Argininresten 372 und 740 und in der leichten Kette nach Arg1689 schneiden, so daß das aktive FVIIIa ein Heterotrimer aus der leichten Kette A3-C1-C2 und den Domänen A1-a1 und A2-a2 ist (Eaton et al., 1986a). Die leichte Kette und A1-a1 bleiben über ein Metallion assoziiert, während A2-a2 durch elektrostatische Wechselwirkung gebunden wird.

Die Funktion von FVIII als Kofaktor in der Gerinnungskaskade erfordert die Wechselwirkung mit anderen Proteinen. FVIII bindet nach der Sezernierung über die Domänen a3 und C2 als inaktives Protein im Plasma mit hoher Affinität an vWF (Dissoziationskonstante  $K_d$  etwa 0,4 nM; Weiss et al., 1977; Tuddenham et al., 1982; Saenko & Scandella, 1997) und wird von diesem stabilisiert und vor Proteolyse geschützt (Wise et al., 1991; Kaufman & Pipe, 1999). Die Assoziation mit vWF erhöht die Halbwertszeit von FVIII im Plasma von 2-3 Stunden auf 12-14 Stunden (Weiss et al., 1977; Over et al., 1978).

Nach der Abspaltung von a3 dissoziiert vWF ab, und FVIIIa wird freigesetzt und bindet in einem membranständigen Komplex an FIXa (A2 und A3), FX (a1) bzw. FXa (C2) und an Phospholipide (C3) (Saenko et al., 2002).

Weitere proteolytische Schritte durch Proteasen aus dem Gerinnungssystem (Thrombin, FIXa, FXa, aktiviertes Protein C) und die Dissoziation von A2-a2 führen zu Inaktivierung und Abbau des FVIIIa-Trimers (Vehar et al., 1984, Walker et al., 1987, O'Brien et al., 1992).

### 1.2.3 Mutationen im FVIII-Gen und ihre Konsequenzen auf Proteinebene

Wie in 1.2.2 aufgezeigt, ist die Struktur des FVIII-Proteins mit seinen zahlreichen posttranslationalen Modifikationen überaus komplex. Aufgrund vieler Studien ist bekannt, daß fast jede Veränderung des FVIII-Proteins mit einer Verringerung von Expression und/oder Aktivität einhergeht und daß es im FVIII-Gen angesichts der Länge überraschend wenige Polymorphismen gibt (Bowen, 2002). Eine umfangreiche Datenbank mit FVIII-Mutationen und weiteren Informationen findet sich im Internet unter <http://europium.csc.mrc.ac.uk> und zeigt auf, wie extrem divers die molekulare Basis der Hämophilie A ist (HAMSTeRS: Haemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site; Kemball-Cook et al., 1998).

Mutationen können das Proteinrückgrat des FVIII auf der Ebene der Aminosäuresequenz und auf der Ebene der proteolytischen Prozessierung ebenso verändern wie das Glykosylierungs- und Sulfatierungsmuster. Intrazellulär kann dies die Wechselwirkungen mit Proteinen wie Chaperonen stören, die Voraussetzungen für den FVIII-Export sind. Außerhalb der Zelle können veränderte Bindungsaffinitäten für andere Plasmaproteine oder für Phospholipide zu Instabilität (fehlende Bindung an vWF) und verminderter Gerinnungsaktivität führen (Modifikation der Bindung an FIXa, FX, Thrombin und Phospholipiden) (Saenko et al., 2002).

Mutationen im FVIII-Gen sind in etwa zwei Dritteln der Patienten vererbt und in den restlichen Patienten Spontanmutationen, die häufig während der Gametenbildung des Vaters auftreten (Oldenburg et al., 1993; Rossiter et al., 1994). Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die Art der bisher beschriebenen Mutationen und ihre Konsequenzen für die Patienten gegeben werden (siehe auch Antonarakis, 1998 und Bowen, 2002):

#### (i) Inversionen

In 25% aller Hämophilie A-Patienten und in über 40% der Patienten mit schwerer Hämophilie A findet man eine große Inversion innerhalb des X-Chromosoms, die durch homologe Rekombination zwischen int22h-1 in Intron 22 und int22h-2 bzw. int22h-3 entsteht (siehe 1.2.1; Lakich et al., 1993). Das FVIII-Gen bis Intron 22 ist invertiert, so daß nur trunkierte mRNA-Transkripte entstehen können.

#### (ii) Große Deletionen

Etwa 5% der Patienten besitzen große Deletionen von mehr als 100 bp im FVIII-Gen, die fast immer in schwerer Hämophilie resultieren.

(iii) Kleine Deletionen/Insertionen

Kleine Deletionen und Insertionen von oft nur 1-10 bp führen in 5-10% der Hämophilie A-Patienten zu Verschiebungen des Leserasters bei der Transkription und somit fast immer zu schwerer Hämophilie.

(iv) Nukleotidaustausch

In etwa der Hälfte der Hämophilie A-Patienten liegen FVIII-Gene vor, in denen lediglich ein Nukleotid mutiert ist. Dies bedeutet in den meisten Fällen einen Austausch von einer Aminosäure (Missense-Mutation), der je nach Position zu leicht verringerten Aktivitäten des Proteins und so zu leichter oder mittelschwerer Hämophilie führen kann oder aber zu inaktivem FVIII-Protein oder gar einem Verlust der Expression. Im Fall von Nonsense-Mutationen entsteht in der kodierenden Sequenz ein Stop-Kodon, das in der Regel in der vorzeitigen Terminierung der mRNA und schwerer Hämophilie resultiert (oder selten nur zum Fehlen des mutierten Exons; Dietz et al., 1993). Eine dritte und seltene Gruppe von Mutationen durch Austausch eines Nukleotids besteht in Mutationen, die sich in Spleiß-defekten manifestieren.

(v) Seltene Mutationen

Darüber hinaus gibt es Mutationen, die nur in wenigen Patienten gefunden wurden. Die wichtigsten Mechanismen sind hier Insertion von Retrotransposons (Kazazian et al., 1988), Duplikation von Intron- oder Exonsequenzen (Gitschier, 1988; Murru et al., 1990) und Translokation (Migeon et al., 1993).

Die Art der Mutation beeinflusst allerdings nicht nur den Schweregrad der Hämophilie, sondern auch die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von inhibitorischen Antikörpern durch den Patienten während der Substitutionstherapie (Schwaab et al., 1995). Vereinfacht läßt sich sagen, daß Mutationen, die zum völligen Verlust des Genprodukts und damit zur Abwesenheit von FVIII im Plasma führen, mit einer deutlich höheren Wahrscheinlichkeit zur Inhibitorbildung führen (35-40%) als Mutationen, in denen FVIII in verringerter Menge, in trunkierter Form oder nur mit einer leichten Konformationsänderung vorliegt (5-10%) (Oldenburg et al., 2000). Die genaue Kenntnis der Mutation läßt jedoch noch keine zuverlässige Vorhersage über eine Immunreaktion des Patienten zu, so daß neben der Analyse potentiell immunreaktiver B- und T-Zell-Epitope des FVIII-Proteins (Reding et al., 1999; Lollar, 1999) auch Zusammenhänge mit anderen Genloci wie z. B. dem MHC-Locus untersucht werden (Hay et al., 1997; Oldenburg et al., 1997; Gill, 1999).

## **1.3           Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung der Hämophilie A**

### **1.3.1         Potentielle Vorteile einer Gentherapie**

Obwohl FVIII-Konzentrate hocheffizient, sehr sicher und im Rahmen einer Heimbehandlung gut zu lagern und infundieren sind, gibt es doch einige Gründe, weshalb diese Therapie für die Patienten suboptimal bleibt:

Die kurze Halbwertszeit von FVIII im Plasma bedeutet, daß Patienten bei prophylaktischer Substitution zwei- bis dreimal wöchentlich FVIII-Infusionen benötigen. Die durchschnittlichen Kosten für die Versorgung eines Hämophilie A-Patienten mit FVIII-Präparaten liegen in der Größenordnung von einigen Zehntausend Euro jährlich (Rogoff et al., 2002; Ragni, 2002), und bei Patienten mit inhibitorischen Antikörpern können sie für eine Immuntoleranzinduktion durchaus etwa eine Million Euro erreichen (Colowick et al., 2000).

Neben den eher praktischen und finanziellen Erwägungen bleibt das Problem der Inhibitorentwicklung, die mit bisherigen klinischen Protokollen in einem Teil der Patienten nicht zu vermeiden ist. Zudem kann bei der Substitution mit FVIII aus Spenderplasma trotz aller Anstrengungen ein Restrisiko der Übertragung von (auch noch nicht charakterisierten) Infektionskrankheiten nicht ausgeschlossen werden.

Die ideale Lösung für das Krankheitsbild der Hämophilie A besteht in der dauerhaften Produktion einer konstanten Menge an FVIII durch körpereigene Zellen oder zumindest durch Zellen innerhalb des Körpers, die Zugang zum Blutkreislauf besitzen. Wie bereits in 1.1.2 dargestellt, wird keine vollständige Rekonstitution des FVIII-Spiegels benötigt, um die klinischen Symptome zu mildern. Für einen Patienten mit schwerer Hämophilie A bräuchte eine Anhebung der FVIII-Aktivität auf 1-5% bereits eine deutliche Steigerung der Lebensqualität mit sich. Um zu zeigen, mit welchen gentherapeutischen Ansätze man sich diesem Problem nähern kann, sollen im Folgenden die Möglichkeiten der rekombinanten Expression von FVIII in verschiedenen Zielzellen beschrieben werden (1.3.2). Zudem werden kurz verfügbare Tiermodelle für die Hämophilie A (1.3.3) und verschiedene Gentransfervektoren (1.3.4) vorgestellt, die bereits in präklinischen und klinischen Studien eingesetzt wurden (1.3.5).

### 1.3.2 Physiologische und rekombinante Expression von FVIII

Im gesunden Menschen ist die Leber das wichtigste Organ der physiologischen Expression von FVIII. Durch Lebertransplantationen kann die FVIII-Defizienz korrigiert werden (Lewis et al., 1985; Bontempo et al., 1987; Delorme et al., 1990), und auch Perfusionsexperimente mit isolierten Tierlebern stützen diese Ansicht (Owen et al., 1979; Shaw et al., 1979). Die Expression erfolgt überwiegend in Hepatozyten (Wion et al., 1985; Zelechowska et al., 1985), aber auch sinusoidale Endothelzellen der Leber sind in der Lage, FVIII zu sezernieren (Do et al., 1999; Hollestelle et al., 2001).

Der Beitrag weiterer Gewebe scheint von untergeordneter Bedeutung zu sein. FVIII konnte zwar auch in Milz, Lymphknoten und Niere nachgewiesen werden (Wion et al., 1985), und Transplantationsversuche deuteten auf die Expression von FVIII-Protein in Geweben wie Milz und Lunge hin (Groth et al., 1974; Veltkamp et al., 1974), aber weder die genaue zelluläre Lokalisation noch die physiologische Relevanz dieser Befunde sind bisher hinreichend charakterisiert.

In gentherapeutischen Ansätzen zur Behandlung der Hämophilie A ist man nicht nur auf die Verwendung von Hepatozyten oder Endothelzellen festgelegt. Im Prinzip kommt jeder Zelltyp in Frage, der Proteine effizient glykosylieren und sulfatieren und anschließend sezernieren kann, so daß sie ins Plasma gelangen können. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, daß die FVIII-Expression *in vitro* bzw. nach *in vivo*-Gentransfer in verschiedenen Zelltypen möglich ist. Neben Hepatozyten (Andrews et al., 1999) und Endothelzellen (Dwarki et al., 1995; Chuah et al., 1995; Rosenberg et al., 2000) sind ebenfalls Knochenmarkstromazellen (Chuah et al., 1998), hämatopoetische Zellen (Hoeben et al., 1992; Evans & Morgan, 1998; Tonn et al., 2002), Fibroblasten (Hoeben et al., 1990; Roth et al., 2001) und Keratinozyten (Fakharzadeh et al., 2000) getestet worden.

Im allgemeinen wurden jedoch beachtliche Probleme bei der rekombinanten Expression beobachtet (Übersicht in Soukharev et al., 2002). Insgesamt zeichnen sich zwei Problembereiche ab, die zu einer um zwei bis drei Größenordnungen niedrigeren FVIII-Ausbeute als erwartet führen: (i) niedrige mRNA-Spiegel und (ii) ineffizienter intrazellulärer Transport (Soukharev et al., 2002).

(i) Sowohl in Zellen, die mit einem FVIII-Expressionsvektor transfiziert waren, als auch in retroviral transduzierten Zellen zeigte sich, daß FVIII-mRNA in einer um zwei Größenordnungen niedrigeren Konzentration vorlag als andere mRNAs (wie FIX), deren cDNAs in identische Vektoren kloniert waren (Kaufman et al., 1989; Hoeben et al., 1990; Israel &

Kaufman, 1990; Lynch et al., 1993). In weiteren Arbeiten konnten Sequenzen in den Exons für die A2-Domäne charakterisiert werden, die die Transkription der FVIII-cDNA inhibieren, so daß auch die Produktion von retroviralen Vektoren in Verpackungszellen in ihrer Effizienz stark beeinträchtigt ist (Lynch et al., 1993; Hoeben et al., 1995; Koeberl et al., 1995; Fallaux et al., 1996).

(ii) In einer Reihe von rekombinanten Expressionssystemen wurde deutlich, daß der Export des FVIII-Proteins aus der Zelle sehr ineffizient verläuft. FVIII bildet Aggregate im ER, die den Weitertransport in den Golgi-Apparat und somit aus der Zelle heraus verhindern (Tagliavacca et al., 2000). Seit längerem ist bekannt, daß FVIII im ER an Chaperone wie BiP (Immunglobulin-bindendes Protein), Calnexin und Calreticulin bindet (Dorner et al., 1987; Pipe et al., 1998). Für die Bindung scheint die stark glykosylierte B-Domäne eine wichtige Rolle zu spielen, denn die Deletion der B-Domäne führt zu verringerter Assoziation mit diesen Chaperonen (Dorner et al., 1987; Pipe et al., 1998). Unglykosyliert kann FVIII jedoch nicht sezerniert werden, da es in Gegenwart von Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung, zu stabiler Interaktion von FVIII und BiP und sogar verstärkter FVIII-Aggregatbildung kommt (Dorner et al., 1987; Tagliavacca et al., 2000).

Die Zahl der Lösungen für die Schwierigkeiten bei der rekombinanten FVIII-Expression scheint begrenzt, da die Charakterisierung von Mutationen in Hämophilie A-Patienten zeigt, daß die meisten Modifikationen das FVIII-Protein destabilisieren oder inaktivieren (siehe 1.2.3). Eine Möglichkeit zur Steigerung der FVIII-Ausbeute besteht in der bereits erwähnten Expression einer FVIII-cDNA ohne den für die B-Domäne kodierenden Bereich, da die B-Domäne für die Gerinnungsaktivität nicht notwendig ist (Toole et al., 1986; Eaton et al., 1986b). Die Deletion der B-Domäne erhöht die Expression von FVIII um über eine Größenordnung gegenüber dem Wildtyp-Protein (Dorner et al., 1987; Pittman et al., 1993) und verändert weder die Plasma-Halbwertszeit noch die immunologischen Eigenschaften des FVIII-Proteins (Pittman et al., 1993; Berntorp, 1997).

Eine weitere Möglichkeit liegt in der Insertion von Introns in die FVIII-cDNA. Es gibt Hinweise darauf, daß die Expression rekombinanter Proteine von der genomischen DNA höher ist als von der cDNA (Soukharev et al., 2002). Dies ist für FVIII aufgrund der Größe des Genlocus nicht durchführbar, aber die Insertion einiger kurzer Intronsequenzen aus dem FIX-Locus in die FVIII-cDNA führte zu deutlich gesteigerten FVIII-Ausbeuten (Plantier et al., 2001).

Trotz der niedrigen Ausbeute in rekombinanten Systemen gibt es zur Zeit (2003) vier rekombinante FVIII-Präparate, die in Europa und in den USA zugelassen und kommerziell erhältlich sind (Soukharev et al., 2002). Die Proteine werden in Chinese Hamster Ovary (CHO)- oder Baby Hamster Kidney (BHK)-Zellen produziert, in die stabil entweder die

gesamte FVIII-cDNA oder eine B-Domänen-deletierte FVIII-cDNA (BDD FVIII) transfiziert wurde (Lee, 1999) und die in bezug auf Plasma-Halbwertszeit, Immunogenität und andere entscheidende biologische Parameter den FVIII-Präparationen aus Plasma entsprechen (Mannucci & Giangrande, 2000).

### 1.3.3 Tiermodelle der Hämophilie A

Um neben der rekombinanten Expression von FVIII *in vitro* auch untersuchen zu können, welche Kombination von Zielzellen und Vektoren in gentherapeutischen Ansätzen eine FVIII-Defizienz *in vivo* korrigieren könnten, wurden verschiedene Tiermodelle etabliert.

Als Kleintiermodelle stehen FVIII-defiziente Mäuse zur Verfügung, die durch Disruption der Exons 16 bzw. 17 des murinen FVIII-Gens entstanden sind (Bi et al., 1995; siehe 2.2.5.1). Die Mäuse besitzen keine FVIII:C-Aktivität im Plasma bei relativ mildem Phänotyp (Bi et al., 1996) und bilden wie auch ein Teil der Patienten mit schwerer Hämophilie A aufgrund ihres funktionalen Immunsystems inhibitorische Antikörper gegen humanen FVIII (Bi et al., 1996; Qian et al., 1999).

In immundefizienten Mäusen wie z. B. SCID-Mäusen (SCID: severe combined immunodeficiency) kann die Expression von FVIII ohne die Induktion einer Inhibitorbildung getestet werden (Bosma & Carroll, 1991). Aufgrund des endogenen FVIII-Spiegels besitzen die Mäuse jedoch keinen Hämophilie-Phänotyp.

Die Einkreuzung der FVIII-Disruption in einen immundefizienten Mausstamm demonstrierte, daß eine Kombination aus den Vorteilen beider Modelle möglich ist (VandenDriessche et al., 1999; Chuah et al., 2003).

Die Beobachtung von Hunden mit einem schweren Hämophilie-Phänotyp führte zur Zucht und Charakterisierung verschiedener FVIII-defizienter Hundekolonien (Giles et al., 1982; Hough et al., 2002; Lozier et al., 2002), so daß auch ein mit Hämophilie A-Patienten vergleichbares Großtiermodell für präklinische Studien verfügbar ist.

In den beschriebenen Tiermodellen können sowohl die heterologe Expression von humanem FVIII als auch die homologe FVIII-Expression mit der cDNA der entsprechenden Spezies untersucht werden, da der murine FVIII und der canine FVIII ebenfalls kloniert wurden (Elder et al., 1993; Cameron et al., 1998).

### 1.3.4 Vektorsysteme in der Gentherapie

Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie ist die Entwicklung hocheffizienter Methoden für den Gentransfer in humane Zellen mit minimaler Toxizität. Bei den bisher charakterisierten Verfahren kann man grundsätzlich zwischen *in vivo*- und *ex vivo*-Ansätzen sowie zwischen nicht-viralen und viralen Vektoren unterscheiden (Romano et al., 1999; Dyer & Herrling, 2000).

Bei *in vivo*-Protokollen wird dem Patienten der Transgenvektor systemisch (intravenös) oder lokal (zum Beispiel intramuskulär) verabreicht, so daß der Gentransfer innerhalb des Körpers stattfindet. Dieses Verfahren bringt als Vorteil mit sich, daß große Vektorchargen für ein Patientenkollektiv wie ein Medikament präpariert werden können, mit denen die Therapie nicht nur in Spezialkliniken durchgeführt und die Behandlungskosten relativ niedrig gehalten werden können. Als Nachteile sind zuerst Gefahren in bezug auf Toxizität und Immunogenität zu beachten. In diesem Zusammenhang ist die klinische Phase I-Dosis-Eskalationsstudie zur Behandlung der Ornithintranscarbamylase-Defizienz in Philadelphia zu nennen, in der ein Patient an den Folgen des Eingriffs verstarb. Das Immunsystem des Patienten reagierte auf die Infusion von etwa  $3,8 \times 10^{13}$  adenoviralen Partikeln in die Pfortader mit einer starken Akut-Phase-Reaktion und einer systemischen Entzündung, die innerhalb von vier Tagen zu Multiorganversagen führte (Somia & Verma, 2000; Raper et al., 2002). Zudem ist beim *in vivo*-Gentransfer die gezielte Modifikation nur eines einzigen Zelltyps oder Gewebes noch nicht optimiert, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß Zellen der Keimbahn genetisch verändert werden.

*Ex vivo*-Protokolle beinhalten die gentechnische Modifikation von Zellen außerhalb des Körpers, die dann dem Patienten appliziert werden. Die Zellen können körpereigene Zellen sein (autologe Transplantation), aber bei geeigneter Konditionierung des Patienten oder Immunisolation der Zellen auch von Fremdspendern (allogen) oder sogar Tieren stammen. Mit diesem Verfahren umgeht man Nebenwirkungen des Vektors bezüglich Immunogenität oder Keimbahnveränderung. Allerdings muß zumindest bei autologen Zellapplikationen eine individuelle Therapie durchgeführt werden, die aufwendiger und kostenintensiver ist.

Für den Gentransfer sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* stehen eine Reihe von viralen und nicht-viralen Vektoren zur Verfügung. Die Anwendung nicht-viraler Systeme ist häufig mit zu geringer Effizienz des Gentransfers und nur transienter Genexpression verbunden und soll an dieser Stelle daher nicht weiter diskutiert werden (gute Übersicht in Nishikawa & Huang, 2001). Die am besten charakterisierten und am häufigsten in präklinischen und klinischen Studien eingesetzten viralen Vektoren sind mit ihren Vor- und Nachteilen in Tab. 1.2

aufgeführt. Die Entwicklung dieser Vektoren erforderte die Deletion bzw. Modifikation von viralen Genen, die in Verbindung mit Pathogenese und Replikation stehen, so daß Klassen von Vektoren entstanden, die möglichst viel Raum für die Insertion von therapeutischen Genen bieten und die zwar noch in der Lage sind, Zellen zu transduzieren, aber in den Zellen nicht mehr replizieren und somit nicht wieder freigesetzt werden können (sog. replikationsdefekte Vektoren).

Vektor	Vorteile	Nachteile
Retroviren (dsRNA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Integration ins humane Genom (dauerhafte Expression des Transgens möglich)</li> <li>&gt; hohe Transduktionseffizienz</li> <li>&gt; keine Expression viraler Proteine, geringe Immunogenität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Mutagenese durch Insertion nicht auszuschließen</li> <li>&gt; nur Transduktion replizierender Zellen; Kapazität für Transgen &lt;10 kb</li> <li>&gt; replikationskompetente Retroviren durch homologe Rekombination nicht völlig ausgeschlossen</li> </ul>
Lentiviren (dsRNA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Integration ins humane Genom (dauerhafte Expression des Transgens möglich)</li> <li>&gt; hohe Transduktionseffizienz; auch Transduktion ruhender Zellen</li> <li>&gt; keine Expression viraler Proteine, geringe Immunogenität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Mutagenese durch Insertion nicht auszuschließen</li> <li>&gt; Kapazität für Transgen &lt;10 kb</li> <li>&gt; replikationskompetente Lentiviren durch homologe Rekombination nicht völlig ausgeschlossen</li> </ul>
Adenoviren (dsDNA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; keine Mutagenese durch Insertion</li> <li>&gt; hohe Transduktionseffizienz mit Transfer von bis zu 30 kb Fremd-DNA; auch Transduktion ruhender Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; keine Integration ins humane Genom (transiente Expression des Transgens)</li> <li>&gt; Immunogenität bei systemischer und lokaler Applikation</li> </ul>
Adeno-assozierte Viren (AAV) (ssDNA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Integration ins humane Genom und dauerhafte Expression des Transgens möglich</li> <li>&gt; mittlere Transduktionseffizienz; auch Transduktion ruhender Zellen</li> <li>&gt; niedrige Immunogenität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Mutagenese durch Insertion nicht auszuschließen</li> <li>&gt; Transfer von &lt;5 kb Fremd-DNA</li> </ul>

**Tab. 1.2. Übersicht über Vor- und Nachteile der am besten charakterisierten viralen Vektorsysteme in der Gentherapie** (ds: doppelsträngig; ss: einzelsträngig) (Romano et al., 1999; Dyer & Herrling, 2000; Somia & Verma, 2000).

Zu den weiteren Vektortypen, die zur Zeit für den Einsatz in der Gentherapie entwickelt werden, gehören unter anderem Vektoren auf der Basis des Herpes Simplex-Virus für die Transduktion neuronaler Zellen (Ali et al., 1994), des Epstein-Barr-Virus für die Genexpression in B-Lymphozyten (Robertson et al., 1996) und des Vaccinia-Virus (Peplinski et al., 1998).

### **1.3.5 Präklinische und klinische Studien**

Aufgrund der vielen in 1.3.2 beschriebenen Schwierigkeiten, die bei der rekombinanten Expression von FVIII *in vitro* und *in vivo* auftreten können, wurden bereits eine Reihe von Ansätzen mit verschiedenen Zielzellen und den verfügbaren Vektorsystemen ausgetestet. Tab. 1.3 gibt eine Zusammenfassung über bisher publizierte präklinische Studien im Tierversuch. Es ist zu beachten, daß in den meisten Experimenten die Tiere sehr heterogen reagierten. Die gegebenen FVIII-Spiegel und die Dauer der Expression sind daher nicht als Mittelwerte dargestellt, sondern beziehen sich in der Regel auf die Einzeltiere, die am besten auf die Therapie ansprachen.

Die meisten der aufgeführten Studien sind Ansätze, in denen der Vektor systemisch verabreicht wurde, so daß *in vivo* im wesentlichen Leberzellen transduziert wurden. Gerade bei adenoviralen Vektoren der ersten Generation, die neben der FVIII-cDNA noch adenovirale Gene enthielten, führte dies zu einer FVIII-Expression auf anfänglich sehr hohem Niveau, die im Verlauf der Zeit aber stark abfiel. Die Deletion der viralen Gene aus den neueren Transfervektoren verlängert die Transgenexpression zwar deutlich, kann aber keine konstanten FVIII-Spiegel gewährleisten (Reddy et al., 2002). Die Gründe für dieses Phänomen sind nur zum Teil bekannt: Der graduelle Verlust von Vektor-DNA bei Zellteilungen wird diskutiert, da Adenoviren episomal vorliegen und nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren können, aber auch der Verlust von transduzierten Zellen durch eine zelluläre Immunantwort gegen adenovirale Proteine könnte gerade bei den Vektoren der ersten Generation eine Rolle spielen (Kochanek, 1999; Lipshutz et al., 1999; Somia & Verma, 2000; Chuah et al., 2001).

Die häufigsten Nebenwirkungen der systemischen Vektorapplikation bestehen in der Toxizität des Vektors (Schädigung der Leber und mitunter des hämatopoetischen Systems) und in der Bildung inhibitorischer Antikörper gegen FVIII und/oder virale Capsidproteine in immunkompetenten Tieren (siehe z. B. Gallo-Penn et al., 2001). Studien mit immun-

Vektor	Promotor	Transgen	Tier	Appl.	Max. Konz. [%]	Dauer (>1%)	Inhibitor	Kommentar	Studie
Retro	LTR	hBDDF8	SCID	ip	60	1 W.	NT	Fibroblasten (verkapselt)	(1)
Retro	LTR	hBDDF8	F8-KO	ro	1250	>14 M.	+/-	Neonatale Mäuse	(2)
Retro	LTR	hBDDF8	NOD/SCID	is	4	1 W.	-	KM-Stromazellen	(3)
Retro	LTR	hBDDF8	F8-KO/SCID	is	15	1 W.	-	KM-Stromazellen	(4)
Retro	LTR	hBDDF8	C57BL/6	ip	20	1 W.	+	C2C12 bzw. MDCK in Alginatkapseln	(5)
Retro	LTR	hBDDF8	SCID	ip	5	1 W.	-	C2C12 bzw. MDCK in Alginatkapseln	(6)
Lenti (HIV)	EF1 $\alpha$	hBDDF8	C57BL/6	ipv	15	7 W.	+	Partielle Hepatektomie	(7)
Lenti (HIV)	EF1 $\alpha$	hBDDF8	C57BL/6/SCID	ipv	10	>2 M.	-	Partielle Hepatektomie	(8)
Lenti (HIV)	CMV	cBDDF8	F8-KO/SCID	iv	25	1 W.	-	KM-Stromazellen	(9)
Lenti (FIV)	RSV	hBDDF8	F8-KO	iv	75	>5 M.	NT	-	(10)
Ad	Albumin	hBDDF8	C57L/6	iv	150	6 W.	NT	-	(11)
Ad	Albumin	hBDDF8	C57BL/6	iv	500	>4 W.	NT	-	(12)
Ad	Albumin	hBDDF8	Hämophilie A-Hund	iv	800	1 W.	+	-	(13)
Ad	Albumin	hBDDF8	F8-KO	iv	255	>9 M.	-	-	(14)
Ad	Albumin	cBDDF8	F8-KO	iv	3100	>12 M.	NT	-	(15)
Ad	Albumin	hWTF8	F8-KO	iv	(<1%)	6 T.	NT	Phänotyp. Korrektur	(16)
Ad	CMV	mBDDF8	F8-KO	ip	600	2 W.	NT	<i>in utero</i>	(17)
Ad	Albumin	hBDDF8	C57BL/6	iv	80	>20 W.	NT	FVIII mit Epitop-Tag am C-Terminus	(18)
Ad	Albumin	hWTF8	F8-KO	iv	400	>12 M.	+	Vektor ohne adenovirale Gene	(19)
Ad	Albumin	hBDDF8	F8-KO	iv	140	10 T.	-	-	(20)
Ad	CMV	mWTF8	F8-KO	iv	100	4 W.	+	-	(21)
Ad	Albumin	hBDDF8	F8-KO	iv	300	>16 W.	NT	-	(22)
Ad	Albumin	cBDDF8	Hämophilie A-Hund	iv	5900	1 W.	+	-	(23)
Ad	Albumin	hBDDF8	Makake	iv	50	4 W.	+/-	FVIII mit Epitop-Tag am C-Terminus	(24)
Ad	Albumin	hBDDF8	F8-KO	iv	200	>40 W.	-	Vektor ohne adenovirale Gene	(25)
AAV	EF1 $\alpha$	hF8HC & hF8LC	C57BL/6	ipv	220	>5 M.	NT	HC und LC in separaten Vektoren	(26)
AAV	HSV-TK	hBDDF8	NOD/SCID	ipv	27	>4 W.	NT	-	(27)
AAV	HSV-TK	hBDDF8	C57BL/6	ipv	29	>12 M.	+	Inhibitor transient; Toleranzinduktion?	(28)
Plasmid-DNA	CMV	hBDDF8	NOD/SCID	iv	590	>5 M.	NT	BOECs; FVIII-EGFP-Fusionsprotein	(29)

**Tab. 1.3. Gentherapie der Hämophilie A in Tiermodellen** (Legende auf der nächsten Seite).

**Tab. 1.3. Gentherapie der Hämophilie A in Tiermodellen** (modifiziert und erweitert nach VandenDriessche et al., 2001 und Chuah et al., 2001).

Abkürzungen (nach Spalten geordnet):

- (Vektor) AAV: Adeno-assoziiertes Virus; Ad: Adenovirus; FIV: Felines Immundefizienzvirus; HIV: Humanes Immundefizienzvirus; Lenti: Lentivirus; Retro: Retrovirus
- (Promotor) CMV: Cytomegalievirus; EF1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ ; HSV-TK: Thymidinkinase des Herpes Simplex-Virus; LTR: Long terminal repeat; RSV: Rous-Sarkomvirus
- (Transgen) BDDF8: FVIII mit deletierter B-Domäne; HC: Schwere Kette (heavy chain); LC: Leichte Kette (light chain); WTF8: Wildtyp-FVIII; c: canin; h: human; m: murin
- (Tier) F8-KO: FVIII-defiziente Maus; NOD/SCID: Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency-Maus; SCID: Severe combined immunodeficiency-Maus
- (Appl.) Applikation: ip: intraperitoneal; ipv: in die Pfortader; is: in die Milz; iv: intravenös; ro: retroorbital
- (Max. Konz. [%]) Maximale FVIII-Plasmakonzentration in % im Verlauf der Studie (maximal gemessener Wert, falls veröffentlicht, sonst Mittelwert)
- (Dauer >1%) Dauer der FVIII-Expression von >1% nach Behandlung in mindestens einem der Versuchstiere: M.: Monat(e); T.: Tage; W.: Woche(n)
- (Inhibitor) Auftreten von inhibitorischen anti-FVIII-Antikörpern: +: ja; +/-: in einem Teil der Tiere; -: nein; NT: nicht getestet
- (Kommentar) BOECs: Blood outgrowth endothelial cells; C2C12: Murine Myoblasten-Zelllinie; HC: Schwere Kette (heavy chain); KM: Knochenmark; LC: Leichte Kette (light chain); MDCK: Canine Nierenepithel-Zelllinie
- (Studie) Referenzen: (1) Dwarki et al., 1995; (2) VandenDriessche et al., 1999; (3) Chuah et al., 2000; (4) VandenDriessche et al., 2001; (5) Garcia-Martin et al., 2002; (6) Garcia-Martin et al., 2002; (7) Park et al., 2000b; (8) Park et al., 2000b; (9) VandenDriessche et al., 2001; (10) Stein et al., 2001; (11) Connelly et al., 1995; (12) Connelly et al., 1996a; (13) Connelly et al., 1996b; (14) Connelly et al., 1998; (15) Gallo-Penn et al., 1999; (16) Connelly et al., 1999; (17) Lipshutz et al., 1999; (18) Roy et al., 1999; (19) Balagué et al., 2000; (20) Bristol et al., 2000; (21) Sarkar et al., 2000; (22) Andrews et al., 2001; (23) Gallo-Penn et al., 2001; (24) Andrews et al., 2002; (25) Reddy et al., 2002; (26) Burton et al., 1999; (27) Chao et al., 2000; (28) Chao & Walsh, 2000; (29) Lin et al., 2002

defizienten Tieren spiegeln zwar nicht die spätere klinische Situation wider, sind aber dennoch hilfreich für die grundsätzliche Klärung der Frage, ob ein Vektorsystem für die FVIII-Expression *in vivo* verwendet werden kann. Auch Expressionsstärke und Kinetik können so untersucht werden.

Die wenigen Versuche zur Implantation von *ex vivo* modifizierten Zellen verweisen auf ein weiteres Hindernis bei der rekombinanten FVIII-Expression: Gerade die Arbeiten der Gruppe von VandenDriessche und Chuah mit primären Zellen und mit Zelllinien zeigen, daß nach

Implantation von transduzierten Zellen durch Silencing-Effekte in den Zellen die Transgenexpression völlig verschwinden kann (Chuah et al., 2000; Garcia-Martin et al., 2002).

Das Minimalziel einer Gentherapie kann wie folgt definiert werden: Es sollte eine Vektordosis bzw. Dosis an genmodifizierten Zellen zu finden sein, die in *allen* Patienten (im Tierversuch in *allen* immunkompetenten Tieren) *dauerhaft* einen therapeutisch wirksamen FVIII-Plasmaspiegel von *>1% ohne Vektortoxizität* und *ohne Inhibitorbildung* erreicht. Trotz einer Vielzahl von Lösungsansätzen, wie sie in Tab. 1.3 zusammengefaßt sind, konnte dieses Minimalziel bisher leider noch nicht erreicht werden.

Nach den Erfahrungen mit den verschiedenen Vektorsystemen in Tiermodellen begannen in den letzten Jahren (seit 1998) die ersten drei klinischen Phase I-Studien (Tab. 1.4). Den Studien ist gemeinsam, daß erwachsene Patienten mit schwerer Hämophilie A (FVIII-Aktivität im Plasma  $<1\%$ ) und ohne inhibitorische Antikörper gegen FVIII nach wiederholter Exposition gegen FVIII-Konzentrate in verschiedenen Gruppen mit steigenden Vektordosen behandelt werden. Das Hauptziel besteht in der Evaluation der Sicherheit der Therapie in bezug auf Vektortoxizität, Immunreaktionen und Gentransfer in die Keimbahn. Zudem soll geprüft werden, ob mit den applizierten Vektoren Verbesserungen des klinischen Bildes der teilnehmenden Patienten erreicht werden können.

In den beiden beendeten Studien wurden in 9 von 19 Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten FVIII-Spiegel von 1% oder mehr gemessen, aber die klinischen Effekte waren nur transient und äußerten sich in objektiv schwer zu beurteilenden Reduktionen des FVIII-Bedarfs. Eine Inhibitorbildung wurde in keinem der Patienten gesehen, doch dies kann am niedrigen Niveau der FVIII-Expression liegen. Erst eine Erhöhung der FVIII-Expression durch Steigerung der Vektordosis oder durch optimierte Vektoren wird klären können, wie hoch das Risiko der Inhibitorbildung im Kontext der verschiedenen Gentherapie-Protokolle sein wird. Aufgrund der bisher veröffentlichten Ergebnisse kann man sagen, daß keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet wurden. Die GenStar-Studie, in der ein adenoviraler Vektor verwendet wird, wurde jedoch nach der Behandlung des ersten Patienten vorübergehend gestoppt, da leichte und aufgrund der Vektordosis unerwartete Nebenwirkungen auftraten. Bei diesem Patienten wurden innerhalb der ersten drei Wochen nach Vektorapplikation erhöhte Leberenzym Spiegel im Plasma sowie hämatologische Veränderungen festgestellt (Kelley et al., 2002).

Zur Zeit befindet sich eine vierte Studie in Planung, in der ein AAV-Vektor für den Gentranfer eingesetzt werden soll (Avigen, 2002). Diese Studie wird auf den Befunden aus zwei klinischen Studien mit diesem Vektorsystem in der Behandlung der Hämophilie B

Vektor	Prom.	Transgen	Pat.	Appl.	Max. Konz. [%]	Klinischer Effekt	Nebenwirkungen	Kommentar	Ref.
Plasmid-DNA	Fibro-nektin	hBDDF8	6	ip	4	bei 4 Pat. Reduktion des Bedarfs an FVIII-Präparaten	keine Immunreaktionen	ex vivo-Elektroporation autologer Hautfibroblasten, ex vivo klonale Expansion	(1)
Retro	LTR	hBDDF8	13	iv	6,2	bei 6 Pat. reduzierte Blutungsfrequenz	keine Inhibitoren	Zielorgan Leber; in einem Patienten eine Samenprobe positiv für Vektorsequenz (Laborfehler?)	(2)
Ad	Albumin	hWTF8	x	iv	x	x	Vektortoxizität beim ersten Patienten	Zielorgan Leber; Vektor ohne adenovirale Gene	(3)
Retro	LTR bzw. CMV	hF9	2	sc	6,3	reduzierte Blutungsneigung	keine Inhibitoren	ex vivo-Transduktion autologer Hautfibroblasten; FIX-Spiegel vor Therapie bei 2%	(4)
AAV	CMV	hF9	8	im	1,4	in 2 Pat. Reduktion des Bedarfs an FIX-Präparaten	keine	in 6/8 Pat. FIX-Protein im Muskel detektiert (Immunhistochemie)	(5)
AAV	AAT/APO-E	hF9	x	iv	x	x	x	Zielorgan Leber; im ersten Pat. Samenproben bis Woche 10 positiv für AAV-Vektor	(6)

**Tab. 1.4. Übersicht über die klinischen Phase I-Studien der Hämophilie A und B.** Abkürzungen: AAT/APO-E:  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Promotor/Apolipoprotein E-Enhancer; hF9: humaner FIX; Pat.: Anzahl der Patienten; Prom.: Promotor; Ref.: Referenzen; sc: subcutan (gemischt mit Collagen); x: Studie noch nicht abgeschlossen; (1): Roth et al., 2001 [Sponsor: Transkaryotic Therapies, Cambridge, MA]; (2) White, 2001; Kelley et al., 2002 [Sponsor: Chiron Corporation, Emeryville, CA]; (3) White, 2001; Kelley et al., 2002 [Sponsor: GenStar Therapeutics Corporation, San Diego, CA]; (4) Qiu et al., 1996 [Fudan University, Shanghai, VR China]; (5) Kay et al., 2000; Manno et al., 2002 [Sponsor: Avigen, Alameda, CA] (6) Arruda et al., 2002 [Sponsor: Avigen, Alameda, CA] (siehe auch Legende zu Tab. 1.3).

aufbauen können (siehe Tab. 1.4), die AAV-Vektoren für den FIX-Transfer in Muskel bzw. Leber benutzen. Der AAV-vermittelte Gentransfer in Muskelgewebe erreichte in 2 von 8 Patienten transiente FIX-Spiegel von 1% oder mehr. In 6 der 8 Patienten konnte jedoch aufgrund von immunhistochemischen Untersuchungen rekombinante FIX-Expression auf Proteinebene ohne Nebenwirkungen nachgewiesen werden (Manno et al., 2002). Probleme tauchten bei der intravenösen Applikation des Vektors in die Leberarterie auf, da beim ersten Patienten bis Woche 10 nach Infusion Samenproben positiv für Vektorsequenzen waren, was auf das Risiko einer Keimbahnübertragung hindeutet (Arruda et al., 2002).

Auch wenn in jeder der bisher abgeschlossenen Studien in einem Teil der Patienten FVIII- bzw. FIX-Aktivitäten im Plasma von mindestens 1% erzielt werden konnten, so blieben diese potentiell therapeutisch wirksamen Konzentrationen nicht konstant. Insgesamt konnte daher die prinzipielle Eignung der verwendeten Vektorsysteme und Applikationsprotokolle demonstriert werden, aber entweder müssen sowohl Wirksamkeit als auch Sicherheit nach diesen ersten Behandlungen noch wesentlich verbessert werden, oder es müssen alternative Protokolle mit anderen Zielzellen oder Vektorsystemen entwickelt werden.

#### **1.4 Hämatopoetische Stammzellen als Zielzellen einer Gentherapie**

Die Zusammenfassung der bisher publizierten Daten über präklinische und klinische Studien (1.3.5) zeigt, daß trotz der Vielfalt der gewählten Ansätze, d. h. der verschiedenen Kombinationen von Zielzellen und Vektorsystemen, noch kein Protokoll etabliert werden konnte, das Sicherheit und Persistenz der FVIII-Expression auf hohem Niveau gewährleisten kann. Hämatopoetische Zellen (HSC) wurden als Zielzellen für eine Gentherapie der Hämophilie A bisher kaum untersucht, obwohl sie aus verschiedenen Gründen sehr interessant erscheinen.

HSC sind definiert als Zellen, die nach Transplantation in einen Rezipienten ohne blutbildendes System (z. B. nach letaler Strahlungsexposition) durch Proliferation und Zelldifferenzierung die gesamte Hämatopoese rekonstituieren und dauerhaft erhalten können (Weissman, 2000). Ein Modell für die Analyse der Stammzeleigenschaften humaner HSC besteht in der Repopulierung immundefizienter SCID-Mäuse (Larochelle et al., 1996). Im adulten Individuum befinden sich HSC im wesentlichen im Knochenmark und im peripheren Blut (im Knochenmark in einer Frequenz von etwa einer HSC in  $3 \times 10^6$  kernhaltigen Zellen; Wang et al., 1997), aber auch in Milz und Leber (Whetton & Graham, 1999). HSC sind relativ ruhend und teilen sich nur selten. Zu einem beliebigen Zeitpunkt befinden sich die meisten HSC in der  $G_0$ -Phase (und ein kleiner Teil in  $G_1$ ), jedoch nur sehr wenige in den aktiven Phasen  $S/G_2/M$  des Zellzyklus (Gothot et al., 1998; Cheshier et al., 1999). Bei der Zellteilung entsteht neben einer HSC noch eine Vorläuferzelle mit extrem hohem Proliferationspotential, deren Nachkommen in die verschiedenen Zelltypen des hämatopoetischen Systems differenzieren (Brenner, 1996; Wagers et al., 2002a).

Erste gentherapeutische Experimente im Bereich der Hämophilie A wurden mit murinen Knochenmarkzellen (KMZ) durchgeführt, die *ex vivo* retroviral transduziert und in letal bestrahlte Mäuse transplantiert wurden. Im Ansatz von Hoeben et al. (1992) enthielt der

Vektor eine BDD FVIII-cDNA. Obwohl *in vivo* Vektorsequenzen nachgewiesen wurden, konnten weder FVIII-mRNA noch FVIII-Protein im Plasma detektiert werden. Evans & Morgan (1998) verwendeten ebenfalls eine B-Domänen-deletierte (BDD) FVIII-cDNA, die zwar im Knochenmark der FVIII-defizienten Empfängermause transkribiert wurde, aber nicht zu meßbaren FVIII-Spiegeln im Plasma führte. Jedoch resultierte die Therapie in einigen Rezipienten in einer Immuntoleranz gegen injizierten humanen FVIII, die nur durch die vorherige Expression niedriger Mengen transgenen FVIII-Proteins erklärt werden kann.

Mit der Studie von Evans & Morgan wurde indirekt gezeigt, daß hämatopoetische Zellen zumindest grundsätzlich in der Lage sind, FVIII-Protein zu exprimieren (wenn auch keine Sezernierung dokumentiert wurde). Mit optimierten Vektoren und Transduktionsbedingungen könnte es daher möglich sein, *ex vivo* transduzierte HSC therapeutisch einzusetzen und dabei folgende Vorteile von HSC als Zielzellen zu nutzen (Übersichten in Lutzko et al., 1999; Weissman, 2000; Asahara et al., 2000; Bordignon & Roncarolo, 2002):

(i) Sowohl humane als auch murine HSC stellen das am besten charakterisierte und auch am besten verfügbare adulte Stammzellkompartiment dar. Die Untersuchung des Phänotyps anhand von Oberflächenantigenen und die langjährige klinische Erfahrung mit der Transplantation von HSC (in der Regel im Kontext von Leukämien) belegen, daß mit moderat invasiven Methoden aus Knochenmark und peripherem Blut genügend HSC für eine therapeutische Anwendung isoliert werden können und daß auch Nabelschnurblut eine potentielle HSC-Quelle darstellt (Little & Storb, 2002). Zur Gewinnung der Zellen wird am häufigsten eine magnetische Zellseparation durchgeführt, bei der CD34-exprimierende Zellen angereichert werden, da sich in diesem Zellkompartiment ein großer Teil der Zellen mit echten Stammzeleigenschaften in Transplantationen befindet (Berenson et al., 1988; Goodell, 1999 und Referenzen darin). Im Mausmodell ist es sinnvoller, HSC anzureichern, indem alle differenzierten hämatopoetischen Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker immunmagnetisch depletiert und ggf. auf die Expression anderer Marker (Sca-1, c-kit) selektioniert wird (Osawa et al., 1996, Sato et al., 1999).

(ii) Die Transduktion der Zellen erfolgt *ex vivo*, so daß Schwierigkeiten mit der potentiellen Immunogenität des Vektors praktisch nicht existieren. Für die Transduktion werden replikationsdefekte Vektoren eingesetzt, die so konstruiert werden können, daß in den Zielzellen keine viralen Gene transkribiert und somit keine viralen Proteine vom Immunsystem des Rezipienten erkannt werden können. Eine Reihe von Studien mit Markergenen wie dem EGFP (Enhanced green fluorescent protein) demonstrieren, daß HSC mit hoher Effizienz und ohne relevante negative Auswirkungen auf ihre Stammzeleigenschaften

retroviral und lentiviral transduziert werden können (Szilvassy et al., 1989; Rosenzweig et al., 1999; Kume et al., 2000; siehe auch 1.5). Nach der Transduktion können die Zellen eingefroren bzw. vor der Transplantation in bezug auf Effizienz des Gentransfers, Expression des Transgens und auf Sicherheitsparameter wie die Abwesenheit replikationskompetenter Vektoren getestet werden (Brenner, 1996).

(iii) Nach geeigneter Konditionierung des Empfängers kann ein Chimärismus des hämatopoetischen Systems entstehen, in dem transduzierte wie nicht-transduzierte Zellen dauerhaft persistieren, wodurch auch eine anhaltende Expression des Transgens möglich ist. Bei autologen Transplantationen ist keine Immunantwort des Patienten gegen die Zellen zu erwarten (Little & Storb, 2002).

(iv) Die transduzierten Zellen leisten durch polyklonale Expansion und Differenzierung einen Beitrag zur Hämatopoese, so daß eine Amplifikation des Transgens *in vivo* erfolgt und zudem alle Zellen des hämatopoetischen Systems theoretisch als Zielzellen in Frage kommen (Kim et al., 2000). Durch Auswahl eines konstitutiven oder zelltypspezifischen Promotors besteht die Möglichkeit der Steuerung der Genexpression. Die FVIII-Sezernierung kann direkt ins Plasma erfolgen.

Daß eine solche Therapie für hämatologische Erkrankungen möglich ist, zeigen zwei klinische Studien, in denen CD34-positive HSC aus Knochenmark retroviral transduziert wurden. In der ersten Studie von Cavazzana-Calvo und Fischer (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002) gelang die Rekonstitution des Immunsystems in Kindern mit X-chromosomal vererbter schwerer komplexer Immundefizienz (SCID-X1) durch die rekombinante Expression der fehlenden gemeinsamen  $\gamma$ -Kette verschiedener Interleukin-Rezeptoren in hämatopoetischen Zellen. Die zweite erfolgreiche Studie beschreibt die rekombinante Expression von Adenosindeaminase (ADA) in Patienten mit ADA-SCID, einem der SCID-X1 ähnlichen Immunschwächesyndrom (Aiuti et al., 2002). Hier muß allerdings erwähnt werden, daß diese Erfolge zumindest zum Teil auf dem Selektionsvorteil beruhen, den die transduzierten Zellen *in vivo* über die untransduzierten Zellen besitzen (Fischer et al., 2002).

In präklinischen Studien wurde das Spektrum auf weitere Erkrankungen wie unter anderem die Chronische Granulomatose (Mardiney et al., 1997; Björgvinsdóttir et al., 1997), auf Hämoglobinopathien (May et al., 2002; Sadelain, 2002) und auf die Erythropoetische Protoporphyrinurie (Pawliuk et al., 1999) mit Erfolg im Tierversuch erweitert.

(v) Der wahrscheinlich bedeutendste Vorteil gegenüber allen anderen Gentherapieprotokollen, die nicht mit HSC als Zielzellen arbeiten, liegt in der immunologischen Besonderheit der Proteinexpression durch hämatopoetische Zellen, die durch die Funktion als Immunzellen begründet ist, und in der Möglichkeit, eine Inhibitorbildung gegen FVIII zu vermeiden, die in anderen Ansätzen häufig vorkommt (siehe 1.3.5). Schon seit einigen Jahrzehnten ist aus Erfahrungen mit allogenen Knochenmarktransplantationen bei konditionierten Patienten bekannt, daß die Etablierung eines Chimärismus mit detektierbarem HSC-Donoranteil eine lebenslange Immuntoleranz gegen Fremdartigene, die von den hämatopoetischen Zellen des Donors exprimiert werden, induziert (Weissman, 2000). Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis oder Systemischem Lupus Erythematosus ist es in einer Reihe von Fällen sogar zu einer lebenslangen Remission durch erfolgreiche allogene Transplantation von HSC gekommen (Übersicht in Burt et al., 2002).

Bei der Transplantation von autologen, aber genmodifizierten HSC sollten die immunologischen Konsequenzen in Analogie zur allogenen Transplantation stehen. In der Tat belegen Studien mit retroviral transduzierten KMZ oder KMZ aus transgenen Tieren im Mausmodell, daß innerhalb von Inzuchtstämmen mit der Transplantation von KMZ, die nach genetischer Modifikation ein fremdes Protein exprimieren, eine Immuntoleranz gegen ebendieses Protein induziert wird. Sowohl Toleranz gegen Fremd-Proteine, d. h. gegen neue Peptidpitope (Zambidis et al., 1997), als auch gegen veränderte Glykosylierungsmuster (Bracy & Iacomini, 2000) ist möglich. Da FVIII ein komplexes Glykoprotein ist, sind beide Befunde von großer Bedeutung, und in der bereits erwähnten Studie von Evans & Morgan (1998) scheint eine Toleranz gegen FVIII aufgrund dieses Mechanismus induziert worden zu sein.

(vi) Neben diesen fünf erwähnten Vorzügen von transduzierten HSC in der Gentherapie gibt es einen weiteren Aspekt, der zur Zeit von vielen Arbeitsgruppen erforscht wird und der für die Nutzung dieser Zellen interessant werden könnte: Die Analyse der Differenzierungskapazitäten von HSC, die über die Expression des Oberflächenmarkers CD34 (in manchen Studien auch von CD133) definiert wurden, ergab, daß Zellen aus dem HSC-Kompartiment auch in Zellen nicht-hämatopoetischer Gewebe wie Hirn, Niere, Muskel, Leber und Endothel differenzieren können (Übersichten in Blau et al., 2001 und Graf, 2002). Dieser Vorgang wird als „Transdifferenzierung“ bezeichnet. Die Interpretation der Daten sowie die physiologische Relevanz und Nutzbarkeit dieses Phänomens für gentherapeutische und andere klinische Ansätze sind umstritten (Ying et al., 2002; Terada et al., 2002; Wagers et al., 2002b; Poulsom et al., 2002). Fast alle diese Differenzierungsprozesse sind bislang nur in Transplantationsexperimenten *in vivo* beobachtet worden, und da die jeweiligen

Bedingungen nicht bekannt sind, konnten noch keine entsprechenden *in vitro*-Modelle etabliert werden. Die einzige Ausnahme stellt die Differenzierung in Endothelprogenitorzellen bzw. Endothelzellen dar.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde gezeigt, daß Zellen aus dem HSC-Kompartiment in Endothelzellen differenzieren können (Asahara et al., 1997; Gehling et al., 2000; Graf, 2002 und Referenzen darin; Grant et al., 2002). Der Befund kann durch die Existenz einer gemeinsamen Stammzelle für hämatopoetische und Endothelzellen erklärt werden, die „Hämangioblast“ genannt wird. Belege für diese Hypothese sind nicht nur in der Zusammensetzung von embryonalen Blutinseln zu finden, in denen hämatopoetische und Endothelzellen in engster Nähe zu finden sind (Sabin, 1920; Murray, 1932), sondern auch in der Tatsache, daß eine Reihe von Zelloberflächenmarkern wie CD34, CD133, KDR (Kinase insert domain receptor; auch VEGF-R2: Vascular endothelial growth factor-receptor 2) und Tie-2 auf Vorläufern beider Zelltypen exprimiert werden (Pelosi et al., 2002; Übersicht in Asahara & Isner, 2002).

Aufgrund der scheinbar unerwartet vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten von HSC könnte die Etablierung eines Gentransferprotokolls für HSC weitere Therapieoptionen für die Hämophilie A über die rekombinante FVIII-Expression in hämatopoetischen Zellen hinaus bieten.

Diese Auflistung soll die große Attraktivität und das Interesse an HSC für die Gentherapie der Hämophilie A verdeutlichen. Im nächsten Abschnitt wird die Frage diskutiert, welches Vektorsystem für den Gentransfer in HSC am besten geeignet ist.

## **1.5 Lentiviraler Gentransfer in HSC**

### **1.5.1 Gentransfer in HSC**

Für die Etablierung von Gentherapieprotokollen mit HSC als Zielzellen ist eine Eigenschaft dieses Zelltyps besonders zu beachten: Wie bereits in 1.4 erwähnt, sind HSC relativ ruhend und teilen sich nur selten (Brenner, 1996; Wagers et al., 2002a). Eine Zytokin-induzierte Proliferation *ex vivo* durch Eintritt in den Zellzyklus ist zumeist mit Differenzierungsprozessen und zumindest partiellen Einbußen der Repopulierungsfähigkeit im SCID-Transplantationsmodell verbunden (Williams, 1993; Bhatia et al., 1997; Gothot et al., 1998; Glimm et al., 2000). Der ideale Vektor für die Transduktion von HSC ist daher in der Lage, ruhende Zellen zu transduzieren und im Interesse einer dauerhaften Transgenexpression in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Zudem sollte die Kapazität des Vektors die Insertion von mehr als

5 kb Fremd-DNA erlauben, um eine Expressionscassette aus Promotor, BDD FVIII-cDNA und ggf. weiteren regulatorischen Elementen aufnehmen zu können. Diese Bedingungen erfüllen zur Zeit nur lentivirale Vektoren (Tab. 1.2), die im Folgenden näher charakterisiert werden.

Lentivirale Vektoren sind in der Lage, sowohl sich teilende Zellen als auch ruhende Zellen zu transduzieren, da einige lentivirale Proteine - im Gegensatz zu retroviralen Systemen - nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) enthalten, die den Import eines Präintegrationskomplexes aus revers transkribierter viraler DNA und viralen Proteinen in den Zellkern katalysieren (während Retroviren auf die Auflösung der Kernmembran bei der Zellteilung angewiesen sind) (Bukrinsky et al., 1993; von Schwedler et al., 1994; Heinzinger et al., 1994, Gallay et al., 1997). In einer Reihe von Studien konnte die stabile Transduktion von primären und auch von terminal differenzierten Zellen wie HSC (Akkina et al., 1996; Sutton et al., 1998; Evans et al., 1999), prästimulierten Lymphozyten (Costello et al., 2000; Salmon et al., 2000; D. Chinnasamy et al., 2000), Makrophagen (Naldini et al., 1996a), dendritischen Zellen (N. Chinnasamy et al., 2000; Schroers et al., 2000), Neuronen (Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996b; Blömer et al., 1997), Hepatozyten (Kafri et al., 1997; Park et al., 2000a; VandenDriessche et al., 2002; Nguyen et al., 2002) und Muskelzellen (Kafri et al., 1997) verschiedener Spezies erreicht werden. Für HSC konnte im Tiermodell die Repopulierung mit transduzierten Zellen aus Nabelschnurblut (Miyoshi et al., 1999, An et al., 2000; Woods et al., 2000), Knochenmark (Guenechea et al., 2000) und peripherem Blut (Scherr et al., 2002) nachgewiesen werden. Die Eignung lentiviraler Vektoren für die Transduktion von HSC wurde zudem in verschiedenen präklinischen Studien demonstriert (Fanconi-Anämie: Galimi et al., 2002; Beta-Thalassämie: May et al., 2002).

### **1.5.2 Eigenschaften lentiviraler Vektorsysteme**

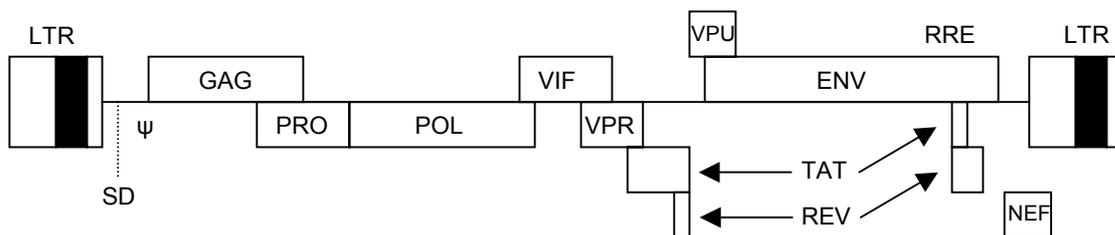
Die meisten der lentiviralen Transgenvektoren sind abgeleitet vom Genom des HIV-1. Abb. 1.5 zeigt schematisch den Aufbau des HIV-1-Provirus in einer infizierten Zelle und die HIV-1-abgeleiteten Konstrukte, die für die Generierung moderner lentiviraler Vektoren verwendet werden (Coffin et al., 1997; Vigna & Naldini, 2000).

Die frühen lentiviralen Vektoren der ersten Generation entstanden durch einfache Deletionen innerhalb des HIV-1-Genoms: Ohne funktionales Verpackungssignal und ohne das komplette *env*-Gen für das Hüllprotein konnten mit diesen Konstrukten transfizierte Zellen keine Viren erzeugen. Die Vektoren kodierten jedoch als Verpackungskonstrukte für sämtliche HIV-1-Strukturproteine und akzessorische Proteine. Die Kotransfektion von zwei

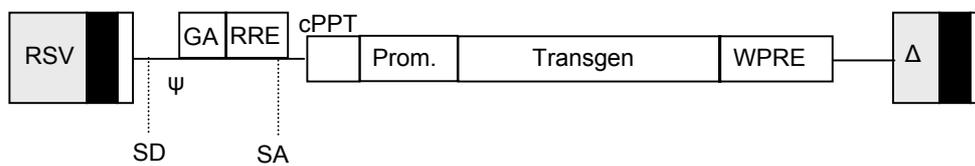
weiteren Konstrukten (ein viraler Transfervektor mit Verpackungssignal und ein Plasmid mit einem Gen für ein Hüllprotein; Prinzip siehe Abb. 1.6) erlaubte dann die Produktion von replikationsdefekten lentiviralen Partikeln.

Um die Wahrscheinlichkeit der Bildung replikationskompetenter Viren durch homologe Rekombination zwischen den drei Konstrukten zu verringern und so die Sicherheit des Systems zu erhöhen, wurden innerhalb des Verpackungskonstruktes weitere Sequenzen deletiert (siehe unten). Ein solcher Vektor der zweiten Generation ist in Abb. 1.5 dargestellt.

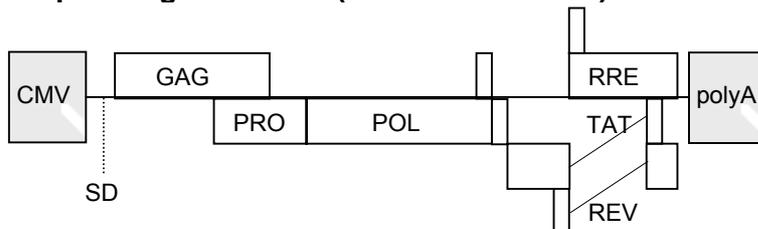
### HIV-Provirus



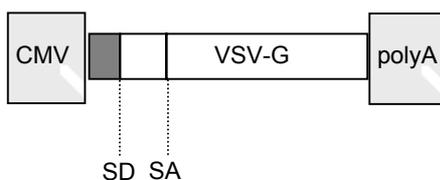
### Selbst-inaktivierender Transfervektor



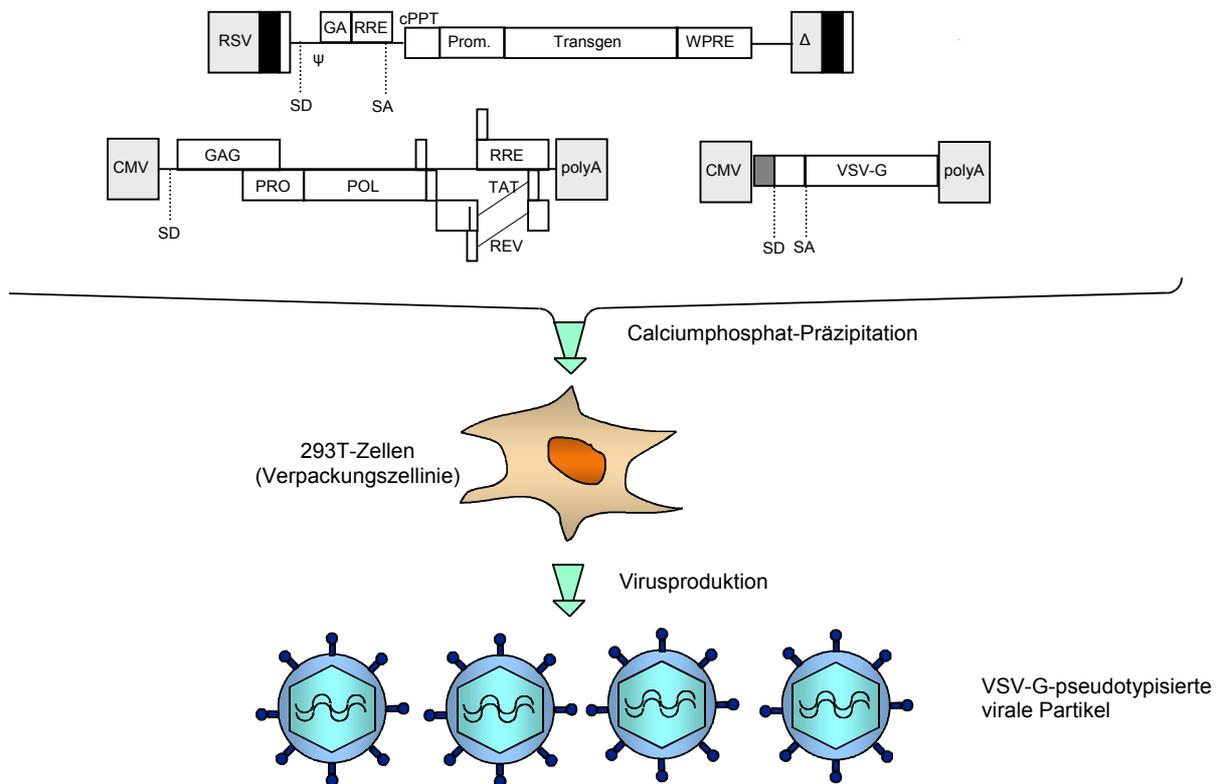
### Verpackungskonstrukt (zweite Generation)



### Pseudotypisierungskonstrukt



**Abb.1.5. Schematische Darstellung des HIV-Provirus und der für die Produktion selbst-inaktivierender, pseudotypisierter lentiviraler Vektoren verwendeten Konstrukte (nach Vigna & Naldini, 2000; Abkürzungen und weitere Erläuterungen siehe Haupttext).**



**Abb. 1.6. Produktion von lentiviralen Partikeln mit einem Drei-Plasmid-System durch Kofektion in eine Verpackungszelllinie.**

Die Eliminierung des *tat*-Gens aus dem System und die Expression von *rev* von einem vierten Plasmid führt zu Vektoren der dritten Generation, die zwar keine gesteigerte Gentransfereffizienz im Vergleich zur zweiten Generation besitzen, aber in bezug auf ihre Sicherheit noch weiter optimiert sind (Vigna & Naldini, 2000; Buchschacher & Wong-Staal, 2000; Trono, 2000; De Palma & Naldini, 2002).

In der vorliegenden Arbeit soll mit einem effizienten Vektorsystem der zweiten Generation, das in Abb. 1.5 dargestellt ist, gearbeitet werden. In diesem System ist mehr als die Hälfte des HIV-1-Genoms deletiert (Naldini et al., 1996a; Trono, 2000). Die für die Produktion des Vektors notwendigen Gene werden auf drei Konstrukte verteilt:

(i) Das Transferkonstrukt stellt das einzige genetische Material dar, das in lentiviralen Partikeln an die Zielzellen weitergegeben wird. Es enthält neben der Transgen-Expressions-cassette nur noch wenige HIV-Sequenzen:

- ein cPPT-Element (siehe unten) 5' des internen CMV-Promotors,
- ein Verpackungssignal ( $\psi$ ), dessen Sequenz mit der *gag*-Sequenz überlappt (Die trunkierte *gag*-Sequenz ist in Abb. 1.5 und Abb. 1.6 als 'GA' bezeichnet.),
- ein 'Rev-responsive element' (RRE) für den Transport viraler RNAs aus dem Kern ins Zytoplasma und
- Sequenzen aus den 5'- und 3'-LTRs (siehe unten), die für die reverse Transkription und Integration des Provirus in das Genom der Zielzelle notwendig sind.

Sämtliche viralen Gene wurden deletiert, so daß keine viralen Proteine exprimiert werden, die von vektorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden könnten. Zudem ist ein System aus einer Spleiß-Donorstelle (SD) und einer Spleiß-Akzeptorstelle (SA) im Konstrukt enthalten.

Die Expressionscassette besteht aus einem internen Promotor (Prom.), dem Transgen und einem regulatorischen Element. Als Promotor werden meist starke virale Promotoren wie der CMV-Promotor (immediate early CMV enhancer/promoter; CMV: Cytomegalievirus) verwendet, der in fast allen humanen Zelltypen exprimiert wird. Auf die für das Transgen kodierende Sequenz folgt ein posttranskriptionales regulatorisches Element aus dem Murmeltier (engl. woodchuck)-Hepatitisvirus (WPRE; Donello et al., 1998), das eine besondere Sekundärstruktur (Haarnadelschleife, 'stem loop') besitzt. Die Anwesenheit des WPRE am 3'-Ende von RNA-Transkripten erhöht die Effizienz des Exports aus dem Kern und möglicherweise auch die Effizienz von RNA-Prozessierungsschritten wie der Polyadenylierung (Zufferey et al., 1999; Popa et al., 2002). Dadurch werden die Konzentrationen der jeweiligen mRNAs in den Zielzellen und nachfolgend auch die Stärke der Proteinexpression von diesen mRNAs erhöht (Zufferey et al., 1999). Die Polyadenylierungsstelle der Transgencassette liegt in der 3'-HIV LTR des Provirus.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, von einem Transfervektor zwei Proteine zu exprimieren. Eine häufig verwendete Modifikation des Vektors besteht in der Insertion einer internen Ribosomenbindestelle (IRES) und einer zweiten Transgen-cDNA zwischen der ersten Transgensequenz und dem WPRE (Pelletier & Sonenberg, 1988; Gingras et al., 1999; Hennecke et al., 2001).

Vor die Expressionscassette wurde eine cPPT-Sequenz (central polypurine tract/central termination sequence) aus dem HIV-*pol* kloniert, die nicht strikt notwendig ist, aber durch Unterstützung des nukleären Imports der revers transkribierten viralen DNA die Transduktionseffizienz in ruhenden Zellen signifikant zu erhöhen vermag (Charneau & Clavel, 1991; Charneau et al., 1992; Zennou et al., 2000; Sirven et al., 2000; Follenzi et al., 2000; VandenDriessche et al., 2002).

Der Vektor enthält HIV-abgeleitete 5'- und 3'-LTRs (long terminal repeats), die allerdings stark modifiziert sind. In der 5'-LTR kann die U3-Region gegen einen starken konstitutiven Promotor wie den RSV-Promotor aus dem Rous-Sarkomvirus ausgetauscht werden. In der 3'-LTR wurden transkriptionelle Enhancer und Promotor der U3-Region deletiert (in Abb. 1.5 mit  $\Delta$  gekennzeichnet). Diese Deletion wird bei der Transduktion dupliziert, so daß im integrierten Provirus sowohl 5'- als auch 3'-LTR diese Deletion aufweisen, die in beiden LTRs jegliche Promotoraktivität ausschaltet. Da genomische virale RNA nicht vom Provirus transkribiert werden kann, werden solche Vektoren "selbst-inaktivierend" (SIN) genannt (Miyoshi et al., 1998).

(ii) In einem Verpackungskonstrukt der zweiten Generation befinden sich die HIV-1-Gene *gag*, *pro*, *pol*, *rev* und *tat*, während *env*, *vpr*, *nef*, *vif* und *vpu*, die für die Vektorproduktion nicht nötig sind, jedoch eine wichtige Rolle in der Virulenz von HIV-1 spielen, komplett deletiert sind. Von diesem Konstrukt werden die essentiellen Strukturproteine und Enzyme des HIV-1-Virions (*gag*, *pro* und *pol*) und die Regulatorproteine Rev (für die Expression von *gag*, *pro* und *pol*) und Tat (als Aktivator für die HIV-LTR-abhängige Transkription; bei Transfervektoren ohne funktionale HIV-1-LTR verzichtbar) exprimiert. Die Transkription erfolgt über den heterologen CMV-Promotor und wird terminiert durch ein Polyadenylierungssignal (polyA). Das Verpackungssignal  $\Psi$  ist nicht funktional, so daß Gene dieses Konstruktes nicht in Virionen verpackt werden und nicht in die zu transduzierenden Zellen gelangen können.

(iii) Die Verwendung eines Konstruktes mit einem heterologen Hüllprotein (VSV-G) anstelle des ursprünglichen *env*-kodierte HIV-Hüllproteins (Pseudotypisierung) erweitert den Tropismus der lentiviralen Partikel von T-Zellen und Makrophagen auf eine breite Auswahl von primären humanen und tierischen Zellen und Zelllinien, da VSV-G nicht an einen spezifischen Proteinrezeptor, sondern recht unspezifisch an Membranphospholipide bindet (Mastromarino et al., 1987). Die Inkorporation des G-Glykoproteins aus dem Vesikulären Stomatitisvirus stabilisiert die Partikel, so daß sie durch Ultrafiltration und Ultrazentrifugation effizient konzentriert werden können (Burns et al., 1993). Auch hier wird die Transkription durch CMV-Promotor und polyA-Signal reguliert.

Die Aufteilung der für die Generierung lentiviraler Partikel notwendigen Gene auf drei Konstrukte und die Deletion der HIV-LTR sollen die Entwicklung pathogener und replikationskompetenter Viren in den transduzierten Zellen verhindern. Im in Abb. 1.5 gezeigten System gelangt nur die genomische RNA des Transfervektors in die transduzierten Zellen, die ohne Transkription des lentiviralen Genoms und ohne Gene für Verpackungs- und Hüll-

proteine keine Virionen produzieren können (Naldini et al., 1996a; Miyoshi et al., 1998). Die Entwicklung replikationskompetenter Viren würde in diesem System eine Serie von homologen Rekombinationsereignissen der Konstrukte untereinander und mit anderen Sequenzen, die die deletierten Regionen ersetzen könnten, erfordern, die extrem unwahrscheinlich ist. Es ist zwar bekannt, daß lentivirale Vektoren mobilisiert werden können, wenn transduzierte Zellen mit Wildtyp-HIV infiziert werden, das als Helfervirus wirkt (Bukovsky et al., 1999; Evans & Garcia, 2000). In diesem Fall kann die genomische RNA des lentiviralen Gentransfervektors aufgrund ihrer  $\psi$ -Sequenz in virale Partikel verpackt werden, deren Proteine vom Wildtyp-HIV kodiert werden. Dieses Phänomen wurde bisher jedoch nicht für SIN-Vektoren beschrieben, die als Proviren ohne Promotoraktivität in der 5'-LTR integrieren. Von SIN-Proviren entstehen daher keine genomischen RNA-Transkripte, sondern nur mRNA ohne  $\psi$ -Sequenz von einem internen Promotor, die nicht verpackt werden kann.

Die Produktion lentiviraler Partikel erfolgt in der Regel durch transiente Kotransfektion der drei beschriebenen Konstrukte in eine Verpackungszelllinie wie 293T (siehe 2.2.2), da die konstitutive hohe Expression von VSV-G und einigen HIV-1-Proteinen zytotoxisch wirkt (Burns et al., 1993; Farson et al., 2001). Für Produktionen im großen Maßstab für Tierversuche oder klinische Studien werden stabile Verpackungszelllinien für Lentiviren auf HIV-1-Basis entwickelt, deren VSV-G-Expression induzierbar ist und somit zeitlich begrenzt werden kann (Farson et al., 2001; Xu et al., 2001).

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Identifizierung von Zielzellen für die Gentherapie der Hämophilie A, die folgende, für eine wirksame und sichere Behandlung wichtigen Voraussetzungen erfüllen: Die Zellen sollen leicht verfügbar sein, expandierbar sein und Zugang zur Zirkulation besitzen. Diese Kriterien werden am besten von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Nabelschnurblut und im peripheren Blut erfüllt. Weitere Vorteile von HSC bestehen in ihrem dauerhaften Beitrag zur Hämatopoese, der eine langfristige FVIII-Expression in verschiedenen Zellpopulationen ermöglichen sollte, und ihrem Potential zur Toleranzinduktion gegen körperfremde Antigene, das aus Stammzelltransplantationen in der Klinik bekannt ist und vor dem Hintergrund der Inhibitorentwicklung durch FVIII-Substitution bei vielen Hämophilie-Patienten eine überaus wichtige Rolle spielt. Das ideale System für den Gentransfer in HSC stellen lentivirale Vektoren dar, die im Gegensatz zu retroviralen Vektoren auch ruhende Zellen transduzieren

können und keinen Eintritt der HSC in den Zellzyklus erfordern, so daß ein Gentransfer unter bestmöglicher Erhaltung der Stammzeleigenschaften möglich ist.

Nach Klonierung FVIII-kodierender lentiviraler Vektoren sollen diese in hämatopoetischen Zelllinien in bezug auf Gentransfereffizienz und FVIII-Expressionsstärke evaluiert werden. In anschließenden Experimenten mit humanen und murinen HSC soll untersucht werden, ob nach Einsatz optimaler Transduktionsbedingungen (d. h. mit Prästimulierung durch Zytokine) eine rekombinante Expression von FVIII in HSC oder aus ihnen differenzierten Zellpopulationen wie Granulozyten und Makrophagen erreicht werden kann.

Da hämatopoetische Zellen und Endothelzellen mit dem Hämangioblasten eine gemeinsame Vorläuferzelle besitzen, soll ferner untersucht werden, ob aus CD34-positiven Stammzellen generierte Endothelprogenitorzellen (EPC) in der Lage sind, therapeutisch relevante FVIII-Mengen zu sezernieren. Endothelzellen haben wie hämatopoetische Zellen *in vivo* einen direkten Zugang zum Blutkreislauf und könnten daher ebenfalls interessante Zielzellen für eine Gentherapie der Hämophilie A darstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ACL <sup>TM</sup> -Analysensystem	Instrumentation Laboratories, Lexington, MA
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Autoradiographie-Film (Hyperfilm <sup>TM</sup> MP)	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	
- für Agarosegele (Horizon 11-14)	Life Technologies, Karlsruhe
- für SDS-PAGE (Mini Protean 3)	Bio-Rad, München
FACScan (Durchflußzytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Gewebeschalen für die Zellkultur	Greiner, Frickenhausen
Heizblock	Techne, Princeton, NJ
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryocontainer	Nalgene, Rochester, NY
Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester, NY
Lichtmikroskope	Zeiss, Göttingen; Leica, Wetzlar
MACS Preseparation Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Magneten (MiniMACS, VarioMACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MoFlo-Durchflußzytometer	Cytomation, Fort Collins, CO
PCR-Block (GeneAmp 2400)	Perkin-Elmer, Weiterstadt
pH-Meßgerät	Knick, Berlin
Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettierhilfe (elektrisch)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen	Dahlhausen, Köln
Stericup-Filter	Millipore, Eschborn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Millipore, Eschborn
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge (L8-M)	Beckman, München
Vivaspin-Konzentratoren	Sartorius, Göttingen
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufeu
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen; Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen; Becton Dickinson, Heidelberg; Corning, Wiesbaden
Zellschaber	Corning, Wiesbaden
Zellsieb (40 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg

## 2.1.2 Reagenzien für zell- und molekularbiologische Arbeiten

(In einzelnen Fällen sind neben den Herstellern bzw. Lieferfirmen die entsprechenden Produktnummern angegeben, um Verwechslungen mit ähnlichen Produkten zu vermeiden oder wenn eine genaue Beschreibung der Produktzusammensetzung zu umfangreich wäre.)

### Zellkulturreagenzien, Medien und Zusätze

AB-Serum	Human Male AB Serum; Sigma, Taufkirchen
Ammoniumchlorid	StemCell Technologies, Vancouver, BC
Calciumchlorid	Sigma, Taufkirchen
CD34-Isolationskit	Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen
Dil-Ac-LDL	Harbor Bio-Products, Norwood, MA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose); Life Technologies (#21969-035), Karlsruhe
DMSO	Dimethylsulfoxid; Sigma, Taufkirchen
DNase I (RNase-frei)	Roche (#776785), Mannheim
dNTPs	New England Biolabs, Frankfurt
EBM-/EGM-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgien
EBM-2-/EGM-2-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgien
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Enfluran	2-Chloro-1,1,2-trifluoro-ethyl-difluoromethylether (Handelsname Ethrane); Abbott, Wiesbaden
FBS	Fötales Rinderserum (für die Zellkultur bei 56°C für 30 Min. hitzeinaktiviert); Seromed (#S0115), Berlin & StemCell Technologies (#06400), Vancouver, BC
Ficoll	Biocoll Separating Solution; Biochrom (#L6115), Berlin
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine (Lösung)	Sigma, Taufkirchen
Gelatine (Pulver)	Merck, Darmstadt
Glutamin	L-Glutamin; BioWhittaker, Verviers, Belgien
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution; Sigma (#H6648), Taufkirchen
HEPES	Sigma, Taufkirchen
HSA	Humanes Serumalbumin (20%ige Lösung); DRK-Blutspendedienst Niedersachsen, Springe
Hydrocortison	Sigma, Taufkirchen
IMDM/2% FBS	Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 2% FBS; StemCell Technologies, Vancouver, BC
Iscove-Medium	Basales Iscove-Medium; Seromed (#FG0465), Berlin
Matrigel	Matrigel Basement Membrane Matrix; Becton Dickinson (#356237), Heidelberg
MEM Nichtessentielle Aminosäure-Lösung (100x)	Life Technologies (#11140-035), Karlsruhe
MEM Vitaminlösung (100x)	Life Technologies (#11120-037), Karlsruhe
MethoCult GF H4434	StemCell Technologies, Vancouver, BC
MethoCult GF M3434	StemCell Technologies, Vancouver, BC
MyeloCult H5100	StemCell Technologies, Vancouver, BC
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe

Natriumpyruvat MEM	Life Technologies, Karlsruhe
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> ); BioWhittaker, Verviers, Belgien
Penicillin-Streptomycin	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Pferdeserum	PAN Biotech, Aidenbach
Polybren	Sigma, Taufkirchen
Protaminsulfat	Sigma (#2162), Taufkirchen
RetroNectin	Takara, Shiga, Japan
RPMI 1640	RPMI 1640 (ohne Glutamin); Biochrom (F1215), Berlin [für die Kultivierung humaner Makrophagen] & Life Technologies (#31870-025), Karlsruhe [für alle anderen Zellen]
StemSep-System	Zellseparationssystem; StemCell Technologies, Vancouver, BC
StemSpan-Medium	StemCell Technologies (#09600), Vancouver, BC
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	0,4%ige Lösung; Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Trypsin-EDTA in HBSS; Life Technologies (#25300-054), Karlsruhe
Wasser	Sigma (#W3500), Taufkirchen
X-Vivo10-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgien

### Zytokine

rhFGF-2	R&D, Wiesbaden
rhFit-3L	R&D, Wiesbaden
rhG-CSF	Amgen, Thousand Oaks, CA
rhIL-3	R&D, Wiesbaden
rhIL-6	R&D, Wiesbaden
rhSCF	R&D, Wiesbaden
rhSCGF-β	PeptoTech, Frankfurt
rhVEGF	R&D, Wiesbaden
rmIL-3	R&D, Wiesbaden
rmIL-6	R&D, Wiesbaden
rmSCF	R&D, Wiesbaden

### Antikörper

anti-FVIII	Enzyme Research Laboratories (#SAF8C-IC), Swansea, UK
anti-Schaf-IgG	Sigma (#A3415), Taufkirchen

(Weitere Antikörper siehe 2.2.8.3)

### Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Acrylamid-Stammlösung	Rotiphere® Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid); Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth (#T846.3), Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
Ampicillin	Roche, Mannheim
APS	Ammoniumperoxodisulfat; Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe

DEPC	Diethylpyrocarbonat; Sigma, Taufkirchen
DNA-Isolationskit	DNeasy™ Tissue Kit; Qiagen, Hilden
Dynabeads	Dynabeads M-280 Streptavidin; Dynal, Oslo, Norwegen
ECL-Lösungen	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce, Rockford, IL
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycogen	Roche (#901393), Mannheim
Größenmarker	
- DNA	SmartLadder; Eurogentec, Seraing, Belgien
- Protein	BenchMark™ Prestained Protein Ladder; Life Technologies, Karlsruhe
Immunochrom® FVIII:C	Baxter, Wien, Österreich
Immunozytm® FVIII:Ag	Baxter, Wien, Österreich
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid; Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Sigma, Taufkirchen
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Frankfurt
LB Agar	Life Technologies (#22700-025), Karlsruhe
LB Broth Base	Life Technologies (#12780-029), Karlsruhe
Manganchlorid	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure; Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Octanate®	FVIII aus Humanplasma; Octapharma, Frankfurt
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1); Roth, Karlsruhe
PCR-Reagenzien	
- AmpliTaq	Perkin Elmer, Weiterstadt
- AmpliTaq Gold	Perkin Elmer, Weiterstadt
- GeneAmp® PCR-Puffer	Perkin Elmer, Weiterstadt
- Magnesiumchlorid	Perkin Elmer, Weiterstadt
- PfuTurbo	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
- Superscript RT/Taq-Mix	Superscript II H-Reverse Transkriptase und Platinum Taq- Polymerase; Life Technologies, Karlsruhe
Plasmid-Maxipräparations- Kits	Qiagen, Hilden; Genomed, Bad Oeynhausen
PVDF-Membran	Roti®-PVDF; Roth, Karlsruhe
QIAEX II- und QIAquick- Gelextraktionskits	Qiagen, Hilden
ReFacto®	FVIII (rekombinant; B-Domänen-deletiert); Pharmacia & Upjohn, Martinsried
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
RNA-Isolationskit	Oligotex Direct mRNA Mini-Kit; Qiagen, Hilden
RNase A	Serva, Heidelberg
RotiLoad1-Auftragspuffer	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Saccharose	Sigma, Taufkirchen
SDS	Natriumdodecylsulfat; Roth, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin; Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen

X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid; Sigma, Taufkirchen
Xylencyanol FF	Sigma, Taufkirchen

### 2.1.3 Oligonukleotide

Sequenzen der DNA-Oligonukleotide (5'→3'; BioSpring, Frankfurt)

#### Detektion von BDD FVIII in transduzierten Zellen

BDD FVIII (human; #1)

5'-Primer: ATG CCA TTG AAC CAA GAG AAA TAG AAG TCA CCT GGG CAA AGC

3'-Primer: GTG GGA TCT TCC ATC TGG ATA TTG CAG GGA GCC CTG CAG

Länge des PCR- bzw. RT-PCR-Fragments: 909 bp

BDD FVIII (human; #2)

5'-Primer: ATG GCC CTC AGC GGA TTG GT

3'-Primer: GCT GCG GGG GCT CTG ATT TT

Länge des PCR- bzw. RT-PCR-Fragments: 1190 bp

$\beta$ -Aktin (human; #1)

5'-Primer: CCA CAC CTT CTA CAA TGA GC

3'-Primer: CCT GGA TAG CAA CGT ACA TG

Länge des PCR- bzw. RT-PCR-Fragments: 593 bp

$\beta$ -Aktin (human; #2)

5'-Primer: ATG ATA TCG CCG CGC TCG TCG TC

3'-Primer: TTC TCG CGG TTG GCC TTG GGG TTC AG

Länge des PCR- bzw. RT-PCR-Fragments: 346 bp

$\beta$ -Aktin (Maus):

5'-Primer: CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG

3'-Primer: TCA TAG ATG GGC ACA GTG TG

Länge des PCR- bzw. RT-PCR-Fragments: 166 bp

Deletion der FVIII B-Domäne (vergleiche Tabelle 3.1)

5'-Primer: Biotin-CTA AAT CAG ATC CTC GGT GCC TG

3'-Primer: TCT TGG TTC AAT GGC AT

5'-Primer: ATG CCA TTG AAC CAA GAG AAA TAG AAG TCA CCT GGG CAA AGC

3'-Primer: Biotin-GTG GGA TCT TCC ATC TGG ATA TTG CAG GGA GCC CTG CAG

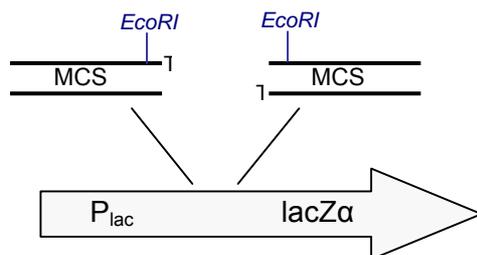
Klonierung der HIV-1 cPPT/CTS-Sequenz: PPTCTSCLA-5 und PPTCTSCLA-3

Cla I

5': CC A TCG ATA CAA ATG GCA TTC ATC C

Cla I

Xho I

3': CC A TCG ATC TCG AGC CAA AGT GGA TCT CTG CTG TCC**2.1.4 Plasmide und Vektoren**Plasmide für KlonierungszweckepCR<sup>®</sup>2.1 (Invitrogen, Karlsruhe)

pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe)



### Plasmide für die Produktion lentiviraler Partikel

(Alle Plasmide besitzen außerhalb der lentiviralen Kassetten einen bakteriellen Replikationsursprung, einen SV40-Replikationsursprung und ein Ampicillin-Resistenzgen.)

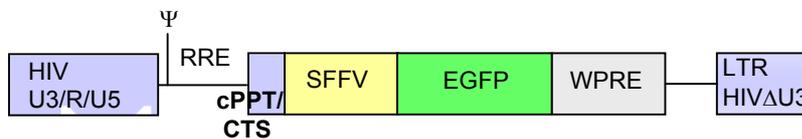
CGWS (Katja Lützenkirchen, GSH)



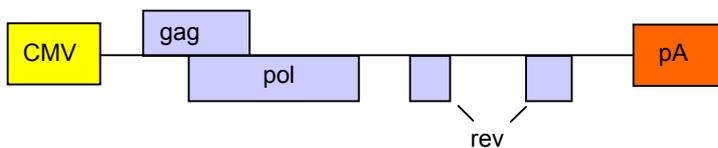
CIGWS (Katja Lützenkirchen, GSH)



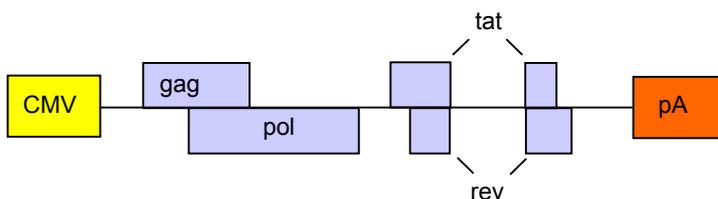
SEW (Adrian Thrasher, London; Demaison et al., 2002)



pCMVΔR8.93 (Romain Zufferey, Genf; Dull et al., 1998)



pCMVΔR 8.91 (Romain Zufferey, Genf; Zufferey et al., 1997)



pMD.G (Romain Zufferey, Genf; Naldini et al., 1996b)



pMD2.VSVG (Luigi Naldini, Turin; Follenzi & Naldini, 2002)



### Abkürzungen (vgl. 1.5.2):

CMV	Immediate early promoter des humanen Cytomegalievirus
cPPT/CTS	Central polypurine tract/central termination sequence (aus HIV-1)
EGFP	Enhanced green fluorescent protein (Sequenz aus pIRES2-EGFP von Clontech; Wildtyp-Gen aus <i>Aequorea victoria</i> : Prasher et al., 1992; optimiertes Protein aus pIRES2-EGFP mit Exzitationsmaximum bei 488 nm und Emissionsmaximum bei 507 nm: Yang et al., 1996)
gag	aus HIV-1
IRES	Internal ribosome entry site (Sequenz aus pIRES2-EGFP von Clontech; IRES aus Encephalomyocarditisvirus [ECMV])
<i>lacZα</i>	<i>lacZα</i> -Fragment (Aminosäuren 1-146 der $\beta$ -Galaktosidase; Komplementierung in <i>trans</i> durch das $\Omega$ -Fragment [z. B. in TOP10F'] ergibt $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität für Blau-Weiß-Selektion)
LTR HIV $\Delta$ U3	Long terminal repeat aus HIV-1 mit Deletion in der U3-Sequenz
MCS	Multiple cloning site
pA	Polyadenylierungssignal
P <sub>lac</sub>	<i>lac</i> -Promotor für die Expression von <i>lacZα</i> in Bakterien
pol	aus HIV-1
rev	aus HIV-1
RRE	Rev-responsive element aus HIV-1
RSV	LTR des Rous-Sarkomvirus
R/U5	R- und U5-Sequenz aus der HIV-1-LTR
SFFV	3'-LTR des Spleen Focus Forming Virus

tat	aus HIV-1
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitisvirus
WPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
ψ	Verpackungssignal aus HIV-1

### 2.1.5 Bakterienstämme

Für alle Transformationen wurden chemisch kompetente *E. coli* verwendet (Hanahan, 1983). Da es insbesondere bei retro- und lentiviralen Vektoren in RecA-exprimierenden Stämmen zu inter- und intramolekularen Rekombinationen kommen kann, wurde nur mit den *recA*-negativen Stämmen HB101, STBL2 (beide von Life Technologies; MAX EFFICIENCY®-Zellen mit Transformationseffizienzen von etwa  $10^9$  CFU/μg) und TOP10F' (TA Cloning Kit; Invitrogen) gearbeitet.

#### HB101

Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrB mrr hsdS20* (*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>) *recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Sm<sup>r</sup>) *xy15 λ<sup>-</sup> leu mtl1*

#### STBL2

Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1lon gyrA96 thi-1 supE44 relA1 λ<sup>-</sup> Δ(lac-proAB)*

#### TOP10F'

Genotyp: F' {*lac I<sup>q</sup> Tn 10* (Tet<sup>R</sup>) *mcrA* } *Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

## 2.1.6 Medien für die Kultur von Bakterien

### LB-Flüssigmedium

LB-Flüssigmedium wurde zuerst als 5fach-Konzentrat angesetzt, indem 100 g LB Broth Base in 1 l dH<sub>2</sub>O gelöst wurden. Das Medium wurde autoklaviert, vor Gebrauch mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und bei Bedarf mit Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt.

### LB-Agar

Zur Herstellung von LB-Agar wurden 32 g LB-Agar in 1 l dH<sub>2</sub>O gegeben und autoklaviert. Nach Abkühlung auf etwa 40°C wurde bei Bedarf Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugegeben, und der Agar wurde in Petrischalen gegossen. Ampicillinhaltige Platten konnten bis zu einem Monat bei 4°C gelagert werden. Bei Blau/Weiß-Selektionen wurden vor Gebrauch 40 µl X-Gal und 20 µl IPTG (beide 40 mg/ml) je LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen und bei 37°C antrocknen gelassen.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen**

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Medien und PBS wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt. Zellzahlbestimmungen wurden mit verbesserten Neubauer-Zählkammern durchgeführt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Zellen aus Suspensionskulturen oder frisch trypsinisierte Zellen im Volumenverhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,4%) gemischt, so daß tote Zellen blau angefärbt wurden, während die lebenden Zellen ungefärbt blieben.

### **2.2.2 Kultivierung und Transfektion von 293T-Zellen und Produktion von lentiviralen Partikeln**

#### **2.2.2.1 Kultivierung von 293T-Zellen**

Die Zelllinie HEK-293T stammt von humanen embryonalen Nierenzellen ab, die mit Typ 5-Adenovirus-DNA transformiert sind. Die Zellen sind zusätzlich stabil transfiziert mit dem großen T-Antigen aus SV40, so daß Plasmide mit dem SV40-Replikationsursprung nach der Transfektion in diesen Zellen amplifiziert werden können (Graham et al., 1977; Fairman & Stillman, 1988). Das Gen für das große T-Antigen wurde mit einem G418-Resistenzgen kotransfiziert (DuBridgde et al., 1987). Vor der Verwendung der Zellen für diese Arbeit erfolgte eine Selektion auf das transfizierte T-Antigen-Konstrukt durch Kultur der Zellen über mehrere Passagen (insgesamt 19 Tage) in Gegenwart von 400 µg/ml G418.

Die Nierenzelllinie 293T wächst als adhärenzte Zelllinie in DMEM mit 10% FBS (Seromed), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Um die Stärke der Adhärenz zu erhöhen, wurden die Kulturgefäße vor Gebrauch mit Gelatine beschichtet (0,1%ige Lösung; Inkubation mindestens 20 Min. bei RT). 293T-Zellen wurden alle 3-4 Tage 1:5 bis 1:10 verdünnt. Dazu wurden sie zunächst in den Kulturgefäßen sanft mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet. Nach einigen Minuten bei RT beginnen sich die Zellen zu lösen. Durch leichtes Klopfen gegen die Flaschen wurde dieser Vorgang beschleunigt, und um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, wurden die Zellen leicht geschüttelt. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt, und die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in frischem Medium ausgesät. Einfrieren und Auftauen erfolgten nach dem gleichen Protokoll wie für die hämatopoetischen

Zelllinien (siehe 2.2.4.2). Für Transfektionsexperimente wurden 293T aus einem Vorrat an Zellen in Flüssigstickstoff aufgetaut und nur bis zu Passage 10 verwendet.

### **2.2.2.2 Transiente Transfektion von 293T**

293T-Zellen sind mit der klassischen Calciumphosphat-Methode mit hoher Effizienz transfizierbar und eignen sich daher sehr gut, um die Funktion von Transgenvektoren (d. h. die Expression von Transgenen) zu testen. Zu diesem Zweck muß nur ein einzelnes Plasmid transient in diese Zellen eingebracht werden.

Bei der Calciumphosphat-Transfektion fällt in einer Mischung aus DNA-Lösung und Calciumlösung in einem Phosphatpuffer ein DNA-Calciumphosphat-Präzipitat aus, das von den adhären 293T durch Phagozytose aufgenommen wird (Koch-Brandt, 1993). Unter optimalen Bedingungen (siehe Protokoll unten) gelangt die DNA in fast allen Zellen aus den Endosomen in den Nukleus, wo sie transient transkribiert wird. Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, kann man die Zellen mit Chloroquin behandeln, das die Ansäuerung der Lysosomen verhindert und so durch die Inhibierung lysosomaler DNasen und/oder Anschwellen und Bersten der Endosomen zu einer höheren DNA-Stabilität in den transfizierten Zellen führt (Luthman & Magnusson, 1983; Guy et al., 1995).

Vierundzwanzig Stunden vor einer Transfektion wurden 293T-Zellen in gelatinisierten Petrischalen oder Kulturflaschen ausgesät, wobei sich für eine 10 cm-Petrischale eine Zellzahl von  $6 \times 10^6$  Zellen als optimal erwies. In T175-Kulturflaschen wurde die dreifache Zellzahl ausgesät, und alle eingesetzten Mengen und Volumina wurden im Vergleich zu den Petrischalen verdreifacht. Im Folgenden ist das Protokoll für die Transfektion von 10 cm-Petrischalen gegeben.

Zwei Stunden vor der Transfektion wurde der Kulturüberstand gegen 8 ml frisches Medium (siehe 2.2.1.2) ausgetauscht. Unmittelbar vor der Transfektion wurde 1 ml Medium mit 1 µl 0,1 M Chloroquin (Endkonzentration 10 µM) zu den Zellen gegeben. Für das DNA-Calciumphosphat-Präzipitat wurden zuerst 20 µg gelöste Plasmid-DNA mit einer 2:1-Mischung aus 0,1xTE-Puffer (1 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) und Wasser (Sigma) auf 450 µl aufgefüllt und mit 50 µl 2,5 M Calciumchlorid-Lösung gemischt. Unter Vortexen wurde dieser Lösung 500 µl 2xHBS-Puffer (281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,12±0,01) zugetropft. Das Präzipitat wurde dann sofort auf die Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken der Schale gut verteilt. Nach einer Inkubation für 15-20 Stunden im Brutschrank wurde das Präzipitat wieder entfernt, die Zellen wurden in der Petrischale sanft mit PBS gewaschen und bekamen frisches Medium.

N.B. Alle hier verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch durch 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. TE-Puffer und Chloroquin-Lösung wurden bei 4°C gelagert. Calciumchlorid-Lösung und 2xHBS-Puffer wurden in kleinen Aliquots bei -20°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut (keine weitere Lagerung bei 4°C). Da kleinste Unterschiede in bezug auf Ionenkonzentrationen und pH-Wert die Qualität des 2xHBS-Puffers und somit der Transfektion extrem beeinflussen, wurden mehrere Chargen angesetzt und ausgetestet, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

### 2.2.2.3 Produktion von Virusüberstand

293T-Zellen werden ebenfalls häufig für die Produktion von retro- und lentiviralen Partikeln verwendet. Hier macht man sich die Tatsache zunutze, daß diese Zelllinie stabil das große T-Antigen aus SV40 exprimiert. Die zur Virusproduktion notwendigen Plasmide (im vorliegenden Fall ein lentiviraler Transgenvektor und zwei akzessorische Konstrukte; vgl. 1.5.2) enthalten je einen SV40-Replikationsursprung, so daß nach der Transfektion die Plasmide innerhalb der Zellen repliziert werden können, was zu einer höheren Anzahl von viralen Transkripten und Proteinen in den Zellen und letztlich zu mehr viralen Partikeln im Kulturüberstand führt.

Um lentivirale Partikel in 293T-Zellen zu produzieren, wurde mit dem in 2.2.2.2 gegebenen Protokoll gearbeitet, das lediglich hinsichtlich der eingesetzten DNA-Menge modifiziert wurde. Insgesamt wurden drei Plasmide in einem festen Mengenverhältnis kotransfiziert (vgl. 2.1.4):

- (1) 20 µg Transgenvektor (z. B. cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS),
- (2) 13 µg pCMVΔR8.93 (enthält *gag*, *pol* und *rev* aus HIV-1) oder  
pCMVΔR8.91 (enthält *gag*, *pol*, *rev* und *tat* aus HIV-1),
- (3) 7 µg pMD.G oder pMD2.VSVG (kodieren beide für das Hüllprotein VSV-G)

Nach der Transfektion über Nacht (15-20 Stunden) wurden die Zellen für die Produktion von viralen Partikeln mit frischem Medium inkubiert. Zu diesem Zweck wurde nur DMEM/FBS/ Glutamin/PenStrep verwendet, das durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert wurde, um Partikel aus dem FBS zu entfernen, die bei einer weiteren Vektorkonzentration störten. Nach 24 Stunden wurde der Virusüberstand abgenommen, durch Zentrifugation (450g, 5 Min., 4°C) und erneuter Sterilfiltration (0,22 µm) von Zelldebris befreit und in Aliquots bei -80°C für Titerbestimmung und Transduktionsexperimente eingefroren. Einmaliges Einfrieren bei -80°C und Auftauen (im Wasserbad bei 37°C) verringerten die Konzentration an infektiösen viralen Partikeln um etwa 20-40% (zur Titerbestimmung siehe 2.2.3). Um allerdings Transduktionen unter definierten Bedingungen und reproduzierbar durchführen zu können,

wurden unkonzentrierter oder konzentrierter Vektor in der Regel nach der Produktion zuerst eingefroren, um das Ergebnis der Qualitätskontrolle abzuwarten.

#### **2.2.2.4 Konzentration von Virusüberstand mit Ultrafiltration und Ultrazentrifugation**

Um bestimmte Zielzellen effizient transduzieren zu können, muß der Vektortiter relativ hoch sein, so daß während der Transduktion mit einer hohen MOI (Multiplicity of infection; Verhältnis zwischen infektiösen Partikeln und zu transduzierenden Zellen) in möglichst kleinem Volumen gearbeitet werden kann. Zwei brauchbare Methoden zur Konzentration lentiviraler Vektoren stellen die Ultrafiltration und die Ultrazentrifugation dar.

Für die Ultrafiltration wurden Vivaspin 15- und Vivaspin 20-Konzentratoren (Sartorius) mit inerten Polyethersulfon-Membranen verwendet, die aufgrund ihrer Porengröße virale Partikel und Makromoleküle von über 100 kDa zurückhalten (MWCO 100.000), während bei einer Zentrifugation in einem Ausschwingrotor der Großteil der Flüssigphase und kleinere Moleküle im Filtratröhrchen aufgefangen werden.

Die Konzentratoren wurden durch Befüllen mit 15 bzw. 20 ml Ethanol (70%) und einer kurzen Zentrifugation (3 Min., 3060g, 20°C) sterilisiert. Durch Entleerung des Filtratröhrchens und zwei weiteren Zentrifugationsschritten mit 15 bzw. 20 ml PBS und dann 5 ml PBS (jeweils 2 Min., 3060g, 20°C) wurden Ethanolreste entfernt, und die Vivaspin-Einheiten wurden mit maximal 15 bzw. 20 ml Virusüberstand befüllt. Die Konzentration erfolgte bei 3060g und 20°C, und die Länge der Zentrifugation war abhängig vom zu konzentrierenden Volumen und vom gewünschten Konzentrationsfaktor. Bei Zentrifugationen von insgesamt etwa 30-60 Min. wurden Virusüberstände auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens eingeeengt, wobei die Ausbeute in der Regel zwischen 60% und fast 100% lag. Konzentrationsfaktoren über 20 waren durch den FBS-Gehalt des Virusüberstandes und die resultierende hohe Viskosität des Konzentrates nicht sinnvoll.

Höhere Konzentrationsfaktoren wurden durch Ultrazentrifugation des Vektors erreicht, der durch den Austausch des lentiviralen Hüllproteins gegen VSV-G hinreichend stabilisiert wurde. Frischer Virusüberstand wurde bei 50.000g für 140 Min. bei 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, und die Viruspellets wurden in 1/100 des Ausgangsvolumens in X-Vivo10-Medium mit 1% HSA, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin aufgenommen. Das Konzentrat wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rotor weiter resuspendiert. Abschließend wurden Partikel und nicht resuspendierte Aggregate durch eine Filtration (0,45 µm) entfernt, und der konzentrierte Vektor wurde

aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum Gebrauch gelagert. Mit diesem Verfahren wurden in der Regel Ausbeuten von 50% und darüber erhalten.

### **2.2.3 Transduktion von 293T-Zellen und Bestimmung des Titers lentiviraler Vektorpräparationen**

Der biologische Vektortiter der lentiviralen Präparationen wurde bestimmt als die Konzentration der Partikel, die 293T-Zellen als Referenz-Zelllinie zu transduzieren vermögen (d. h. als 293T-transduzierende Einheiten pro ml oder kurz als TU/ml mit TU: transducing units). Alle hier verwendeten Konstrukte enthielten EGFP als Markergen, so daß die Transduktionseffizienz durchflußzytometrisch quantifiziert werden konnte.

Vierundzwanzig Stunden vor der Transduktion wurden je  $5 \times 10^4$  Zellen in Vertiefungen von gelatinisierten 24-Well-Platten ausgesät. Zur Transduktion wurde das alte Medium entfernt, und unkonzentrierter Virusüberstand sowie eine Serie von zehnfachen Verdünnungen in DMEM/FBS/Glutamin/PenStrep wurden in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$  je Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die Titerbestimmung bei Konzentraten wurde nur mit verdünnten Viruspräparationen durchgeführt, wobei die Verdünnungsreihen je nach Konzentrationsfaktor und Konstrukt bei 1:10- bis 1:1000-Verdünnungen begannen. Jede Vektorpräparation wurde in mindestens drei Konzentrationen und jeweils in Duplikaten getestet.

Die Transduktion von Zellen mit lentiviralen Vektoren kann durch Zugabe von Polykationen wie Polybren oder Protaminsulfat (als "Brücke" zwischen den negativen Oberflächenladungen von Viruspartikeln und Zellen) und durch Zentrifugation der Transduktionsansätze erhöht werden. Um möglichst alle infektiösen Partikel bei der Titerbestimmung erfassen zu können, wurde zu den Vektorverdünnungen Polybren in einer Endkonzentration von 8  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt, und die 24-Well-Platten wurden bei 1250g und  $32^{\circ}\text{C}$  für 90 Min. zentrifugiert und für 14 bis 18 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde der Virusüberstand durch frisches Medium ersetzt, und nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen durch Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst und durchflußzytometrisch auf EGFP-Expression untersucht (siehe 2.2.7.1).

Der Vektortiter wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Vektortiter in TU/ml} = (\text{Anzahl der eingesetzten Zellen}) \times (\text{Anteil der transduzierten Zellen}) \\ \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Anzahl der eingesetzten Zellen lag immer bei  $5 \times 10^4$  Zellen (ohne Berücksichtigung der Zellproliferation zwischen Aussäen der Zellen und Transduktion). Der Anteil der transduzierten (d. h. EGFP-positiven) Zellen wurde als Zahl zwischen 0 und 1 angegeben.

## 2.2.4 Kultivierung humaner hämatopoetischer Zelllinien

### 2.2.4.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden neben der humanen Nierenzelllinie 293T die humanen hämatopoetischen Zelllinien K562, TF-1, Raji, Jurkat, PLB-985 und KG-1 verwendet. Die wichtigsten Eigenschaften sind in Tabelle 2.1 zusammengefaßt.

Zelllinie	Ursprung	Besondere Eigenschaften	Referenzen
K562	Knochenmark eines Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML)	Zellen mit Differenzierungspotential in Richtung von Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten	Lozzio & Lozzio, 1975
TF-1	Knochenmark eines Patienten mit Erythroleukämie	Zellen mit induzierbarem Differenzierungspotential in Richtung von Erythrozyten und Monozyten/Makrophagen	Kitamura et al., 1989
Raji	Peripheres Blut eines Patienten mit Burkitt-Lymphom	B-Zellen	Pulvertaft, 1964
Jurkat	Peripheres Blut eines Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL)	T-Zellen	Schneider et al., 1977
PLB-985	Peripheres Blut eines Patienten mit akuter nicht-lymphatischer Leukämie (ANLL)	Myelomonoblasten mit induzierbarem Differenzierungspotential in Richtung von Granulozyten und Monozyten	Tucker et al., 1987
KG-1	Knochenmark eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML)	Myeloide Zellen mit koloniebildendem Potential	Koeffler & Golde, 1978

**Tab. 2.1. Übersicht über die in dieser Arbeit kultivierten humanen hämatopoetischen Zelllinien.**

### **2.2.4.2 Kultivierung von humanen hämatopoetischen Zelllinien**

Die hämatopoetischen Zelllinien K562, TF-1, Raji, Jurkat und PLB-985 wachsen als Suspensionszelllinien und wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit 10% FBS (Seromed), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde. Das Medium für die TF-1-Zellen enthielt zusätzlich 5 ng/ml rhIL-3. Die hämatopoetische Zelllinie KG-1 (ebenfalls eine Suspensionszelllinie) wurde in basalem Iscove-Medium mit 12,5% FBS, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

Die Kulturen der hämatopoetischen Zelllinien wurden alle 3 bis 4 Tage verdünnt und auf etwa  $2 \times 10^5$  Zellen je ml eingestellt. Um Wildtyp-Zellen sowie transduzierte Zellen zu kryokonservieren, wurden sie in 80% des jeweiligen Mediums aufgenommen, zu dem 10% FBS (Seromed) und 10% DMSO gegeben wurden. Die Zellen wurden unverzüglich bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie über Jahre gelagert werden können. Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Zellen wurden anschließend zweimal im jeweiligen Kulturmedium gewaschen und dann in frischem Medium in Kultur genommen.

### **2.2.4.3 Transduktion von humanen hämatopoetischen Zelllinien**

Die Transduktionen wurden in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen durchgeführt. Achtundvierzig Stunden vor der Transduktion wurden die Zelldichten auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt, um für die Transduktion Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu erhalten. Je Vertiefung wurden  $10^5$  Zellen mit 500-1000 µl konzentriertem Virusüberstand (Ultrafiltration) in Gegenwart von 4 µg/ml Protaminsulfat (und 5 ng/ml rhIL-3 für TF-1) transduziert. Die Zellen wurden in den Platten zentrifugiert (90 Min., 1250g,  $32^\circ\text{C}$ ), 15-18 Stunden im Brutschrank inkubiert, in PBS gewaschen und im jeweiligen Medium expandiert.

## **2.2.5 Kultivierung von Maus-Knochenmarkzellen**

### **2.2.5.1 Mäuse**

#### Wildtyp-Mäuse (C57BL/6)

Für die Isolation von Wildtyp-Knochenmarkzellen wurden junge adulte Mäuse des Stammes C57BL/6 (Männchen, 17-18 g je Tier) von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen.

### FVIII-defiziente Mäuse (E17)

Für Transduktionsexperimente wurden ebenfalls Knochenmarkzellen aus FVIII-defizienten Mäusen verwendet. Die Zellen wurden aus adulten Männchen des E17-Knockout-Stammes isoliert, die in der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt gehalten wurden.

Die FVIII-Knockout-Mäuse sind durch Insertion einer *neo*-Cassette in das Exon 17 des FVIII-Gens von der embryonalen Stammzelllinie J1 mit dem genetischen Hintergrund des Stammes 129V abgeleitet (Bi et al., 1995) und wurden mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt, so daß Mäuse des Stammes C57BL/6 am besten für vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung der Disruption des FVIII-Gens geeignet sind. Die Mäuse sind charakterisiert durch die Abwesenheit von FVIII:C-Aktivität im Plasma und durch einen überraschend milden Phänotyp (keine spontanen Blutungen). Dennoch bilden sie Antikörper gegen humane FVIII-Präparate, so daß sie sich in diesem Aspekt ähnlich verhalten wie Patienten mit schwerer Hämophilie A (Bi et al., 1996; Qian et al., 1999).

#### **2.2.5.2 Isolation von Maus-KMZ**

Die Mäuse wurden mit Enfluran anästhetisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Knochenmarkzellen wurden mit eiskaltem PBS/5% FBS mit 10 ml-Spritzen und 23G-Kanülen aus Femora und Tibiae gespült und kurz zentrifugiert (5 Min, 250g, 4°C). Die Zellpellets wurden in 1 ml PBS/5% FBS (Seromed) resuspendiert. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen (1 Vol.) mit 9 Volumina Ammoniumchlorid-Puffer (0,8% in 0,1 mM EDTA) versetzt, kurz gevortext und 10 Min. auf Eis inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von PBS/5% FBS abgestoppt, und die Zellen wurden zweimal mit PBS/5% FBS gewaschen. Die Zellen wurden erneut in PBS/5% FBS resuspendiert und durch einen MACS Preseparation Filter mit einer Porengröße von 30 µm gegeben, um Zellklumpen zu entfernen. Abschließend wurden die Zellzahlen bestimmt, wobei die Ausbeute an Knochenmarkzellen je Maus zwischen  $1,5 \times 10^7$  und  $3 \times 10^7$  bei einer Vitalität von mehr als 95% lag.

#### **2.2.5.3 Anreicherung von HSC durch magnetische Zellseparation (MACS)**

Aus den isolierten Mausknochenmarkzellen wurden mit dem StemSep-Zellseparationssystem (StemCell Technologies) hämatopoetische Stammzellen durch die Depletion von differenzierten Blutzellen angereichert. Für die Zelltrennung wurden die Knochenmarkzellen mit folgender Mischung verschiedener biotinylierter Antikörper aus der Ratte inkubiert, die gegen Differenzierungsantigene auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen gerichtet sind: anti-CD5 (T- und B-Lymphozyten), anti-CD45R (T- und B-Lymphozyten, Monozyten,

NK-Zellen), anti-CD11b (Monozyten, Granulozyten, T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen), anti-Gr-1 (Granulozyten), anti-TER119 (erythroide Zellen) und 7/4 (Granulozyten, Makrophagen). Unspezifische Bindung der Antikörper wurde durch Vorinkubation der Zellen mit 5% Rattenserum verhindert. Die biotinylierten Antikörper banden in einem zweiten Inkubationsschritt bispezifische Tetramer-Antikörperkomplexe, die sowohl Biotin als auch Dextran erkannten. Im dritten Schritt wurde ein Kolloid zugegeben, das magnetische Dextran-Eisen-Partikel enthielt, so daß die Zellen, die eines oder mehrere der oben aufgeführten Oberflächenantigene exprimierten, durch magnetische Partikel markiert waren. Die Zellsuspension wurde dann auf eine StemSep-Trennsäule in einem Magnetfeld aufgetragen. Die markierten Zellen wurden zurückgehalten, während sich die unmarkierten Zellen im Eluat befanden. Die eluierten Zellen wurden im Progenitorzell-Assay (siehe 2.2.5.6) hinsichtlich der Effizienz der Anreicherung von koloniebildenden Zellen im Vergleich zu den nicht-depletierten Knochenmarkzellen getestet.

Die magnetischen Zelltrennungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei mit 0,5"-Säulen und einem VarioMACS-Magneten (Feldstärke 0,8-1,0 Tesla) gearbeitet wurde.

#### **2.2.5.4 Kultivierung von Maus-KMZ**

Maus-Knochenmarkzellen wurden in X-Vivo10-Medium kultiviert, das folgende Zusätze enthielt: 1% HSA, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 20 ng/ml rmlL-3, 50 ng/ml rmlL-6 und 50 ng/ml rmSCF (Mikkola et al., 2000). Kulturen wurden verdünnt, wenn sie eine Zelldichte von maximal  $10^6$  Zellen je ml besaßen.

Als Einfriermedium wurde eine Mischung aus 90% FCS (Seromed) und 10% DMSO eingesetzt. Um die Zellen mit einer konstanten Abkühlungsrate einzufrieren, wurden sie zuerst in einem Kryocontainer (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container) in einen -80°C-Gefrierschrank gestellt, bevor sie in Flüssigstickstoff überführt wurden.

Die Zellen wurden in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut, zweimal mit PBS gewaschen, das mit 20 U/ml DNase I supplementiert wurde (10 Min., 450g, 4°C), und im oben beschriebenen Medium kultiviert.

#### **2.2.5.5 Transduktion von Maus-KMZ**

Eingefrorene depletierte Maus-KMZ wurden 24 Stunden vor der Transduktion aufgetaut und in X-Vivo10/HSA/L-Glutamin/Pen-Strep mit rmlL-3, rmlL-6 und rmSCF (2.2.5.4) aufgenommen. Die Transduktion wurde in MULTIWELL-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Falcon) durchgeführt, die nicht für die Zellkultur behandelt waren und für den Versuch mit

RetroNectin beschichtet wurden. RetroNectin ist ein rekombinantes Fragment von humanem Fibronectin, das wahrscheinlich aufgrund verschiedener Bindestellen zur Kolokalisation und zu verbesserten Transduktionsraten von Säugerzellen durch Retro-/Lentiviren führt (Hanenberg et al., 1996; Pollok et al., 1998). RetroNectin wurde zuerst in Wasser gelöst (1 mg/ml), sterilfiltriert (0,22 µm) und mit PBS auf 50 µg/ml verdünnt. Die Vertiefungen der MULTIWELL-Platten wurden durch mindestens zweistündige Inkubation mit RetroNectin beschichtet. Unspezifische Bindestellen wurden durch 30minütige Inkubation mit 2%iger HSA-Lösung blockiert, und die Vertiefungen wurden mit HBSS und PBS gewaschen.

Die Transduktionen wurden in einem Volumen von 200-250 µl durchgeführt. 2,0-2,5x10<sup>4</sup> depletierte Maus-KMZ und Vektor wurden mit Medium ohne Zytokine aufgefüllt, und separat wurden 20 ng/ml rmlL-3, 50 ng/ml rmlL-6 und 50 ng/ml rmSCF sowie 4 µg/ml Protaminsulfat und 50 µM dNTPs zugegeben. Die Zellen wurden in den Platten zentrifugiert (90 Min., 1250g, 32°C) und 15-18 Stunden im Brutschrank inkubiert. Für eine zweite Transduktion wurde die Hälfte des Kulturüberstandes entfernt, und es wurden erneut Vektor (verdünnt in Medium ohne Zytokine), Zytokine, Protaminsulfat und dNTPs zugegeben. Die Ansätze wurden wieder zentrifugiert (s. o.) und für 20-22 Stunden bei 37°C belassen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS aus den Vertiefungen gespült und zuerst mit PBS, dann mit Medium ohne Zytokine gewaschen. 5-10% der Zellen wurden für Progenitorzell-Assays (siehe 2.2.5.6) verwendet, und die restlichen Zellen wurden expandiert.

Das Protokoll ist eine Modifikation des Transduktionsprotokolls von Mikkola et al. (2000).

#### **2.2.5.6 Progenitorzell-Assay (MethoCult-Assay)**

Um den Gehalt an hämatopoetischen Progenitorzellen mit koloniebildendem Potential unter den Knochenmarkzellen bestimmen zu können, wurden Zellen in IMDM-Medium mit 2% FBS (StemCell Technologies) aufgenommen und in MethoCult GF M3434 inkubiert. MethoCult GF M3434 ist ein semisolides Methylcellulose-Medium, das als Zusätze unter anderem die Zytokine rmlL-3, rhIL-6, rmSCF und rh Erythropoetin enthält, die die Bildung von myeloiden, erythroiden und gemischten Kolonien durch hämatopoetische Progenitorzellen unterstützen. Zu 2,7 ml M3434 wurden 3x10<sup>3</sup> depletierte KMZ (d. h. nach StemSep-Separation) oder 3x10<sup>4</sup> Zellen vor Zellseparation in jeweils 300 µl IMDM/2% FBS gegeben und kurz gevortext. Nach einer fünfminütigen Inkubation in einem 37°C-Wasserbad wurden je Ansatz zweimal 1 ml à 10<sup>3</sup> bzw. 10<sup>4</sup> Zellen in 35 mm-Petrischalen ausplattiert und zusammen mit einer dritten, offenen 35 mm-Petrischale, die mit Wasser gefüllt war, in einer 10 cm-Schale bei 37°C inkubiert. Nach 11 Tagen wurden die Kulturen ausgewertet, indem die Anzahl der koloniebildenden Zellen bestimmt wurde. Im Fall von transduzierten Zellen wurden die Kulturen zu diesem Zeitpunkt auf EGFP-Expression mit einem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Für

PCR-Analysen wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in 500 µl PBS überführt, zweimal gewaschen (5 Min., 800g, 4°C), in etwa 50 µl PBS resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Für einen PCR-Ansatz wurden 10 µl eingesetzt.

## **2.2.6 Kultivierung humaner primärer hämatopoetischer Zellen**

### **2.2.6.1 Isolation von PBMC durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation**

Für die Selektion von CD34-positiven Zellen sowie für die Differenzierung von Makrophagen wurden die mononukleären Zellen (MC) aus peripherem Blut über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Als Ausgangsmaterial wurden Leukapheresate, Buffy Coats und Nabelschnurblut eingesetzt. Das Blut wurde zuerst mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt. Die Zentrifugationen wurden in 50 ml-Reaktionsröhrchen durchgeführt, in denen 25 ml Ficoll mit 25 ml verdünntem Blut überschichtet wurden. In der ersten Zentrifugation (30 Min., 850g, 20°C; ohne Bremse) sammelten sich die MC in der Interphase zwischen dem Erythrozytenpellet und der Ficollphase darunter und der thrombozytenhaltigen Plasmaphase darüber. Um aus der MC-Fraktion sowohl die restlichen Thrombozyten als auch Ficollreste zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (10 Min., 300g, 4°C; zuerst ohne Bremse, dann mit Bremse) und abschließend im geeigneten Medium oder Puffer aufgenommen.

### **2.2.6.2 Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-HSC durch MACS**

Die Selektion von CD34-positiven HSC aus MC aus Leukapheresaten und Nabelschnurblut wurde mit dem Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) durchgeführt. MC wurden in 300 µl MACS-Puffer (0,5% HSA/2 mM EDTA in PBS) je  $10^8$  Zellen aufgenommen. Um unspezifische Bindung des anti-CD34-Antikörpers zu vermeiden, wurden zu den Zellen 100 µl FcR Blockierungsreagenz (humanes IgG) je  $10^8$  Zellen gegeben. Die Markierung erfolgte durch Inkubation mit 100 µl CD34 MicroBeads je  $10^8$  Zellen für 30 Min. bei 4°C. Die CD34 MicroBeads sind ein Kolloid aus super-paramagnetischen Kügelchen, die mit monoklonalen anti-CD34-Antikörpern aus der Maus konjugiert sind. Nicht gebundene Microbeads wurden entfernt, indem die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen wurden. Für die Selektion wurde das Zellpellet in MACS-Puffer aufgenommen (maximal  $2 \times 10^8$  Zellen/ml), und die CD34-positiven Zellen wurden nach Anweisungen des Herstellers in zwei aufeinanderfolgenden Separationsschritten aufgereinigt. Für die MACS-Separation wurden MiniMACS-Magneten und MS<sup>+</sup>-Säulen verwendet, die für maximal  $2 \times 10^8$  Zellen geeignet sind. Die unmarkierten Zellen befanden sich im Durchfluß der Säulen (Negativfraktion), während die

markierten, CD34-positiven Zellen außerhalb des Magnetfeldes mit MACS-Puffer eluiert (Positivfraktion) und in geeignetem Medium aufgenommen wurden. Die Effizienz der Anreicherung wurde durch durchflußzytometrische Detektion der CD34-Expression der Zellen in Positiv- und Negativfraktionen überprüft (siehe 2.2.8.3).

### **2.2.6.3 Kultivierung von HSC**

Angereicherte CD34-positive Zellen wurden in StemSpan-Expansionsmedium (StemCell Technologies) kultiviert, das folgende Zusätze enthielt: 10% FBS (StemCell Technologies), 20 ng/ml rhIL-3, 20 ng/ml rhIL-6, 100 ng/ml rhSCF und 100 ng/ml rhFlt-3L (Demaison et al., 2000; Demaison et al., 2002). Kulturen wurden verdünnt, wenn sie eine Zelldichte von maximal  $10^6$  Zellen je ml besaßen.

### **2.2.6.4 Transduktion von HSC**

Die Transduktion von CD34-positiven Zellen erfolgte 24 Stunden nach Selektion und entsprechender Vorstimulierung durch rhIL-3, rhIL-6, rhSCF und rhFlt-3L in RetroNectin-beschichteten MULTIWELL-Platten (24 Vertiefungen, vgl. 2.2.5.5). Zellen ( $8 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$ ) und Vektor (MOI 100) wurden mit dem in 2.2.6.3 beschriebenen Medium auf 800 µl aufgefüllt. Die Transduktion wurde in Gegenwart von 4 µg/ml Protaminsulfat und 50 µM dNTPs und mit 90minütiger Zentrifugation bei 1250g und 32°C durchgeführt. Nach 12-15 Stunden im Brutschrank wurde zum zweiten Mal Vektor (Volumina <150 µl; MOI wie bei der ersten Transduktion) zugesetzt, und die Zellen wurden erneut zentrifugiert. Nach einer weiteren Inkubation von etwa 20 Stunden wurden die Zellen aus den Vertiefungen gespült und mit PBS gewaschen (10 Min., 450g, 20°C). Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und gezählt. Ein kleiner Teil der Zellen wurden für Progenitorzell-Assays eingesetzt (2.2.6.5), und der Rest der Zellen wurde in Gegenwart von rhIL-3, rhIL-6, rhSCF und rhFlt-3L (2.2.6.3) kultiviert.

### **2.2.6.5 Progenitorzell-Assay (MethoCult-Assay)**

Analog zum Progenitorzell-Assay für murine Knochenmarkzellen (2.2.5.6) wurden auch CD34-positive Zellen nach Anreicherung in MethoCult-Medium ausplattiert, um den Gehalt an hämatopoetischen Progenitorzellen mit koloniebildendem Potential in dieser Zellfraktion bestimmen zu können. Zu diesem Zweck wurden 1500 Zellen in 300 µl IMDM-Medium mit 2% FBS (StemCell Technologies) aufgenommen und mit 3 ml MethoCult GF H4434 gemischt. MethoCult GF H4434 enthält als Zusätze unter anderem die Zytokine rhIL-3,

rhIL-6, rhGM-CSF und rhG-CSF, die die Bildung von myeloiden, erythroiden und gemischten Kolonien durch hämatopoetische Progenitorzellen unterstützen. Nach einer fünfminütigen Inkubation in einem 37°C-Wasserbad wurden je Ansatz zweimal 1,1 ml à 500 Zellen in 35 mm-Petrischalen ausplattiert und zusammen mit einer dritten, offenen 35 mm-Petrischale, die mit Wasser gefüllt war, in einer 10 cm-Schale bei 37°C inkubiert. Nach 16 Tagen wurden die Kulturen ausgewertet, indem die Frequenz der koloniebildenden Zellen bestimmt wurde. Im Fall von transduzierten Zellen wurden die Kulturen zu diesem Zeitpunkt auf EGFP-Expression mit einem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

#### **2.2.6.6 Differenzierung von Granulozyten aus CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Für die Differenzierung von Granulozyten aus CD34-positiven Zellen aus peripherem Blut wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in MyeloCult H5100-Medium (StemCell Technologies) mit 1  $\mu$ M Hydrocortison, 10 ng/ml rhG-CSF und 50 ng/ml rhSCF in Kultur genommen. Nach 6 und 12 Tagen wurde die Hälfte des Kulturüberstandes gegen frisches Medium ausgetauscht, und nach insgesamt 15 Tagen wurde die Effizienz der Differenzierung durch durchflußzytometrische Detektion der CD15-Expression bestimmt (siehe 2.2.8.3).

#### **2.2.6.7 Differenzierung und Transduktion von Makrophagen aus PBMC**

Reife Makrophagen wurden aus PBMC differenziert, die durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Buffy Coats gewonnen wurden (Protokoll nach Eisert et al., 2001). Für die Differenzierung wurden die PBMC in einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in einem komplexen Makrophagen-Medium (s. u.) aufgenommen und in einem Teflonbeutel (freundlicherweise von Karin Becker-Peters, GSH Frankfurt, zur Verfügung gestellt) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen aus dem Beutel entnommen. Die Makrophagen waren lichtmikroskopisch durch Größe und Morphologie von den anderen Zellen unterscheidbar, und für weitere Versuche wurde die Zelldichte auf die gewünschte Zahl an Makrophagen eingestellt. Die Zellen wurden in Makrophagen-Medium in Kulturplatten ausgesät und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Alle nicht-adhärenenten Zellen wurden durch zwei Waschschriffe mit Makrophagen-Medium entfernt, so daß eine reine Population von  $2 \times 10^5$  adhärenenten Makrophagen je Vertiefung einer 24-Well-Platte zurückblieb.

Die Basis des Makrophagen-Mediums bildete RPMI 1640-Medium (Biochrom), das mit folgenden Zusätzen supplementiert wurde: 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, MEM Nichtessentielle Aminosäure-Lösung (1x), MEM Vitamin-Lösung (0,4x) und 4% humanes AB-Serum.

Für die Transduktion wurde der Überstand gegen frisches Medium mit Vektor und 8 µg/ml Polybren (Gesamtvolumen 500 µl je Vertiefung) ausgetauscht. Die Ansätze wurden zentrifugiert (90 Min., 1250g, 32°C) und im Brutschrank inkubiert. Nach weiteren 6 Stunden wurde der Vektorüberstand abgenommen, und die Zellen wurden nach der Transduktion in 500 µl Makrophagen-Medium ohne AB-Serum je Vertiefung gehalten, um falsch-positive Ergebnisse bei den Messungen von FVIII-Protein im Kulturüberstand auszuschließen.

## **2.2.7 Differenzierung von humanen Endothelzellen**

### **2.2.7.1 Kultivierung und Transduktion von HUVEC**

HUVEC (humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene) wachsen als adhärente Zellen, die mit Trypsin/EDTA-Behandlung von der Kulturoberfläche abgelöst werden können. Die Zellen wurden bis Passage 4 in EGM-Medium kultiviert, das mit 10% FBS supplementiert wurde. EGM-Medium besteht aus dem Basismedium EBM, das neben 2% FBS noch bovinen Hirnextrakt, hEGF, Hydrocortison, Gentamicin und Amphotericin B enthält.

Für die Transduktion mit lentiviralen Vektoren wurden 24 Stunden zuvor jeweils  $2 \times 10^5$  HUVEC (Passage 3) in Vertiefungen einer 12-Well-Platte ausgesät. Zur Transduktion wurde der Kulturüberstand abgenommen und durch Viruskonzentrate, die mit EGM auf insgesamt 1200 µl aufgefüllt wurden, ersetzt. Außerdem wurden Protaminsulfat und dNTPs in Endkonzentrationen von 4 µg/ml bzw. 50 µM zugesetzt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (90 Min., 1250g, 32°C) und dann im Brutschrank inkubiert. Nach 18 Stunden wurden bei einem Teil der Ansätze die Virusüberstände durch frisches EGM ersetzt. Die restlichen Zellen wurden zum zweiten Mal transduziert durch Zugabe von Viruskonzentraten (Volumina <100 µl; MOI wie bei der ersten Transduktion), Zentrifugation und sechsstündige Inkubation bei 37°C, bevor auch hier das virushaltige Medium gegen frisches Medium ausgetauscht wurde.

### **2.2.7.2 Differenzierung von Endothelprogenitorzellen aus humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Aus humanem Nabelschnurblut wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (2.2.6.1) und MACS-Selektion (2.2.6.2) CD34-positive Zellen bis zu einer Reinheit von 80-95% angereichert. Die Zellen wurden in Endothelzell-Differenzierungsmedium (EDM) mit folgender Zusammensetzung aufgenommen: 80% basales Iscove-Medium, 10% Pferdeserum, 10% FCS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Dieses Basismedium wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) und mit den Wachstumsfaktoren rhVEGF (50 ng/ml), rhFGF-2 (20 ng/ml), rhSCF (50 ng/ml) und rhSCGF-β (20 ng/ml) supplementiert.

Die Zelldichte wurde auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt, und die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, die zuvor mit einer 1%igen Gelatinelösung (Sigma) beschichtet wurden (Inkubation der Platten mit Gelatine für mindestens 30 Min. im Brutschrank, danach einmal mit PBS gewaschen). Bei niedriger Zellausbeute eines Einzelspenders (weniger als  $3 \times 10^6$  Zellen) wurden Zellen verschiedener Spender vereint oder Kulturen mit kleinerem Kulturvolumen angesetzt. Einmal bis zweimal wöchentlich wurde die Hälfte des Überstands abgenommen und gegen frisches EDM ausgetauscht. Im Verlauf der Kultur wurden adhärente Zellen erkennbar, die zum ersten Mal passagiert wurden, bevor die Kulturen konfluent wurden.

### **2.2.7.3 Expansion von Endothelzellen**

Die erste Passage erfolgte in der Regel spätestens drei Wochen nach dem Ansetzen der Differenzierungskulturen. Die Zellen wurden durch Überschichten mit Trypsin/EDTA und kurze Inkubation (2 Min.) bei 37°C im Brutschrank abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von PBS/5% FBS wurden die Zellen pelletiert und nach der ersten Passage in EGM-2-Medium aufgenommen. EGM-2 besteht aus EBM-2 als Basismedium und den Zusätzen FBS (2%), VEGF, rhEGF, rhFGF-2, R<sup>3</sup>-IGF-1, Hydrocortison, Ascorbinsäure, Heparin, Gentamicin und Amphotericin B.

Die größten Expansionsfaktoren konnten erreicht werden, wenn die Zellen in niedrigen Dichten kultiviert wurden. Die Ausgangszelldichte in den Kulturen betrug etwa  $1 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>, und die Zellen wurden nach ungefähr zehnfacher Expansion (deutlich vor Erreichen der Konfluenz) erneut umgesetzt.

#### **2.2.7.4 Transduktion von Endothelzellen**

Für die lentivirale Transduktion wurden 48 Stunden zuvor jeweils  $1 \times 10^4$  Endothelzellen (Passagen 3 bis 8) in Vertiefungen einer gelatinisierten 6-Well-Platte ausgesät. Zur Transduktion wurde der Kulturüberstand abgenommen und durch Viruspräparationen, die mit EGM-2 auf insgesamt 2000  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wurden, ersetzt. Außerdem wurden Protaminsulfat und dNTPs in Endkonzentrationen von 4  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (90 Min., 1250g, 32°C) und dann im Brutschrank inkubiert. Nach 16 Stunden wurde das virushaltige Medium durch frisches EGM-2 ausgetauscht. Die transduzierten Zellen wurden anschließend unter den gleichen Bedingungen wie die untransduzierten Zellen kultiviert und für weitere Analysen expandiert.

#### **2.2.7.5 Matrigel-Assay**

Zu den charakteristischen Eigenschaften von Endothelzellen gehört die Induktion der Bildung gefäßähnlicher Strukturen und polygonaler Netze durch Bestandteile der Basalmembran (Nicosia & Ottinetti, 1990). Eine kommerziell erhältliche Formulierung ist Matrigel (Matrigel Basement Membrane Matrix), eine komplexe Präparation von Basalmembran aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkom. Matrigel enthält als Hauptbestandteile Laminin, Collagen IV und Entactin und dazu verschiedene Wachstumsfaktoren (u. a. EGF, PDGF, IGF-1, TGF- $\beta$ ). Matrigel ist bei einer Temperatur von etwa 4°C flüssig und nimmt bei höheren Temperaturen (Raumtemperatur bis 37°C) schnell eine gelartige bis feste Konsistenz an.

Um 24-Well-Kulturplatten mit Matrigel zu beschichten, wurden Platten und Pipetten bei -20°C vorgekühlt. Matrigel wurde über Nacht auf Eis in einem 4°C-Kühlschrank aufgetaut, in jeweils 500  $\mu\text{l}$  je Vertiefung in die Kulturplatten gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Endothelzellen wurden mit Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst, in EGM-2 resuspendiert und in Zelldichten von  $6 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen in 400  $\mu\text{l}$  je Vertiefung auf das gelierte Matrigel gegeben. Nach 8 bis 10 Stunden wurden die Kulturen auf Gefäßbildung überprüft und sowohl im Phasenkontrast als auch mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE3000) photographiert.

#### **2.2.7.6 Dil-Ac-LDL-Markierung**

Dil-Ac-LDL (acetyliertes Low Density-Lipoprotein, gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Dil [1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyaninperchlorat]) markiert spezifisch Endothelzellen und Makrophagen (Voyta et al., 1984). Dil-Ac-LDL bindet an die Zellen, wird aufgenommen und durch lysosomale Enzyme abgebaut, wodurch Dil freigesetzt wird und in

den intrazellulären Membranen akkumuliert. Die Färbung hat keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen, und die markierten Zellen können trypsiniert werden, so daß eine durchflußzytometrische Analyse möglich ist.

Die Markierung erfolgte durch einstündige Inkubation der adhärennten Zellen mit 2 µg/ml Dil-Ac-LDL in EGM-2 bei 37°C. Danach wurde das Medium abgenommen und durch frisches EGM-2 ausgetauscht. Die Dil-Ac-LDL-Aufnahme wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE3000) und durchflußzytometrisch mit einem FACScan detektiert und quantifiziert.

## **2.2.8 Durchflußzytometrische Analyse und Selektion von Zellen**

### **2.2.8.1 Detektion der EGFP-Expression in transduzierten Zellen**

Alle in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Konstrukte enthielten die EGFP-cDNA, so daß nach jeder Transduktion die EGFP-Expression als Maß für die Transduktionseffizienz durchflußzytometrisch bestimmt wurde. Die Zellen wurden für die Messung vorbereitet, indem sie - nach Trypsin/EDTA-Behandlung bei adhärennten Zellen - in FACS-Puffer (1% FBS/0,1% Natriumazid in PBS) gewaschen und in 1% Formaldehyd in PBS aufgenommen wurden. Die Messung wurde mit einem FACScan (Gerät und CellQuest-Software von Becton Dickinson) durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden in jeder Messung untransduzierte Zellen mitgeführt, die kein EGFP exprimierten.

### **2.2.8.2 Selektion EGFP-positiver Zellen (MoFlo)**

Nach der Transduktion der Zelllinien K562, TF-1, Raji, Jurkat, PLB-985 und KG-1 mit dem bicistronischen Konstrukt C(FVIIIΔB)IGWS wurden die Zellen nach der ersten Bestimmung der Transduktionseffizienz expandiert. Drei Wochen nach Transduktion wurden die Zellen unter Anleitung von Dr. Marie Follo im Zentrum für Klinische Forschung der Universität Freiburg selektioniert. Die transduzierten Zellen wurden durch Zentrifugation auf etwa  $2 \times 10^7$  Zellen/ml konzentriert und mit einem 40 µm-Zellsieb von Aggregaten befreit. Mit einem Hochgeschwindigkeits-Durchflußzytometer (MoFlo, Cytomation) wurde von jeder Kultur ein Teil der Zellen (1% der jeweiligen Population) mit der stärksten EGFP-Fluoreszenz aus den Mischpopulationen heraussortiert. Je Kultur wurden etwa  $1,5 \times 10^4$  Zellen erhalten, die in 500 µl des entsprechenden Mediums aufgenommen und für weitere Analysen expandiert wurden.

### **2.2.8.3 Analyse der Expression von Oberflächenantigenen durch Antikörpermarkierung**

Die Zellen ( $10^5$  für jede Färbung) wurden für die Messung vorbereitet, indem sie - nach Trypsin/EDTA-Behandlung bei adhärennten Zellen - in 5 ml-Rundbodenröhrchen (Falcon #352052) in FACS-Puffer (1% FBS/0,1% Natriumazid in PBS) gewaschen wurden. Der Überstand wurde dekantiert, und zu den Zellen in etwa 100-150  $\mu$ l FACS-Puffer wurden die jeweiligen Antikörper in den in Tab. 2.2 angegebenen Volumina gegeben. Zellen und Antikörper wurden kurz durch Vortexen gemischt und für 20 Min. bei 4°C inkubiert (Ausnahmen: CD31, CD36, KDR bei 20°C). Als Negativkontrollen wurden ungefärbte Zellen und Zellen, die mit den entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert wurden, mitgeführt.

Bei Einfachfärbungen wurden Ansätze mit einem Chromophor-konjugierten Antikörper zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in Fixierlösung (1% Formaldehyd in PBS) aufgenommen.

Bei Doppelfärbungen oder bei unkonjugierten Antikörpern wurden die Zellen einmal in FACS-Puffer gewaschen und dann mit dem entsprechenden zweiten Antikörper oder mit einem RPE-konjugierten Kaninchen-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment inkubiert, das mit allen Maus-IgG und IgM-Antikörpern reagiert (DAKO #R0439). Zellen und Antikörper wurden erneut kurz durch Vortexen gemischt, für 20 Min. bei 4°C inkubiert, zweimal in FACS-Puffer gewaschen und in Fixierlösung aufgenommen.

Das obenstehende Protokoll wurde leicht modifiziert für die Detektion von CD144 (VE-Cadherin). Das Epitop, das vom verwendeten Antikörper erkannt wird, ist Trypsin-sensitiv. Zudem ist die Antikörperbindung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Daher wurden Endothelzellen für diese Färbung nicht durch Trypsin/EDTA-Behandlung, sondern mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst. Für die Färbung wurden die Zellen nach dem Dekantieren des FACS-Puffers dann mit dem Antikörper und mit 1  $\mu$ l 1 M Calciumchlorid-Lösung inkubiert.

Die Messungen wurden mit einem FACScan (Gerät und CellQuest-Software von Becton Dickinson) durchgeführt.

AK-Spezifität	Chromophor	Hersteller/Produkt-Nr.	Species/Isotyp	Volumen [ $\mu$ l]
CD3	PE	BD347347	Maus IgG1	5
CD14	PE	BD347497	Maus IgG2b	5
CD15	unkonjugiert	BD PharMingen 30571A	Maus IgM, $\kappa$	1
CD20	unkonjugiert	BD 347670	Maus IgG1	5
CD31	FITC	Sigma F-8402	Maus IgG1	5
CD34	PE	BD348057	Maus IgG1	5
CD34	PC5	Immunotech PN IM2648	Maus IgG1	5
CD36	unkonjugiert	Sigma C-4679	Maus IgM	2
CD45	FITC	BD347463	Maus IgG1	5
CD133	PE	Miltenyi Biotec 808-01	Maus IgG1	5
CD144	unkonjugiert	Chemicon MAB1989	Maus IgG2a	1
CD146	unkonjugiert	Chemicon MAB16985	Maus IgG1	1
CD146	FITC	Chemicon MAB16985F	Maus IgG1	1
HLA-DR	FITC	BD 347363	Maus IgG2a	5
KDR	unkonjugiert	Sigma V-3003	Maus IgG1	1
Maus-Ig	RPE	DAKO R0439	Kaninchen- F(ab') <sub>2</sub> -Fragm.	4

**Tab. 2.2. Antikörper für die Durchflußzytometrie.** Gegeben sind die Spezifitäten der Antikörper, wobei alle Antikörper Oberflächenantigene auf menschlichen Zellen erkennen.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Arbeiten mit *E. coli***

#### **2.3.1.1 Transformation**

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA durch kompetente Bakterien. Im hier verwendeten Protokoll wurde mit chemisch kompetenten Bakterien gearbeitet (Hanahan, 1983), die zur DNA-Aufnahme mit einem kurzen Hitzeschock behandelt wurden.

Zu 50 µl kompetenten Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, wurden bis zu 1000 ng Plasmid-DNA in maximal 5 µl dH<sub>2</sub>O gegeben. Die Mischung wurde 30 Min. auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt (HB101: 45 Sek., STBL2: 25 Sek.). Nach einer weiteren Inkubation auf Eis von 2 Min. wurden die Zellen auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und 15-18 Stunden inkubiert (HB101: 37°C, STBL2: 30°C).

#### **2.3.1.2 Plasmid-Mikropräparation (Detergenz-Lyse)**

Plasmid-Mikropräparationen sind geeignet, um bei bestimmten Klonierungen mit großen Inserts und vielen Religanden (siehe 2.3.4) in kurzer Zeit eine hohe Anzahl von verschiedenen Klonen untersuchen zu können. Zu diesem Zweck werden Bakterien in einem detergenzhaltigen Puffer lysiert, und nach einer kurzen Aufreinigung mit PCI wird die nukleinsäurehaltige Phase komplett auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Ergebnis ist ein komplexes Bandenmuster aus DNA und RNA, das auch ungeschnittene Plasmide enthält. In der Religationskontrolle liegt die Bande des ungeschnittenen Plasmids in einer bestimmten Höhe, und in allen Klonen, in denen ein Insert von mehr als 1-2 kb in das Plasmid ligiert wurde, ist eine deutliche Verschiebung dieser Bande entgegen der Laufrichtung der DNA im Gel zu sehen, so daß die so identifizierten Kulturen in einer Plasmid-Minipräparation genauer untersucht werden können.

Nach einer Transformation wurden einzelne Klone gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin unter Schütteln (37°C, 200 rpm) kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert (3 Min., 7800g), und ein Teil des Pellets wurde mit einer Pipettenspitze in 30 µl STET-Puffer (234 mM Saccharose, 5% [v/v] Triton X-100, 50 mM EDTA, 25 mM Tris, 1% [v/v] FBS, 1% [v/v] Ficoll, Bromphenolblau) gegeben und kurz gevortext. Nach Zugabe von 40 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde für 10 Sek. gevortext. Die Ansätze wurden dann 8 Min. bei 13.200g und 20°C zentrifugiert, und die obere Phase wurde auf einem Agarosegel (siehe 2.3.3) aufgetrennt.

### **2.3.1.3 Plasmid-Minipräparation (Alkalische Lyse)**

Mit der Plasmid-Minipräparation durch alkalische Lyse wurde Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien für analytische und präparative Zwecke isoliert. Wie bei der Plasmid-Mikropräparation wurden nach einer Transformation einzelne Kolonien gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin unter Schütteln (37°C, 200 rpm) kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert (3 Min., 7800g), in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A; pH 8,0) resuspendiert und mit 300 µl Puffer 2 (100 mM NaOH, 1% [w/v] SDS) versetzt. Die Ansätze wurden durch zehnmaliges Invertieren gemischt, 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 300 µl Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Nach erneutem Invertieren wurden die ausgeflockten Proteine sowie Membranbestandteile und chromosomale DNA durch Zentrifugation (10 Min., 13.200g, 4°C) entfernt, und aus dem wässrigen Überstand wurde durch Zugabe von 600 µl Isopropanol und Zentrifugation (30 Min., 13.200g, 4°C) die Plasmid-DNA präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10-40 µl dH<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.3.1.4 Plasmid-Maxipräparation (Anionenaustauschersäulen)**

Für die Präparationen von Plasmiden im größeren Maßstab (>100 µg) und in Zellkultur-Qualität wurden verschiedene Systeme eingesetzt, die auf Anionenaustauschern basieren. In diesen Protokollen wurden die Bakterien mit einem alkalischen Lyseverfahren aufgeschlossen, und die Lysate wurden über Austauschersäulen gegeben, deren Harz die DNA zu binden vermochte. Durch Erhöhung der Salzkonzentrationen im Puffer wurden zunächst RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen aus den Säulen ausgewaschen. Anschließend wurde die gebundene DNA mit einem Hochsalzpuffer eluiert, durch Isopropanol-Zugabe entsalzt und präzipitiert, mit Ethanol gewaschen und in dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Für zell- und molekularbiologische Arbeiten wurde Plasmid-DNA eingesetzt, die mit einem der folgenden Systeme nach den Angaben der jeweiligen Hersteller präpariert wurde: EndoFree™ Plasmid Mega Kit, EndoFree™ Plasmid Giga Kit (beide von Qiagen) und Jetstar Plasmid Maxiprep Kit (Genomed).

### **2.3.1.5 Herstellung kompetenter Bakterienstämme**

Bakterien des gewünschten Stammes wurden auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen und 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde 8-10 Stunden bei 4°C gelagert, und mit einer Einzelkolonie wurden 4 ml LB-Medium angeimpft und 15 Stunden

unter Schütteln (200 rpm) bei 37°C inkubiert. Mit 1 ml der Flüssigkultur wurden dann 100 ml vorgewärmtes LB-Medium angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm ( $OD_{550}$ ) 0,4 bis 0,5 betrug. Die Kultur wurde sofort in Eiswasser abgekühlt. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt, so daß die Temperatur der Zellen 4°C nicht überschritt. Die Zellen wurden pelletiert (10 Min., 2900g, 4°C), in 15 ml Puffer A (15% [v/v] Glycerin, 10 mM Calciumchlorid, 30 mM Kaliumacetat, 100 mM Rubidiumchlorid, 79 mM Mangan(II)chlorid; pH 5,8) resuspendiert und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut pelletiert (10 Min., 1250g, 4°C), in 4 ml Puffer 2 (15% [v/v] Glycerin, 10 mM MOPS [pH 7,0], 10 mM Rubidiumchlorid, 75 mM Calciumchlorid) resuspendiert, in Aliquots von 100-200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### **2.3.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung**

Die Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA erfolgte spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion einer mit dH<sub>2</sub>O verdünnten Probe bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm ( $E_{260}$ ) entspricht etwa 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis der Extinktionen bei den beiden Wellenlängen ( $E_{260}/E_{280}$ ) ist ein Maß für die Reinheit der DNA- oder RNA-Präparation und sollte für wäßrige Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dieser Wert wird durch Verunreinigungen mit Protein oder Phenol (im Verhältnis zu Nukleinsäuren stärkere Eigenabsorption bei 280 nm) deutlich verringert.

Niedrige DNA-Konzentrationen wurden auch durch einen Vergleich mit einem Mengenstandard auf einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel quantifiziert (vgl. 2.3.3). Die Fluoreszenzintensität der Banden des Standards und der Probe wurden unter UV-Licht verglichen, so daß DNA-Konzentrationen von etwa 250 ng/ml noch meßbar waren.

### **2.3.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese**

#### **2.3.3.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

DNA-Moleküle verschiedener Größe können aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Größe der einzelnen Fragmente ab. In einer Agarosegelmatrix wandern kleinere Fragmente schneller als größere, so daß sich zur Auftrennung großer Fragmente (>1kb) Gele mit einer

niedrigen Agarosekonzentration (0,8-1,0%) am besten eignen, während für kleine Fragmente (<1kb) mit höheren Agarosekonzentrationen (1,2-2,0%) bessere Separationen erzielt werden.

In der Regel wurde mit 1%igen Agarosegelen gearbeitet. 1 g Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 10 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; pH 8,0) in einem Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose gelöst war. Nach kurzer Abkühlung wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,3 µg/ml) zugesetzt, bevor das Gel gegossen wurde. Als Laufpuffer während der Elektrophorese wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Aufzutrennende DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf ein Gel mit 0,2 Volumina Ladepuffer (6x: 40% [w/v] Saccharose, 0,25% [w/v] Bromphenolblau, 0,25% [w/v] Xylencyanol FF in DEPC-Wasser (0,1% [w/v] DEPC in dH<sub>2</sub>O)) versetzt, damit sie in die Geltaschen absinken konnten. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen und zur Mengenabschätzung wurde zudem ein Größenmarker (SmartLadder mit Banden zwischen 200 bp und 10 kb) mitgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid, das bei UV-Einstrahlung orangefarben fluoresziert.

### **2.3.3.2 Isolation von DNA aus Agarosegelen**

Wenn für Klonierungszwecke DNA-Fragmente nach der Auftrennung durch Gelelektrophorese aus der Agarose eluiert werden mußten, wurden das QIAquick Gel Extraction Kit oder das QIAEX II Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Beide Systeme beruhen auf der selektiven Adsorption gelöster DNA an Silikagel-Partikel (QIAEX II) oder an eine Silikagel-Membran (QIAquick) bei hoher Salzkonzentration, so daß nach einigen Waschschritten DNA eluiert werden kann, die nicht mit Agarose, Salzen, Farbstoffen und Nukleotiden kontaminiert ist.

## **2.3.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**

### **2.3.4.1 Restriktion von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden mit Restriktionsendonukleasen (Typ II) sequenzspezifisch geschnitten. Diese Enzyme erkennen in der Regel bestimmte Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren in doppelsträngiger DNA, innerhalb welcher die Phosphodiesterbindungen der beiden Stränge gespalten werden. Die Aktivität der Enzyme wird in Einheiten/ml angegeben, wobei eine Einheit 1 µg Plasmid-DNA in einer Stunde in einem Volumen von 50 µl unter definierten Bedingungen (Temperatur, Puffer) komplett schneidet.

Restriktionen wurden durchgeführt, indem DNA mit einem fünf- bis zehnfachen Überschuss an Enzym im vom Hersteller empfohlenen Puffer und bei der entsprechenden Temperatur für ein bis zwei Stunden inkubiert wurde. Restriktionen mit zwei oder drei Enzymen erfolgten in je einem Ansatz, wenn die Pufferbedingungen kompatibel waren. Ansonsten wurde die DNA seriell von den einzelnen Enzymen geschnitten und zwischen den Reaktionen durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

Im ersten Schritt wurde dabei die DNA in wässriger Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt, um Protein-DNA-Bindungen zu dissoziieren und um die Proteine auszufällen. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen, im Volumenverhältnis 1:1 mit Chloroform gevortext und erneut abgenommen. Aus dieser Lösung wurde durch Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol (abs.), 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 20 µg Glycogen bei 30minütiger Zentrifugation (13.200g, 4°C) die DNA präzipitiert. Die DNA wurde mit Ethanol (70%) gewaschen, luftgetrocknet, in Wasser gelöst und für die nächste Reaktion verwendet.

#### **2.3.4.2 Dephosphorylierung linearer DNA**

Von linearisierter Vektor-DNA, in die ein zweites DNA-Fragment ligiert werden sollte, wurden die 5'-Phosphatgruppen abgespalten, um eine Religation des Vektorfragmentes ohne Insertion zu vermeiden. Nach der Restriktion der Vektor-DNA wurde die entsprechende Endonuklease hitzeinaktiviert, und Alkalische Phosphatase wurde in einer Konzentration von 1 Einheit je µg Vektor-DNA zum Restriktionsansatz gegeben, wobei für Restriktion und Dephosphorylierung ein kompatibler Puffer ausgewählt wurde. Der Ansatz wurde für 60 Min. bei 37°C inkubiert, und die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (20 mM Endkonzentration) gestoppt. Die DNA wurde anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion oder über Gelextraktion aufgereinigt.

#### **2.3.4.3 Modifikation überhängender DNA-Enden**

DNA-Fragmente mit überhängenden Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* behandelt, um 5'-überhängende Enden zu glatten Enden aufzufüllen oder um 3'-überhängende Enden zu entfernen. Die DNA wurde dazu in einer Konzentration von 50 µg/ml im geeigneten Reaktionspuffer aufgenommen und mit 100 µM dNTPs und Klenow-Fragment (1 Einheit/µg DNA) versetzt. Nach Inkubation von 15 Min. bei 37°C wurde die Reaktion durch EDTA-Zugabe (10 mM Endkonzentration) und anschließende zehninminütige Inkubation bei 75°C abgestoppt. Die DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion oder über Gelextraktion aufgereinigt.

#### **2.3.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Unter der Ligation von DNA-Fragmenten versteht man die Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle durch die Bildung neuer Phosphodiesterbindungen. Für eine Ligation mit der T4-DNA-Ligase müssen freie 5'-Phosphate und 3'-Hydroxylgruppen gegeben sein.

In einem Standardligationsansatz von 20 µl wurden 10-100 ng Vektor-DNA, ein variabler molarer Überschuss (4fach bis 50fach) an zu inserierender DNA, Ligasepuffer und 400 Einheiten T4-DNA-Ligase eingesetzt. Zur Bestimmung der Menge an Insert-DNA wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Insert [ng]} = \text{Vektor [ng]} \times (\text{Insertgröße [kb]} / \text{Vektorgröße [kb]}) \times \text{Ratio Insert/Vektor}$$

Die Ligation wurde bei 16°C für 15-18 Stunden durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden Ansätze mitgeführt, die entweder nur Vektor-DNA oder nur Insert-DNA enthielten.

Für die Subklonierung von PCR-Fragmenten wurde mit dem TA Cloning Kit gearbeitet. PCR-Fragmente mit 3' A-überhängenden Enden können direkt in den linearisierten Vektor pCR®2.1 mit 3' T-Überhängen ligiert werden. Ein Ligationsansatz bestand aus 50 ng Vektor, 10 ng PCR-Produkt und T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer. Die Ligation erforderte eine Inkubation von 10-15 Stunden bei 14°C.

### **2.3.5 Amplifikation von DNA-Sequenzen durch PCR**

#### **2.3.5.1 Isolation genomischer DNA aus Säugerzellen**

Für die Isolation genomischer DNA wurde das DNeasy Tissue Kit von Qiagen benutzt. Säugerzellen werden durch Proteinase K-Behandlung lysiert, und das Lysat wird auf eine Säule mit einer Silikagel-Membran aufgetragen, die DNA selektiv binden kann. Nach zwei Waschschrritten wird die DNA in Puffer eluiert und kann anschließend für PCR-Reaktionen verwendet werden.

Die Isolation genomischer DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (DNeasy Protocol for Cultured Animal Cells). Um RNA-freie DNA zu erhalten, beinhaltete das Protokoll die Zugabe von 2 mg/ml RNase A vor der Zellyse.

### **2.3.5.2 Amplifikation von DNA durch PCR**

Zur Detektion von BDD FVIII-cDNA in transduzierten Zellen wurden sowohl FVIII- als auch  $\beta$ -Aktin-spezifische Oligonukleotidpaare eingesetzt (Tab. 2.3). Die PCR-Ansätze für  $\beta$ -Aktin sollten als Kontrolle dienen und zeigen, daß die eingesetzte DNA-Menge in allen Ansätzen ungefähr gleich war und daß das Fehlen von FVIII-Banden in den jeweiligen PCRs auf die Abwesenheit der FVIII-cDNA und nicht etwa auf unzureichende Menge oder Qualität der verwendeten genomischen DNA zurückzuführen war.

Weitere PCR-Ansätze waren zu Klonierungszwecken notwendig (Tab. 2.4). Für die PCR #3 wurden als Vorlagen zwei DNA-Einzelstränge aus #1 und #2 eingesetzt, die mit Streptavidin-konjugierten Magnetkügelchen (Dynabeads M-280 Streptavidin) nach Angaben des Herstellers isoliert wurden (vgl. Abb. 3.2 und Tab. 3.1).

### **2.3.5.3 Quantifizierung von integrierter DNA in Zellen**

Für die Charakterisierung der Effizienz des Gentransfers in hämatopoetische Zellen wurden die mittleren Kopienzahlen von BDD FVIII-cDNA in transduzierten Zellen durch semi-quantitative PCR bestimmt. Zusätzlich zu den PCRs mit definierten Mengen genomischer DNA wurden Ansätze mit Mischungen von Plasmid-DNA und genomischer DNA mitgeführt. Die Menge an genomischer DNA war in allen Ansätzen konstant und entsprach der DNA-Menge in etwa 15.000 Zellen (100 ng bei humanen Zellen, 90 ng bei murinen Zellen). Für die Kalibrierung wurde DNA aus Zellen eingesetzt, die untransduziert oder mit einem EGFP-Kontrollvektor transduziert waren, um in allen Reaktionen möglichst identische Bedingungen zu erreichen. Die Anzahl der BDD FVIII-cDNA wurde durch Verdünnungen mit den Plasmiden C(FVIII $\Delta$ B)IGWS und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS eingestellt.

Die Ethidiumbromid-vermittelte Fluoreszenz der PCR-Banden in einem Agarosegel wurde mit der Quantity One-Software (BioRad) quantifiziert. Die Bandenintensitäten der Kalibrationskurve standen in einem linearen Verhältnis zur mittleren Kopienanzahl der FVIII-cDNA im PCR-Ansatz, so daß die Auswertung über lineare Regression erfolgte.

	BDD FVIII (human; #1)	BDD FVIII (human; #2)	$\beta$ -Aktin (human; #1)	$\beta$ -Aktin (human; #2)	$\beta$ -Aktin (Maus)
DNA-Vorlage	100 ng genom. DNA (hämatopoet. Zellinien)	100 ng genom. DNA (primäre Zellen)	100 ng genom. DNA (hämatopoet. Zellinien)	100 ng genom. DNA (primäre Zellen)	90 ng genom. DNA (primäre Zellen)
Oligonukl.	0,2 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M
Puffer	GeneAmp® PCR-Puffer	GeneAmp® PCR-Puffer	GeneAmp® PCR-Puffer	GeneAmp® PCR-Puffer	GeneAmp® PCR-Puffer
+ MgCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	+ 0,5 mM
dNTPs	200 $\mu$ M				
DNA- Polymerase	0,5 U AmpliTaq	2,5 U AmpliTaq	0,5 U AmpliTaq	2,5 U AmpliTaq	2,5 U AmpliTaq
PCR-Profil	2 Min. 94°C  20 Zyklen (30 Sek. 94°C, 45 Sek. 58°C, 90 Sek. 72°C)	5 Min. 95°C  25 Zyklen (30 Sek. 95°C, 45 Sek. 60°C, 90 Sek. 72°C)	2 Min. 94°C  20 Zyklen (30 Sek. 94°C, 45 Sek. 58°C, 90 Sek. 72°C)	5 Min. 95°C  29 Zyklen (30 Sek. 95°C, 30 Sek. 60°C, 45 Sek. 72°C)	5 Min. 95°C  25 Zyklen (30 Sek. 95°C, 45 Sek. 55°C, 60 Sek. 72°C)
		10 Min. 72°C		10 Min. 72°C	10 Min. 72°C
Volumen [ $\mu$ l]	25	50	25	50	50

**Tab. 2.3. Bedingungen für BDD FVIII- und  $\beta$ -Aktin-PCR-Ansätze.** Die Oligonukleotidpaare BDD FVIII (human; #2) und  $\beta$ -Aktin (Maus) wurden ebenfalls für PCR-Ansätze mit Kolonien aus MethoCult M3434 (vgl. 2.2.5.6) verwendet, wobei jeweils 38 Zyklen durchgeführt wurden.

Die Menge an eingesetzter genomischer DNA entsprach in allen Ansätzen jeweils 15.000 Zellen (Ausnahme: Zellen aus MethoCult-Assays). Als Puffer wurde GeneAmp® PCR-Puffer verwendet (Zusammensetzung des 10x Puffers: 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% [w/v] Gelatine). Die Reaktionsansätze wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1% [v/v]) auf das endgültige Volumen aufgefüllt.

	PCR #1 (vgl. Abb. 3.2)	PCR #2 (vgl. Abb. 3.2)	PCR #3 (vgl. Abb. 3.2)	PPTCTSCLA-5 & PPTCTSCLA-3
DNA-Vorlage	pSP64-FVIII	pSP64-FVIII	Biotinylierte Einzelstränge aus #1 und #2	100 pg Plasmid (HIV-1 LAI; Myers al., 1989)
Oligonukl.	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,4 µM
Puffer	GeneAmp® PCR- Puffer II	GeneAmp® PCR- Puffer II	GeneAmp® PCR- Puffer II	Pfu-Puffer
+ MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM	-
dNTPs	200 µM	200 µM	50 µM	200 µM
DNA-Polymerase	2,5 U AmpliTaq Gold	2,5 U AmpliTaq Gold	2,5 U AmpliTaq Gold	2,5 U PfuTurbo
PCR-Profil	5 Min. 94°C  25 Zyklen (60 Sek. 94°C, 40 Sek. 45°C, 120 Sek. 72°C)  7 Min. 72°C	5 Min. 94°C  25 Zyklen (60 Sek. 94°C, 40 Sek. 60°C, 120 Sek. 72°C)  7 Min. 72°C	10 Min. 94°C  35 Zyklen (60 Sek. 94°C, 60 Sek. 65°C, 180 Sek. 72°C)  7 Min. 72°C	5 Min. 95°C  35 Zyklen (60 Sek. 95°C, 120 Sek. 60°C, 120 Sek. 72°C)  10 Min. 72°C
Volumen [µl]	50	50	50	50

**Tab. 2.4. Bedingungen für PCR-Ansätze zu Klonierungszwecken.** Für die PCR-Ansätze wurden die AmpliTaq Gold-DNA-Polymerase mit GeneAmp® PCR-Puffer II (Zusammensetzung des 10x Puffers: 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3) oder die PfuTurbo-DNA-Polymerase im entsprechenden Puffer verwendet (Zusammensetzung des 10x Puffers: 100 mM KCl; 100 mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 200 mM Tris-HCl, pH 8,75; 20 mM MgSO<sub>4</sub>; 1% Triton X-100; 1 mg/ml BSA). Die Reaktionsansätze wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1% [v/v]) auf das endgültige Volumen aufgefüllt.

## 2.3.6 Detektion von mRNA durch RT-PCR

### 2.3.6.1 Isolation von Gesamt-RNA und polyA<sup>+</sup>-RNA aus Säugerzellen

Für RT-PCR-Reaktionen wurde sowohl Gesamt-RNA als auch polyA-positive mRNA eingesetzt, die ungefähr 1-5% der Gesamt-RNA in der Zelle ausmacht.

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus hämatopoetischen Zelllinien wurde das RNeasy Kit von Qiagen benutzt. Säugerzellen werden in einem Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffer

lysiert, der RNasen inaktiviert. Das Lysat wird auf eine Säule mit einer Silikagel-Membran aufgetragen, die RNA selektiv binden kann. Nach zwei Waschschrritten wird die RNA in Wasser eluiert und kann anschließend für RT-PCRs verwendet werden. Die Isolation von mRNA folgte den Angaben des Herstellers (RNeasy Mini Protocol for the Isolation of Total RNA from Animal Cells).

PolyA<sup>+</sup>-RNA aus primären humanen und murinen Zellen wurde mit dem Qiagen Oligotex Direct mRNA Mini-Kit isoliert. Nach der Lyse der Zellen unter denaturierenden Bedingungen wird die mRNA mit ihren polyA-Enden an Polystyrol-Latex-Partikel gebunden, die mit dC<sub>10</sub>T<sub>30</sub>-Oligonukleotiden kovalent beschichtet sind. Andere RNA-Moleküle wie rRNA und tRNA werden nicht gebunden und unter Hochsalz-Bedingungen ausgewaschen. Durch Reduktion der Osmolarität werden die dT:A-Bindungen destabilisiert, so daß die polyA<sup>+</sup>-mRNA eluiert werden kann. Die Isolation folgte dem Protokoll des Herstellers für die Isolation von polyA<sup>+</sup>-mRNA aus 1-5x10<sup>6</sup> Säugerzellen. Die RNA wurde abschließend in 40 µl Elutionspuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

### **2.3.6.2 Detektion spezifischer mRNAs durch RT-PCR**

Zur Detektion von BDD FVIII-mRNA in transduzierten Zellen wurde das Superscript One-Step RT-PCR-System mit Platinum Taq (Life Technologies) verwendet. Dieses System enthält einen Enzym-Mix aus rekombinanter Taq-DNA-Polymerase und einer Reversen Transkriptase, so daß die cDNA-Synthese und die anschließende PCR in einem Ansatz erfolgen können. Für die Detektion von BDD FVIII-mRNA und von β-Aktin-mRNA (als Kontrolle für die Qualität der mRNA) wurden verschiedene BDD FVIII- und β-Aktin-spezifische Oligonukleotide eingesetzt (Tab. 2.5).

Um Signale durch DNA-Kontamination in den RNA-Präparationen auszuschließen, wurden immer Kontrollansätze mit RNA und AmpliTaq-DNA-Polymerase anstelle des Enzym-Mixes mitgeführt. Positiv- und Negativkontrollen für die PCR bestanden aus BDD FVIII-positiver DNA bzw. Wasser als Vorlagen.

### **2.3.7 Detektion von FVIII auf Proteinebene**

Um FVIII-Protein im Zellkulturüberstand oder im Plasma nachzuweisen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen gibt es Verfahren, um die Aktivität des FVIII-Proteins (FVIII:C) zu bestimmen wie den Einstufen-Gerinnungstest (Mangelplasma-Assay, 2.3.7.2) oder den chromogenen Assay (2.3.7.3). Außerdem kann mit einem ELISA (2.3.7.4) oder

	BDD FVIII (human; #1)	BDD FVIII (human; #2)	$\beta$ -Aktin (human; #1)	$\beta$ -Aktin (human; #2)	$\beta$ -Aktin (Maus)
RNA-Vorlage	Gesamt-RNA (hämatopoet. Zelllinien)	polyA <sup>+</sup> -RNA (primäre Zellen)	Gesamt-RNA (hämatopoet. Zelllinien)	polyA <sup>+</sup> -RNA (primäre Zellen)	polyA <sup>+</sup> -RNA (primäre Zellen)
Oligonukl.	0,2 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M
Puffer	2x Reaction Mix				
Enzyme	1 $\mu$ l RT/Taq- Mix				
PCR-Profil	30 Min. 55°C, 2 Min. 94°C;  10 Zyklen (30 Sek. 94°C, 45 Sek. 60°C, 90 Sek. 72°C)	30 Min. 55°C, 2 Min. 94°C;  40 Zyklen (30 Sek. 95°C, 45 Sek. 60°C, 90 Sek. 72°C)	30 Min. 55°C, 2 Min. 94°C;  10 Zyklen (30 Sek. 94°C, 45 Sek. 60°C, 90 Sek. 72°C)	30 Min. 55°C, 2 Min. 94°C;  30 Zyklen (30 Sek. 95°C, 45 Sek. 60°C, 90 Sek. 72°C)	30 Min. 55°C, 2 Min. 94°C;  28 Zyklen (30 Sek. 95°C, 45 Sek. 55°C, 60 Sek. 72°C)
	20 Zyklen (30 Sek. 94°C, 45 Sek. 58°C, 90 Sek. 72°C)	10 Min. 72°C	20 Zyklen (30 Sek. 94°C, 45 Sek. 58°C, 90 Sek. 72°C)	10 Min. 72°C	10 Min. 72°C
Volumen [ $\mu$ l]	50	50	50	50	50

**Tab. 2.5. Bedingungen für RT-PCR-Ansätze.** Reverse Transkription und PCR wurden in einem Ansatz mit BDD FVIII- bzw.  $\beta$ -Aktin-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die Reaktionen fanden in dem zum Enzym-Mix gehörenden Puffer (Zusammensetzung des 2x Reaction Mix: u.a. 0,4 mM dNTPs, 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>) statt. Die Reaktionsansätze wurden mit DEPC-Wasser (0,1% [v/v]) auf 50  $\mu$ l aufgefüllt.

über Western Blotting (2.3.7.5) FVIII-Protein (FVIII:Ag) nachgewiesen werden. Der Western Blot verfügt über die niedrigste Sensitivität der genannten Methoden, so daß in manchen Fällen eine FVIII-Anreicherung über Ultrafiltration durchgeführt wurde (2.3.7.1)

### 2.3.7.1 Konzentration von FVIII-Kulturüberstand durch Ultrafiltration

Wie bei der Konzentration von viralem Überstand durch Ultrafiltration (2.2.2.4) wurden auch für die Anreicherung von FVIII aus Kulturüberstand Vivaspin 20-Konzentratoren (Sartorius) mit inerten Polyethersulfon-Membranen verwendet. Da die erwarteten Proteinketten über

80 kDa lagen, wurde eine kleinere Porengröße gewählt (MWCO 30.000), so daß alle gewünschten Proteine ohne Verlust aufkonzentriert werden konnten.

Für die Anreicherung wurde Kulturüberstand von fast konfluenten Endothelzellkulturen verwendet, die für 20-24 Stunden in EGM-2 ohne FBS gehalten wurden (12 ml je T75-Flasche). Einige der im FBS enthaltenen Proteine wie Albumin sind deutlich größer als 30 kDa und würden ebenfalls angereichert, was die Viskosität des Konzentrates erhöhte und den maximal erreichbaren Konzentrationsfaktor deutlich verringerte.

Die Konzentratoren wurden mit 20 ml Kulturüberstand befüllt und bei 3060g und 20°C zentrifugiert. Die Länge der Zentrifugation war abhängig vom zu konzentrierenden Volumen und vom gewünschten Konzentrationsfaktor. Für eine Einengung von 30-60 ml um einen Faktor 100-400 waren Zentrifugationen von insgesamt etwa 45-120 Min. erforderlich. Die Konzentrate wurden anschließend im chromogenen Assay, ELISA und Western Blot auf FVIII:C- bzw. FVIII:Ag-Gehalt getestet.

#### **2.3.7.2 Quantifizierung von FVIII:C mit Einstufen-Gerinnungstest**

Der Einstufen-Gerinnungstest oder Mangelplasma-Assay beruht auf der Messung der APTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) mit einem ACL<sup>TM</sup>-Analysensystem von Instrumentation Laboratories, das nach dem Prinzip des Zentrifugalanalysators arbeitet. In einer Mischung von FVIII-defizientem Plasma und der zu messenden Probe wird durch bovines Kephalin und mikrokristalline Kieselgur das endogene Gerinnungssystem voraktiviert. Durch Zugabe von Ca<sup>2+</sup> wird die Gerinnung gestartet. Die Pipettierung von Reagenzien und Proben erfolgt automatisch, und das Gerät mißt die Änderung der Lichtstreuung einer Probe während der Gerinnelbildung. Die Zeit bis zur maximalen Steigung des Meßsignals während der Gerinnelbildung ist ein Maß für die APTT. Über eine Kalibrationsgerade mit Proben bekannter FVIII:C-Aktivität, in der die APTT in Sek. gegen die FVIII-Aktivität in Prozent (100% entsprechen der durchschnittlichen FVIII-Aktivität im Plasma eines Normkollektivs) doppelt-logarithmisch aufgetragen wird, können FVIII:C-Konzentrationen in unbekanntem Proben quantifiziert werden. Das Gerät erstellt automatisch eine Kalibrationskurve aus drei Verdünnungen des Kalibrationsplasmas, so daß im Bereich von 15-150% FVIII:C gemessen werden kann. Höher konzentrierte Proben wurden vorverdünnt, und für Proben mit geringerer FVIII-Aktivität wurde die Kalibration durch weitere Verdünnungen des Kalibrationsplasmas erweitert, so daß 1-2% FVIII:C noch detektiert werden konnten. Die Bedienung des ACL<sup>TM</sup>-Analysensystems erfolgte nach Angaben des Herstellers. In jeder Messung wurden neben Normplasma als Positivkontrolle zusätzlich Kulturüberstände von Zellen, die kein FVIII sezernierten, als Negativkontrollen mitgeführt.

### 2.3.7.3 Quantifizierung von FVIII:C mit chromogenem Assay

Im chromogenen Test wird die FVIII-Aktivität nicht über die Gerinnungszeit wie im Einstufentest, sondern über die Generierung von aktivem Faktor Xa bestimmt. Durch Mischung der Probe mit zwei Reagenzien (A: Phospholipid und Albumin; B: FIX<sub>aβ</sub>, FX, Ca<sup>2+</sup>, Albumin, Thrombin) entsteht aktiver FVIIIa, der als Kofaktor zusammen mit FIX<sub>aβ</sub>, Ca<sup>2+</sup> und Phospholipid eine Aktivierung von FX zu FXa bewirkt. In einem zweiten Schritt wird ein Substrat zugesetzt, von dem in einer spezifischen Reaktion durch FXa p-Nitroanilin abgespalten wird, dessen Konzentration spektralphotometrisch bei 405 nm gemessen wird.

Der chromogene Test wurde mit dem Immunochrom<sup>®</sup> FVIII:C-System im wesentlichen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Test wurde für die Durchführung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen so modifiziert, daß alle Volumina auf 25% reduziert wurden. Zudem wurde die Standardkurve durch weitere Verdünnungen der Kalibrationsplasmen erweitert. Die Sensitivität des Tests lag bei einer FVIII-Aktivität von etwa 1%.

### 2.3.7.4 FVIII:Ag-ELISA

Zur Quantifizierung von FVIII-Protein (FVIII:Ag) wurde der Immunozyt<sup>®</sup> FVIII:Ag-ELISA verwendet. Dieser Sandwich-ELISA beruht auf zwei monoklonalen Antikörpern, die gegen Epitope auf der leichten Kette des FVIII gerichtet sind. Im ersten Schritt wurden die zu untersuchenden Proben in Teststreifen einer 96-Well-Platte inkubiert, die mit dem ersten monoklonalen anti-FVIII-Antikörper beschichtet waren. Nicht-gebundenes FVIII-Protein und andere Probenbestandteile wurden ausgewaschen, und im zweiten Schritt wurde ein Konjugat aus dem zweiten monoklonalen anti-FVIII-Antikörper und Peroxidase zugegeben, das mit dem gebundenen FVIII:Ag reagierte. Ungebundenes Konjugat wurde durch erneutes Waschen entfernt. Im dritten Schritt erfolgte die Substratreaktion, in der in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Chromogen Tetramethylbenzidin zu einer blauen Substanz oxidiert wurde, deren Konzentration spektralphotometrisch bei 450 nm gemessen wurde.

Der ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Standardkurve wurde allerdings durch weitere Verdünnungen der Kalibrationsplasmen erweitert. Die Sensitivität des Tests lag bei einer FVIII:Ag-Konzentration von etwa 2 ng/ml.

### 2.3.7.5 Detektion von FVIII durch SDS-PAGE und Western Blot

Im Western Blot werden Proteine, die zuerst durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine Membran übertragen und dort mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine zuerst denaturiert

und binden dann SDS, so daß Ladungsdifferenzen zwischen den Proteinen ausgeglichen werden und sie in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei im wesentlichen vom Molekulargewicht ab. Im Fall des FVIII-Proteins ist dieses Verfahren von besonderem Interesse, da FVIII komplex prozessiert wird und bestimmte Unregelmäßigkeiten wie ineffiziente Proteolyse erkannt werden können.

### SDS-PAGE

Im ersten Schritt wurden 15 µl jeder Probe durch Zugabe von 5 µl RotiLoad1-Auftragspuffer und Erhitzen bei 95°C für 5 Min. denaturiert und in einer SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Zuerst wurde ein Trenngel mit 10% Acrylamid gegossen und mit 100 µl Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurden das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (5% Acrylamid) gegossen. Nachdem dieses auspolymerisiert war, wurde das Gel in eine Mini Protean 3-Gelkammer eingebaut, die mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% [w/v] SDS; pH 8,3) gefüllt wurde. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 60 V für 30 Min. und nach dem Einlaufen der Proben in das Trenngel bei 130 V für 180 Min. Als Größenstandard wurde BenchMark™ Prestained Protein Ladder mitgeführt.

Trenngel (5 ml):        1,9 ml H<sub>2</sub>O; 1,7 ml Acrylamidmix (30%); 1,3 ml 1,5 M Tris (pH 8,8);  
                              50 µl 10% [w/v] SDS; 50 µl 10% [w/v] APS; 2 µl TEMED

Sammelgel (1 ml):    0,68 ml H<sub>2</sub>O; 0,17 ml Acrylamidmix (30%); 0,13 ml 1,0 M Tris (pH 6,8);  
                              10 µl 10% [w/v] SDS; 10 µl 10% [w/v] APS; 1 µl TEMED

### Transfer

Anschließend wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die Membran in Methanol aktiviert. Gel und Membran wurden zu beiden Seiten mit je zwei Lagen Whatman-Papier und außen mit kleinen Schwämmen umgeben, die vorher in Western Blot-Laufpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% [v/v] Methanol) getränkt wurden. Der Transfer wurde in einer eisgekühlten Kammer mit vorgekühltem Western Blot-Puffer für 150 Min. bei 100 V durchgeführt.

### Immunologische Detektion

Nach dem Transfer wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran durch PBS/0,1% [v/v] Triton X-100/5% [w/v] Magermilchpulver auf einem Rotor für 3 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Zur Detektion des FVIII wurde die Membran zunächst 15-20 Stunden bei 4°C in PBS/0,1% [v/v] Triton X-100/1% [w/v] Magermilchpulver mit einem polyklonalen anti-FVIII-Antikörper (Schaf-IgG; 1:1000) inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS/0,1% [v/v] Triton X-100 wurde die Membran mit einem anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat (Esel; 1:3000) in PBS/0,1% [v/v] Triton X-100/5% [w/v] Magermilchpulver für 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut extensiv gewaschen. Die Immunkomplexe wurden über Chemilumineszenz mit dem SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) detektiert. Das Substratsystem besteht aus einer stabilen Peroxid-Lösung und einer Luminol/Enhancer-Lösung, die unmittelbar vor Gebrauch zu gleichen Teilen gemischt und auf die Membran gegeben wurden. Die Chemilumineszenz wurde durch Auflegen eines Autoradiographiefilms visualisiert.

## **2.4 Statistische Auswertung**

Daten werden als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Für den Vergleich zweier Datensätze wurde der t-Test (paired, two-tailed) verwendet. Meßwerte wurden als statistisch signifikant verschieden betrachtet bei  $p < 0,05$ . Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism™ Version 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) und Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

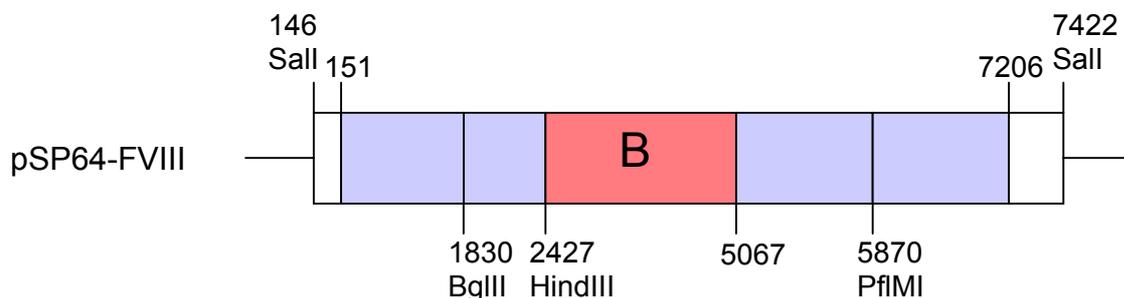
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Konstruktion von BDD FVIII-Expressionsvektoren

##### 3.1.1 Deletion der B-Domäne

Wie bereits in 1.3.2 diskutiert, gibt es eine Reihe von Problemen bei der rekombinanten Expression des FVIII-Proteins. Um eine möglichst hohe FVIII-Expression zu erzielen, wurde auch in dieser Studie mit einer verkürzten FVIII-cDNA gearbeitet, in der der größte Teil der zentralen B-Domäne (etwa ein Drittel der kodierenden Sequenz) deletiert wurde. Die Gruppe um R. J. Kaufman beschrieb 1993 eine Deletion der Basenpaare 2428 bis 5067 und charakterisierte das Protein mit einer Deletion der Aminosäuren 760 bis 1639 (Pittman et al., 1993). Die Daten zeigten, daß das verkürzte Protein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in bezug auf Aktivität, Halbwertszeit und Immunogenität mit dem Wildtyp-Protein vergleichbar war, so daß in dieser Arbeit ebenfalls diese Variante eines B-Domänen-deletierten FVIII (BDD FVIII) verwendet wurde.

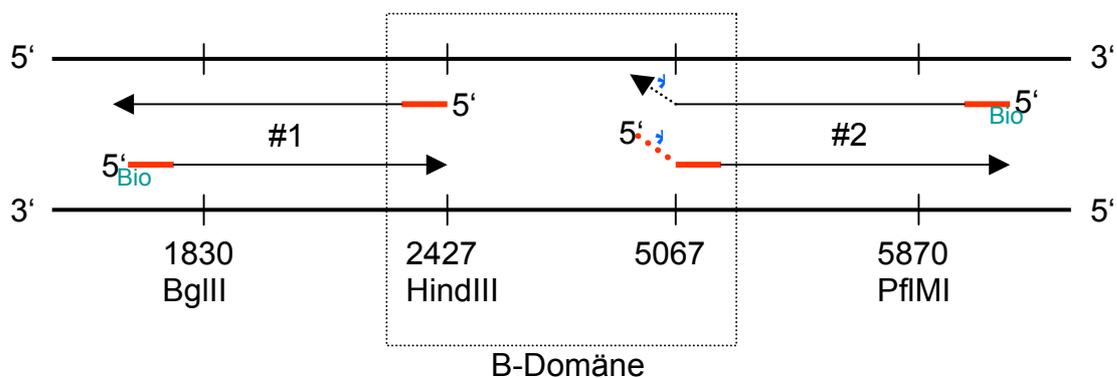
Als Ausgangskonstrukt diente das Plasmid pSP64-FVIII von ATCC mit der vollständigen kodierenden Sequenz und etwa 200 Nukleotiden der 3'-untranslatierten Region des FVIII-Gens. Diese FVIII-Sequenz wird zu beiden Seiten von Sall-Restriktionsstellen flankiert. Die Numerierung der Nukleotide ist gegeben durch Toole et al. (1984; Accession number K01740). Die kodierende Sequenz besteht aus den Basenpaaren 151-7206, und das Sall-Fragment ist in den Basenpaaren 146-7422 enthalten (Abb. 3.1).



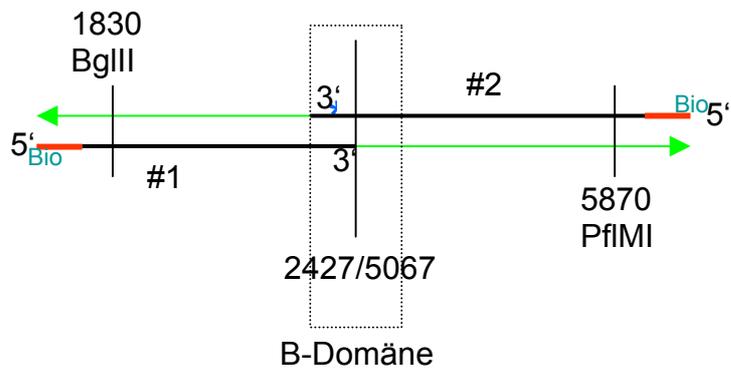
**Abb. 3.1. Struktur der verwendeten FVIII-cDNA.** Im Plasmid pSP64-FVIII (ATCC) ist der Teil der cDNA des FVIII-Gens zwischen zwei Sall-Restriktionsstellen (146-7422) kloniert, der die gesamte kodierende Sequenz (151-7206) sowie einen Teil der 3'-untranslatierten Region umfaßt. Der zu deletierende Anteil der B-Domäne (2428-5067) ist in rot dargestellt (Abbildung nicht maßstabsgerecht).

Die Deletion der B-Domäne wurde durch eine Serie von drei PCR-Reaktionen erreicht (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1). Die in den PCR-Ansätzen 1 und 2 verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt, daß die Produkte sowohl eine Überlappung von 17 Basenpaaren als auch geeignete Restriktionsstellen für Klonierungszwecke enthielten (BglIII 1830, HindIII 2427, PflMI 5870). Zudem waren zwei der vier Oligonukleotide an den 5'-Enden biotinyliert. Die Biotin-markierten Einzelstränge aus den beiden ersten PCR-Ansätzen wurden über Streptavidin-gekoppelte Dynabeads (DynaI) aufgereinigt und als Vorlagen für die dritte PCR eingesetzt, um ein Produkt zu erhalten, das B-Domänen-deletiert war und über die Restriktionsstellen BglIII und PflMI umkloniert werden konnte.

PCR-Reaktionen #1 & #2:



PCR-Reaktion #3:



**Abb. 3.2. Deletion der B-Domäne aus der FVIII-cDNA.** In den PCR-Ansätzen #1 und #2 wurden Teile der FVIII-cDNA amplifiziert, die 5' und 3' von der zu deletierenden B-Domäne liegen. Die verwendeten Oligonukleotide sind schematisch in rot dargestellt, die Sequenzen sind in Tabelle 3.1 gegeben (Bio: Biotin am 5'-Ende). Zudem wurde der 5'-Primer der PCR #2 so gewählt, daß das PCR-Produkt weitere 17 Basenpaare enthielt, die homolog zum 3'-Ende des PCR-Produktes #1 waren (durch gepunktete Linien und einen blauen Stern hervorgehoben). In der PCR #3 wurden als Vorlagen die biotinylierten Einzelstränge der PCR-Produkte aus den Reaktionen #1 und #2 und als Oligonukleotide der 5'-Primer aus #1 sowie der 3'-Primer aus #2 eingesetzt, um ein Produkt #3 zu erhalten, das die Sequenzen 1772-2427 und 5068-5939 enthielt (ergänzte Sequenzen in grün dargestellt).

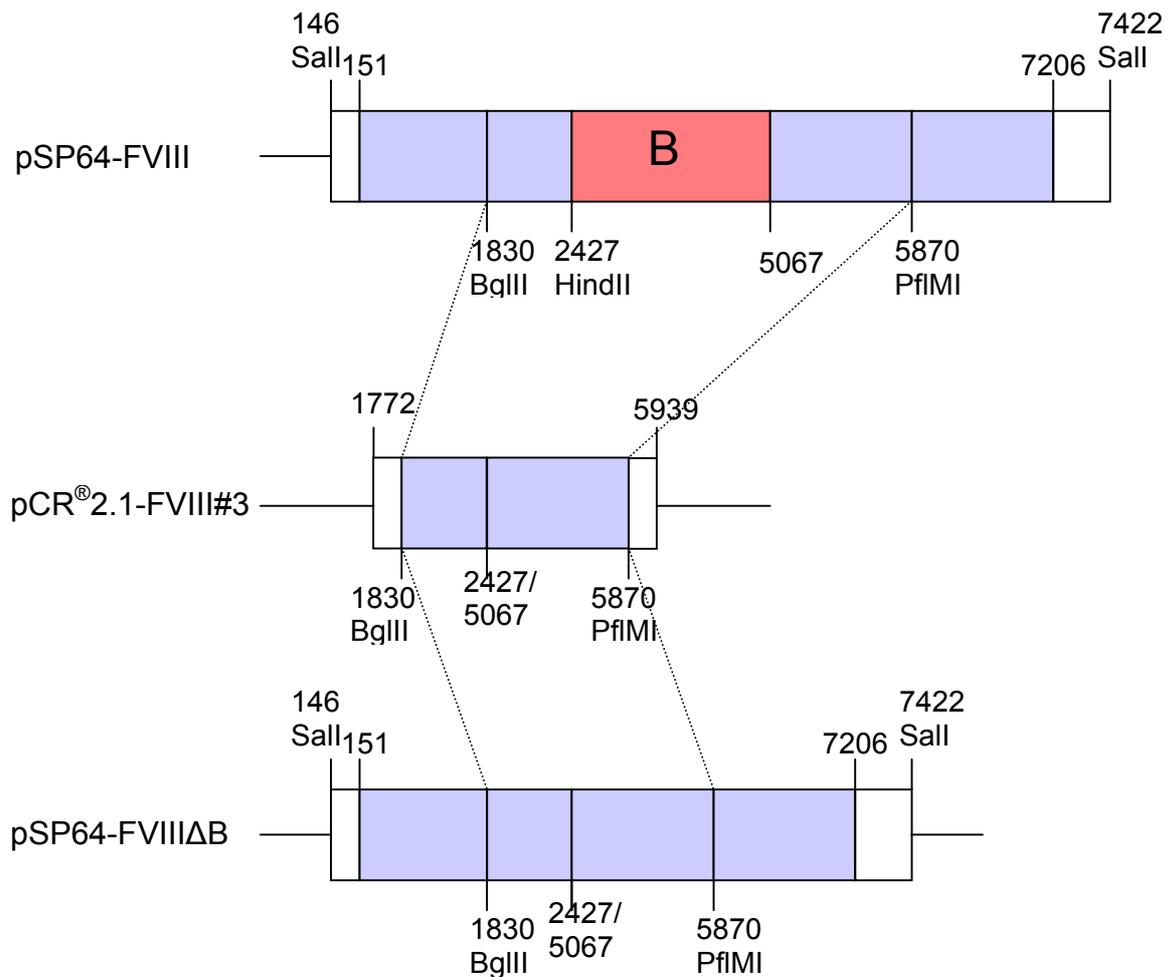
PCR	DNA-Vorlage	Oligonukleotide	Bindestellen in FVIII-cDNA	Produktlänge
#1	pSP64-FVIII	5'- Bio-CTA AAT CAG ATC CTC GGT GCC TG-3' 5'- TCT TGG TTC AAT GGC AT -3'	1772-1794 2411-2427	656 bp
#2	pSP64-FVIII	5'- ATG CCA TTG AAC CAA GAG AAA TAG AAG TCA CCT GGG CAA AGC -3' 5'- Bio-GTG GGA TCT TCC ATC TGG ATA TTG CAG GGA GCC CTG CAG -3'	2411-2427 & 5068-5092 5901-5939	909 bp
#3	Produkte aus #1 und #2	5'- CTA AAT CAG ATC CTC GGT GCC TG -3' 5'- GTG GGA TCT TCC ATC TGG ATA TTG CAG GGA GCC CTG CAG -3'	1772-1794 5901-5939	1548 bp

**Tab. 3.1. Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Deletion der B-Domäne verwendet wurden** (vergleiche dazu Abb. 3.2; Bio: Biotin).

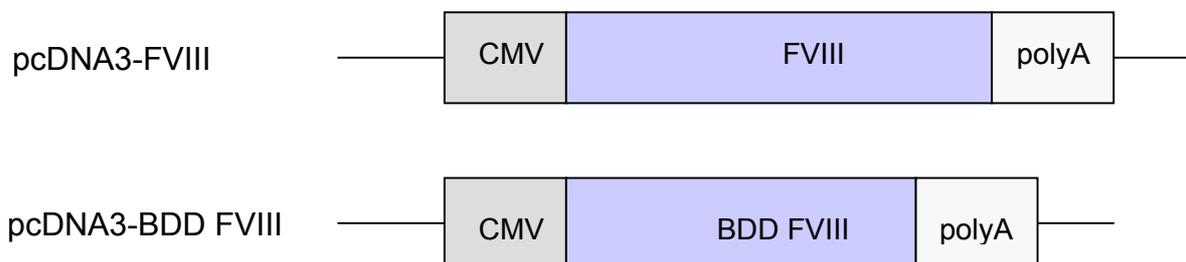
Das PCR-Produkt #3 wurde mit Hilfe des TA Cloning Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 subkloniert und das entstehende Plasmid pCR<sup>®</sup>2.1-FVIII#3 in *E. coli* amplifiziert. Die Plasmide pSP64-FVIII und pCR<sup>®</sup>2.1-FVIII#3 wurden mit BglIII und PflMI geschnitten, so daß das BglIII/PflMI-Fragment mit der vollständigen B-Domäne in pSP64-FVIII gegen die B-Domänen-deletierte Version ausgetauscht wurde, woraus Plasmid pSP64-FVIIIΔB resultierte (Abb. 3.3).

### 3.1.2 Expression von FVIII und BDD FVIII im Expressionsvektor pcDNA3

Um die Funktionalität des BDD FVIII zu überprüfen, wurden sowohl FVIII als auch BDD FVIII mit Sall aus den pSP64-Konstrukten geschnitten und in die XhoI-Restriktionsstelle in der MCS des Expressionsplasmids pcDNA3 zwischen dem CMV-Promotor und der PolyA-Sequenz aus dem BGH-Gen (BGH: bovine growth hormone) kloniert. Die Expressions-cassetten der beiden Vektoren sind in Abb. 3.4 schematisch dargestellt.

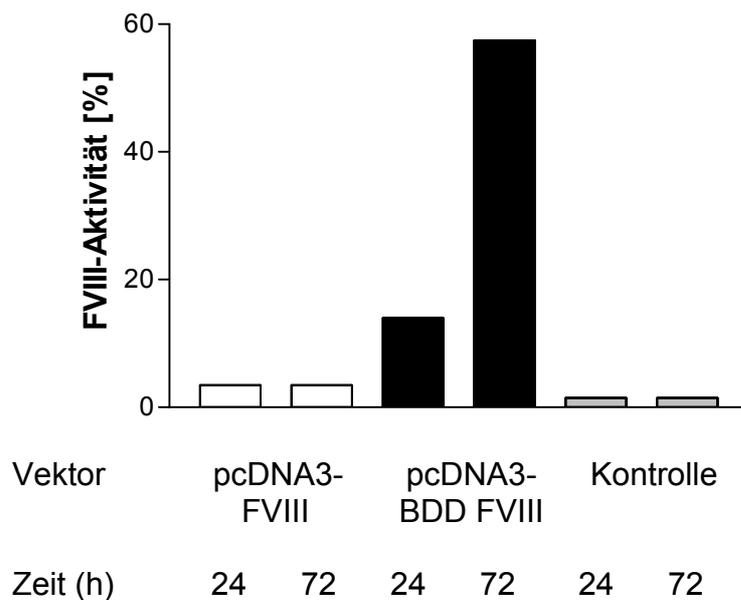


**Abb. 3.3. Deletion der B-Domäne im pSP64-Vektor.** Durch Umklonierung über die Restriktionsstellen BglIII (1830) und PflMI (5870) wurde die Deletion der B-Domäne in die FVIII-cDNA im pSP64-Vektor eingeführt.



**Abb. 3.4. Expressionscassetten der pcDNA3-abgeleiteten FVIII-Plasmide.** In den Plasmiden pcDNA3-FVIII und pcDNA3-BDD FVIII stehen die FVIII-cDNA bzw. BDD FVIII-cDNA unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors. Die Transkription wird durch eine PolyA-Sequenz aus dem BGH-Gen terminiert (BGH: bovines Wachstumshormon; bovine growth hormone).

Beide Vektoren wurden in gleichen Mengen (20 µg) durch Calciumphosphat-Transfektion in 293T-Zellen exprimiert. Achtzehn Stunden nach der Transfektion wurde den Zellen frisches Medium gegeben, und nach weiteren 24 bzw. 72 Stunden wurden die Kulturüberstände von Doppelansätzen gesammelt und im Mangelplasma-Assay auf FVIII-Aktivität überprüft (Abb. 3.5). Während im Überstand der mit pcDNA3-FVIII transfizierten Zellen zu beiden Zeitpunkten im Mittel nur eine FVIII-Aktivität von 4% meßbar war (leere Balken), konnten im Überstand der mit pcDNA3-BDD FVIII transfizierten Zellen FVIII-Aktivitäten von 14% nach 24 Stunden bzw. 58% nach 72 Stunden detektiert werden (schwarze Balken). Im Überstand von nicht-transfizierten Zellen konnte keine FVIII-Aktivität gemessen werden (<2%; graue Balken). Die Quantifizierung der FVIII-Aktivität erfolgte im Mangelplasma-Assay durch eine Kalibrierung mit einem Humanplasmakonzentrat, das eine FVIII-Aktivität von etwa 100% besaß.



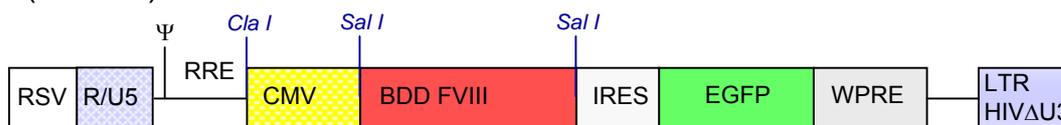
**Abb. 3.5. Expression von FVIII und BDD FVIII in 293T-Zellen.** Nach Transfektion von jeweils 20 µg der Plasmide pcDNA3-FVIII (leere Balken) bzw. pcDNA3-BDD FVIII (schwarze Balken) in  $5 \times 10^6$  293T-Zellen und einem Mediumwechsel wurden nach weiteren 24 bzw. 72 Stunden die FVIII-Aktivitäten der Überstände mit Hilfe eines Mangelplasma-Assays bestimmt. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte 293T-Zellen (graue Balken). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten aus einem Experiment.

### 3.1.3 Expression von BDD FVIII in lentiviralen Vektoren

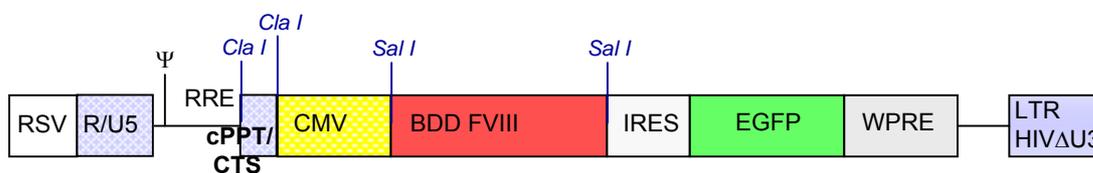
Aufgrund der in Abb. 3.5 dargestellten stärkeren Expression von BDD FVIII gegenüber dem Wildtyp-FVIII im 293T-Testsystem und aufgrund der Tatsache, daß die Verwendung einer FVIII-cDNA ohne Deletion zu lentiviralen Vektoren von einer Genomlänge von deutlich über 10 kb und damit im allgemeinen zu extrem niedrigen Virustitern führen würde (Kumar et al., 2001), wurde im Folgenden nur mit dem BDD FVIII gearbeitet.

Zuerst wurde die BDD FVIII-cDNA mit Hilfe der *Sal*I-Restriktionsstellen aus pSP64-FVIII $\Delta$ B in den lentiviralen Vektor CIGWS (freundlicherweise von Katja Lützenkirchen zur Verfügung gestellt), wodurch das Konstrukt C(FVIII $\Delta$ B)IGWS entstand. Des weiteren wurde in zwei Klonierungsschritten aus CIGWS das Konstrukt cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS hergestellt. Im ersten Schritt wurden der zentrale Polypurintrakt und die zentrale Terminationssequenz (cPPT/CTS; vgl. 1.5.2) in den Vektor CIGWS kloniert. Mit den Oligonukleotiden PPTCTSCLA-5 und PPTCTSCLA-3 (siehe Tab 2.4) wurde aus einem Plasmid mit *gag-pol* aus HIV-1 IIB/LAI das cPPT/CTS-Fragment mit je einer *Cl*aI-Schnittstelle an den 5'- und 3'-Enden amplifiziert. Dieses Fragment wurde dann in die *Cl*aI-Restriktionsstelle 5' vor dem CMV-Promotor im CIGWS ligiert. Im zweiten Schritt wurde die BDD FVIII-cDNA aus pSP64-FVIII $\Delta$ B wie oben beschrieben in die *Sal*I-Stelle des modifizierten CIGWS kloniert. Die Anwesenheit des cPPT/CTS-Elementes erhöht den Import von lentiviraler DNA nach reverser Transkription in den Zellkern, was zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz des Vektors führt.

#### C(FVIII $\Delta$ B)IGWS



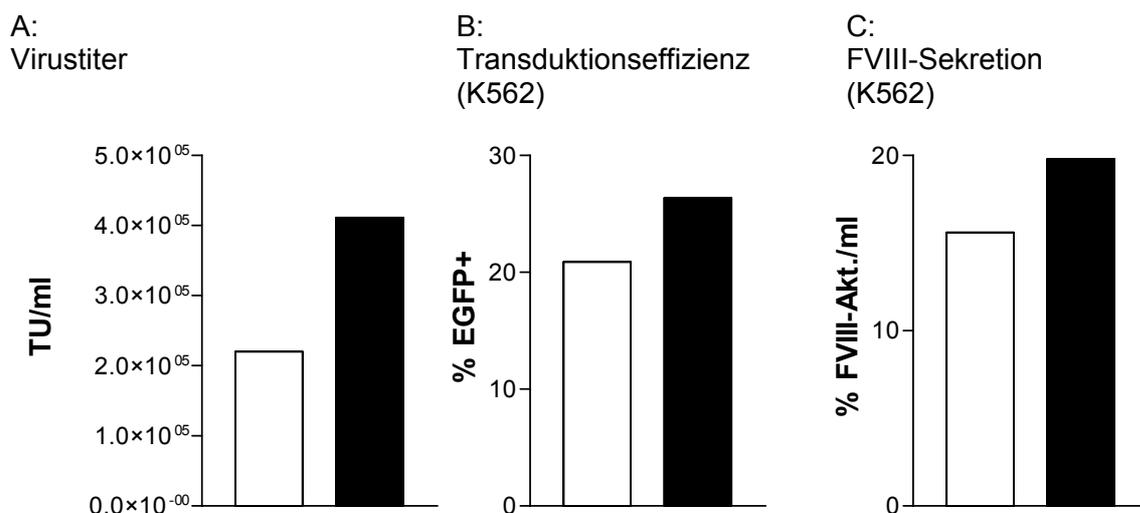
#### cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS



**Abb. 3.6. Schematische Darstellung der lentiviralen Vektoren C(FVIII $\Delta$ B)IGWS und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS.** Die Abkürzungen werden in 2.1.4 erklärt.

In den Konstrukten C(FVIII $\Delta$ B)IGWS und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS, die in Abb. 3.6 schematisch dargestellt sind, besteht die Transgen-Expressions-cassette aus einem CMV-Promotor, der BDD FVIII-cDNA, einer IRES aus dem Encephalomyocarditis-Virus (ECMV) und der EGFP-cDNA, so daß in transfizierten und transduzierten Zellen bicistronische mRNAs entstehen, von denen sowohl BDD FVIII als auch EGFP translatiert werden.

Um die Funktion der beiden lentiviralen Konstrukte zu testen, wurden sie in einer Dreiplasmid-Kotransfektion (siehe 2.2.2.3) in 293T-Zellen für die Produktion von lentiviralen Partikeln verwendet. Die Virustiter wurden wie in 2.2.3 beschrieben auf 293T-Zellen bestimmt. Zudem wurde der Virusüberstand für die Transduktion der hämatopoetischen Zelllinie K562, die aus einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML; Lozzio & Lozzio, 1975) isoliert wurde, verwendet. Sowohl die Transduktionseffizienz als auch die FVIII-Sekretion der Zellen wurden gemessen. Die Ergebnisse eines von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen sind in Abb. 3.7 dargestellt.



**Abb. 3.7. Vergleich der lentiviralen Konstrukte C(FVIII $\Delta$ B)IGWS und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS in bezug auf Virustiter und Transduktion von K562-Zellen.** Beide Konstrukte wurden als Transgenvektoren zusammen mit den akzessorischen Plasmiden pCMV $\Delta$ R8.93 und pMD.G in einer Dreiplasmid-Kotransfektion für die Produktion von Virusüberstand eingesetzt. Der Titer der Virusüberstände wurde auf 293T-Zellen bestimmt (Abb. 3.7A; vgl. 2.2.3). Zudem wurden je 1 ml Virusüberstand für die Transduktion von 10<sup>5</sup> K562-Zellen verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der EGFP-Expression im FACS gemessen (Abb. 3.7B), und die FVIII-Aktivität im K562-Überstand wurde nach 48 Stunden durch Mangelplasma-Assay bestimmt (Abb. 3.7C). Die Meßwerte für den Vektor C(FVIII $\Delta$ B)IGWS sind durch die leeren Balken gegeben, während die schwarzen Balken die Werte für den Vektor cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS darstellen.

Die Virustiter mit den Konstrukten C(FVIIIΔB)IGWS und cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS betragen  $2,2 \times 10^5$  bzw.  $4,1 \times 10^5$  TU/ml. Die Transduktionseffizienzen, die mit 1 ml Virusüberstand auf  $10^5$  K562-Zellen erreicht wurden, lagen bei 20,9% bzw. 26,3% (gemessen über EGFP-Expression im FACS), und die FVIII-Aktivitäten im Kulturüberstand lagen bei 15,6%/ml bzw. 19,8%/ml je  $4 \times 10^4$  Zellen über 48 Stunden.

## **3.2 FVIII-Expression in hämatopoetischen Zelllinien**

### **3.2.1 Transduktion von hämatopoetischen Zelllinien**

Die Fähigkeit von hämatopoetischen Zellen zur rekombinanten Expression von BDD FVIII wurde untersucht, indem verschiedene Zelllinien, die unterschiedliche Untergruppen von Leukozyten repräsentieren, mit lentiviralem Virusüberstand transduziert wurden. Für die Produktion von viralen Partikeln wurden neben den Hilfsplasmiden pCMVΔR8.93 und pMD.G die Transgenkonstrukte CGWS und C(FVIIIΔB)IGWS verwendet. Die Transduktion mit C(FVIIIΔB)IGWS sollte zur gleichzeitigen Expression von BDD FVIII und EGFP in den transduzierten Zellen führen, wobei die Expression von EGFP nicht nur für die Bestimmung der Transduktionseffizienz, sondern auch zur durchflußzytometrischen Anreicherung der transduzierten Zellen verwendet wurde. Das Konstrukt CGWS, das nur für EGFP kodiert, diente in den Transduktionsexperimenten als Positivkontrolle.

In Tab. 3.2 sind die Transduktionseffizienzen eines Experimentes mit hämatopoetischen Zelllinien gegeben. Untransduzierte Zellen wurden als Negativkontrollen (EGFP-Fluoreszenz in <1% der Zellen) mitgeführt, und über die EGFP-Expression im Vergleich zu den untransduzierten Zellen wurden die Transduktionseffizienzen von CGWS-transduzierten (Einzelwerte) und C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen (Mittelwert von Duplikaten) ermittelt. Für das Experiment wurden CGWS- und C(FVIIIΔB)IGWS-Virusüberstände durch Ultrafiltration konzentriert, so daß für CGWS ein Titer von etwa  $1 \times 10^7$  TU/ml und für C(FVIIIΔB)IGWS ein Titer von  $1-2 \times 10^6$  TU/ml erreicht wurden. Für die Transduktion wurden  $10^5$  Zellen mit 0,5-1,0 ml Virusüberstand inkubiert (MOI für CGWS: 45-50; MOI für C(FVIIIΔB)IGWS: 5-10).

Zelllinie	Herkunft	Transduktion mit C(FVIIIΔB)IGWS (%EGFP <sup>+</sup> -Zellen)	Transduktion mit CGWS (%EGFP <sup>+</sup> )	Negativkontr. (%EGFP <sup>+</sup> )
K562	Chronische myeloische Leukämie	44,5	99,9	<1
TF-1	Erythroleukämie	49,5	99,3	<1
Raji	Burkitt B-Zell-Lymphom	21,2	96,3	<1
Jurkat	Akute T-Zell-Leukämie	56,7	72,5	<1
PLB-985	Akute nicht- lymphatische Leukämie	6,9	52,0	<1
KG-1	Akute myeloische Leukämie	4,3	27,6	<1

**Tab. 3.2. Transduktion von hämatopoetischen Zelllinien mit den lentiviralen Konstrukten CGWS und C(FVIIIΔB)IGWS.** Gegeben sind die Transduktionseffizienzen (bestimmt im FACS als Prozent EGFP-positiver Zellen) für die jeweiligen Zelllinien.

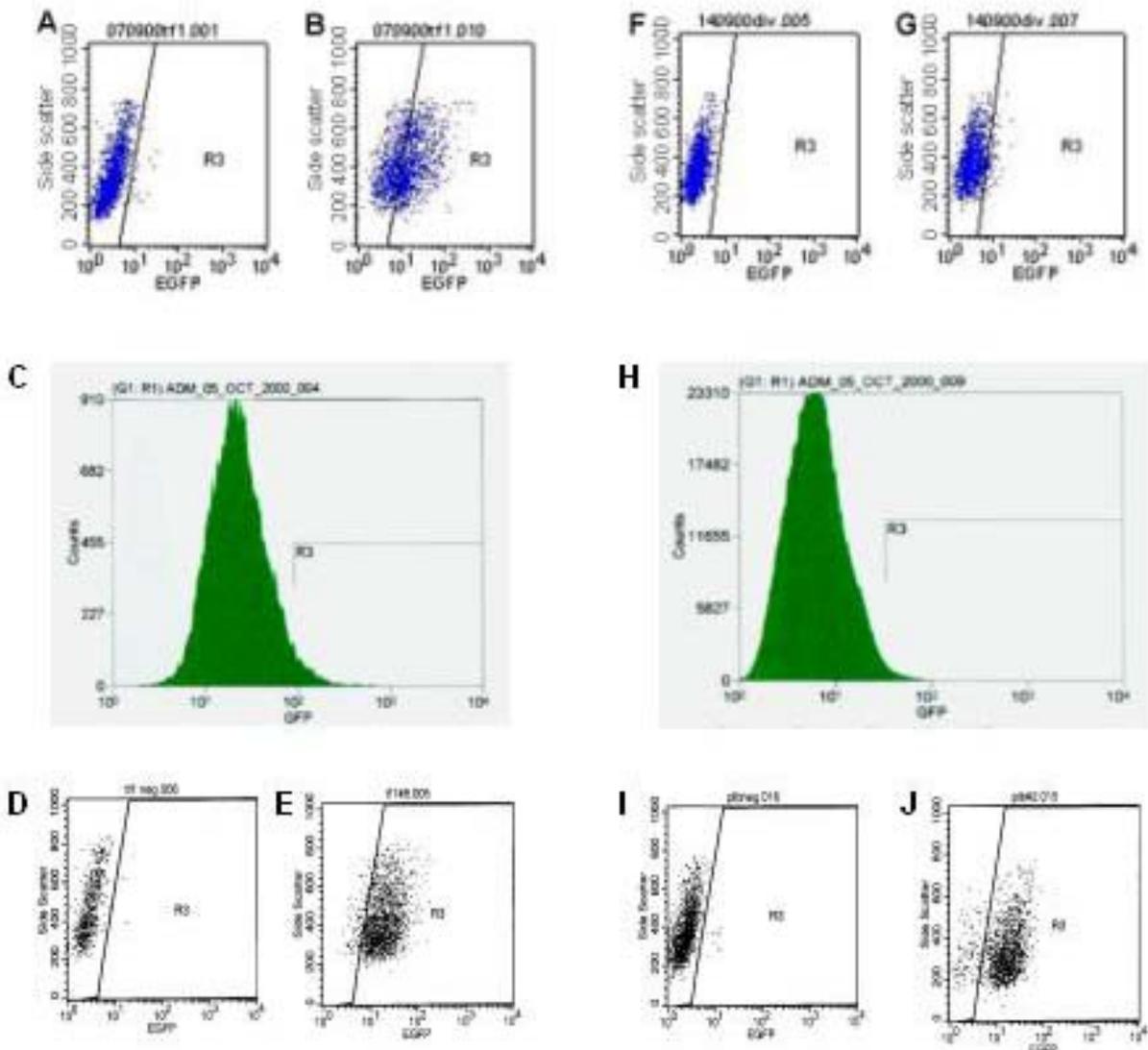
### 3.2.2 Anreicherung von transduzierten hämatopoetischen Zellen

Da nach Transduktion mit dem Vektor C(FVIIIΔB)IGWS die Transduktionseffizienzen mit 4% bis 57% recht heterogen waren, wurden die transduzierten Zellen mit einem Hochgeschwindigkeits-Durchflußzytometer (MoFlo, Cytomation) angereichert. Als Transduktionsmarker diente die EGFP-Expression, und der Selektionsprozeß zielte auf die Zellen mit der stärksten EGFP-Fluoreszenz (etwa 1% der Mischpopulation). Nach dem Sortieren wurden die Zellen (jeweils etwa  $10^4$  Zellen für jede Zelllinie) expandiert und für FACS-Analysen und FVIII-Assays eingesetzt.

Abb. 3.8 zeigt die Effizienz des Anreicherungsprozesses anhand von zwei Beispielen. In Abb. 3.8A-E und Abb. 3.8F-J sind die Anreicherung von TF-1- bzw. PLB-985-Zellen dargestellt, die unter identischen Bedingungen mit recht hoher (TF-1) oder sehr niedriger (PLB-985) Effizienz mit dem Vektor C(FVIIIΔB)IGWS transduziert werden konnten. Die obere Reihe der Abb. 3.8 stellt für beide Zelllinien die EGFP-Fluoreszenz von untransduzierten (A, F) und transduzierten (B, G) Zellen gegenüber. In der mittleren Reihe sind mit R3 bezeichnet die Regionen zu sehen, die die Zielpopulation der durchflußzytometrischen Selektion waren. Die untere Reihe zeigt den Vergleich von untransduzierten (D, I) und angereicherten transduzierten (E, J) Zellen, wobei die Effizienz der Anreicherung durch den Vergleich von B und E für TF-1 bzw. von G und J für PLB-985 gegeben ist.

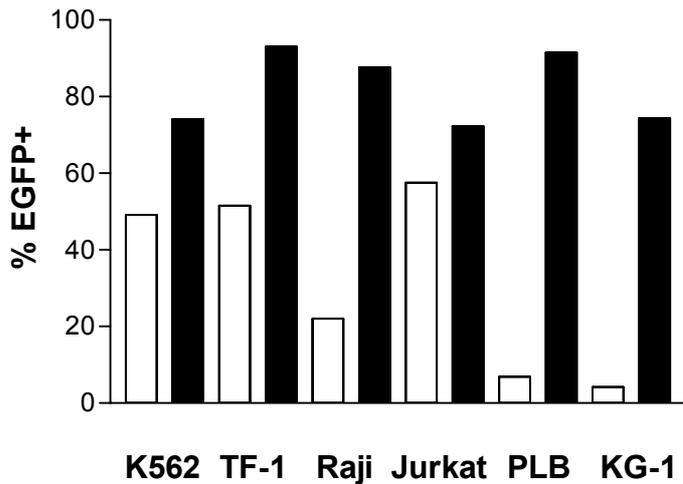
### Anreicherung von transduzierten TF-1-Zellen

### Anreicherung von transduzierten PLB-985-Zellen



**Abb. 3.8. Anreicherung von EGFP-positiven hämatopoetischen Zellen, die mit dem lentiviralen Konstrukt C(FVIIIΔB)IGWS transduziert waren.** Aus einer Mischpopulation von untransduzierten und transduzierten Zellen wurden mit einem Hochgeschwindigkeits-Durchflußzytometer die Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität angereichert und für weitere Analysen expandiert. Die einzelnen Teile der Abbildung sind im Text (3.2.2) erklärt.

Abb. 3.9 gibt eine Übersicht über die Prozentsätze der EGFP-exprimierenden Zellen nach Transduktion mit C(FVIIIΔB)IGWS jeweils vor und nach Anreicherung. Durch die Selektion konnten die Anteile der EGFP-positiven Zellen auf 72% bis 93% gesteigert werden.



**Abb. 3.9.** Vergleich der EGFP-Expression von hämatopoetischen Zelllinien nach Transduktion mit dem lentiviralen Vektor C(FVIIIΔB)IGWS vor (leere Balken) und nach (schwarze Balken) durchflußzytometrischer Anreicherung.

### 3.2.3 Charakterisierung der BDD FVIII-Expression in hämatopoetischen Zelllinien

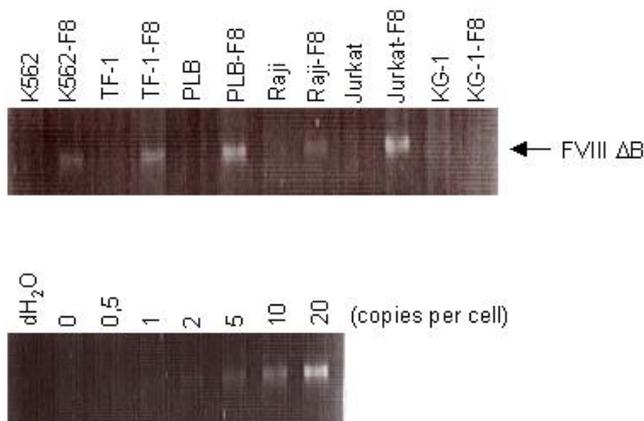
Nach der Bestimmung der Transduktionseffizienz über die EGFP-Expression im Durchflußzytometer wurde die FVIII-Expression der mit dem für FVIII und EGFP kodierenden bicistronischen Vektor transduzierten und angereicherten Zellen untersucht. Neben der Bestimmung der Transgen-Kopienzahl in den angereicherten Mischpopulationen wurde die FVIII-Expression auf RNA- und Proteinebene analysiert.

Die Anzahl der BDD FVIII-Kopien im Genom der angereicherten Mischpopulationen wurde mit einer semiquantitativen PCR bestimmt, die eine distinkte Bande für DNA aus Zellen lieferte, die mit einer BDD FVIII-cDNA transduziert wurden, nicht aber für DNA aus Wildtyp-Zellen, die das komplette FVIII-Gen mit seiner komplizierten Exon-Intron-Struktur enthielten. Die Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve mit Plasmid-DNA vor dem Hintergrund derselben Menge genomischer DNA, wie sie auch für die PCR-Ansätze mit den Zelllinien ausgewählt wurde.

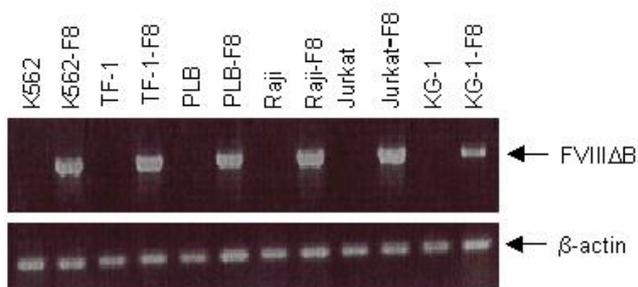
In Abb. 3.10 sind im unteren Teil die PCR-Banden zu sehen, die für die Kalibrierung herangezogen wurden. Im oberen Teil sind die Banden aus den PCR-Ansätzen mit den untransduzierten und den transduzierten Zelllinien abgebildet. In keiner der untransduzierten Zellpopulationen, wohl hingegen in allen transduzierten Zellpopulationen sind PCR-Banden der korrekten Größe erkennbar. Die Ergebnisse der Quantifizierung, die in Tabelle 3.3

zusammengefaßt sind, zeigten, daß in den transduzierten Zellpopulationen nach Anreicherung 4 (Raji) bis 20 (PLB-985) Genkopien je Zelle vorhanden waren.

Eine RT-PCR mit RNA aus untransduzierten Zellen und transduzierten Zellen (nach Anreicherung) mit BDD FVIII-spezifischen Oligonukleotiden belegte, daß in allen transduzierten Zelllinien BDD FVIII transkribiert wurde, während in den untransduzierten Zellen keine BDD FVIII-Transkripte gefunden werden konnten (Abb. 3.11). RT-PCRs mit  $\beta$ -Aktin-spezifischen Oligonukleotiden wurden als Kontrollen durchgeführt.

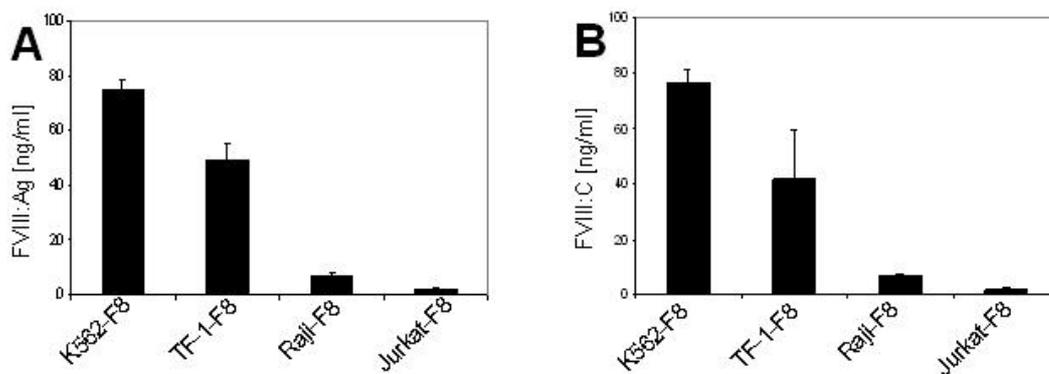


**Abb. 3.10. Abschätzung der Anzahl an BDD FVIII-Genkopien in transduzierten hämatopoetischen Zelllinien.** In einer semiquantitativen PCR wurden 100 ng genomische DNA aus transduzierten und nicht-transduzierten Zellen und BDD FVIII-spezifische Oligonukleotide eingesetzt und die Bandenintensitäten wie in 2.3.5.3 beschrieben über eine Standardkurve quantifiziert (Abbildung reproduziert mit Genehmigung von Mary Ann Liebert, Inc.).



**Abb. 3.11. Qualitative Detektion von BDD FVIII-mRNA in transduzierten hämatopoetischen Zelllinien.** In RT-PCR-Ansätzen mit RNA aus transduzierten und nicht-transduzierten Zellen wurden mit jeweils spezifischen Oligonukleotiden BDD FVIII-mRNA (oben) bzw.  $\beta$ -Aktin-mRNA (unten) nachgewiesen (Abbildung reproduziert mit Genehmigung von Mary Ann Liebert, Inc.).

Um zu überprüfen, ob die in allen transduzierten Zelllinien vorhandene BDD FVIII-mRNA auch translatiert und das entstehende Protein in den Kulturüberstand sekretiert wurde, wurden jeweils  $5 \times 10^5$  untransduzierte und transduzierte Zellen jeder Zelllinie in 1 ml Medium über 48 Stunden kultiviert und dann die Überstände in FVIII-Assays untersucht. Abb. 3.12A zeigt die gemessenen FVIII-Proteinmengen (FVIII:Ag) aus einem FVIII-spezifischen ELISA, während Abb. 3.12B die FVIII-Aktivitäten (FVIII:C) aus einem chromogenen Assay darstellt. Alle Meßwerte wurden durch Vergleich mit humanen Referenzplasmen erhalten und auf ng/ml umgerechnet. Die Meßwerte aus beiden Assays stimmten sehr gut überein, so daß das Verhältnis FVIII:C/FVIII:Ag für die Zelllinien K562, TF-1, Raji und Jurkat nahezu 1 betrug (Tab. 3.3). Daher läßt sich aussagen, daß die transduzierten K562 und TF-1 recht hohe Mengen FVIII in den Überstand sezernierten (Meßwerte im Bereich von 40 bis 80 ng/ml), während transduzierte Raji- und Jurkat-Zellen niedrige, aber noch eindeutig detektierbare Mengen an FVIII sezernierten. Für die transduzierten PLB-985 und KG-1 sowie für alle untersuchten nicht-transduzierten Zellen lagen die entsprechenden Werte unter 1 ng/ml, so daß weder FVIII:Ag noch FVIII:C im Überstand detektiert werden konnten. In den angereicherten transduzierten Zellen blieb die FVIII-Sekretion über einen Beobachtungszeitraum von etwa sechs Monaten stabil.



**Abb. 3.12. Detektion von FVIII:Ag und FVIII:C im Überstand von transduzierten Zellen.** Für die Quantifizierung der FVIII-Sekretion wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Medium über 48 Stunden kultiviert. Der Überstand wurde im ELISA auf FVIII-Protein (FVIII:Ag) und im chromogenen Assay auf FVIII-Aktivität (FVIII:C) untersucht. Die Meßwerte gaben somit die FVIII-Sekretion in ng FVIII/ $5 \times 10^5$  Zellen und 48 Stunden an. Als Referenz dienten Kontrollplasmen mit 100% FVIII-Aktivität oder 200 ng FVIII:Ag/ml. Das Detektionslimit der Assays lag bei 1 ng/ml (Abbildung reproduziert mit Genehmigung von Mary Ann Liebert, Inc.).

Zelllinie	Mittlere Kopienzahl FVIII/Zelle	% EGFP- positive Zellen	ng FVIII:C/ 5x10 <sup>5</sup> Zellen, 48 Stunden	ng FVIII:Ag/ 5x10 <sup>5</sup> Zellen, 48 Stunden	Spezifische Aktivität FVIII:C/FVIII:Ag
K562	10	74,2	76,4	74,8	1,02
TF-1	16	93,3	41,6	49,1	0,85
Raji	4	87,6	6,7	6,9	0,98
Jurkat	19	72,3	1,8	2,0	0,94
PLB-985	20	91,5	<1	<1	n.b.
KG-1	5	74,4	<1	<1	n.b.

**Tab. 3.3. Charakterisierung der transduzierten hämatopoetischen Zelllinien nach Anreicherung** (n.b.: nicht berechenbar) (Tabelle reproduziert mit Genehmigung von Mary Ann Liebert, Inc.).

### 3.3 FVIII-Expression in primären hämatopoetischen Zellen

Nachdem die in 3.2 beschriebenen Experimente gezeigt haben, daß hämatopoetische Zellen grundsätzlich in der Lage sind, BDD FVIII zu sezernieren, wurden im weiteren primäre hämatopoetische Zellen aus verschiedenen Quellen auf ihre Fähigkeit untersucht, BDD FVIII rekombinant zu exprimieren. Das größte therapeutische Interesse liegt dabei auf Zellen mit Stammzeleigenschaften, die – wenn sie erfolgreich transduziert und (re)infundiert sind – durch Expansion und Differenzierung langfristig zur FVIII-Substitution beitragen könnten.

In dieser Studie wurden als Quellen für hämatopoetische Stammzellen sowohl humane CD34-positive Zellen aus peripherem Blut (3.3.1) als auch murine Linien-depletierte Knochenmarkzellen (3.3.2) ausgewählt. Die wichtigsten Ergebnisse werden in 3.3.1 und 3.3.2 anhand repräsentativer Experimente dargestellt.

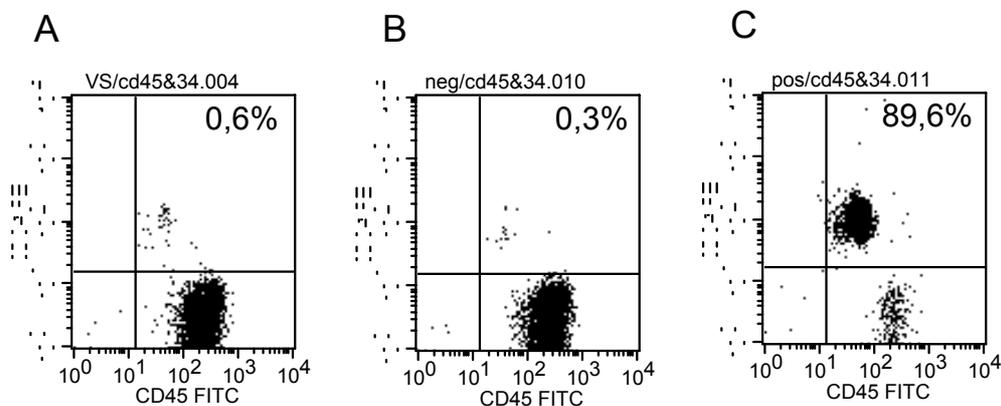
### 3.3.1 FVIII-Gentransfer in primäre humane Zellen

#### 3.3.1.1 CD34-positive Zellen als Zielzellen

##### Isolation von CD34-positiven Zellen aus peripherem Blut

Die Frequenz von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut reicht bei den meisten Spendern nicht aus, um sie für therapeutische Zwecke zu verwenden, aber durch intravenöse Gabe von Wachstumsfaktoren wie G-CSF können diese Zellen, die in größerer Zahl im Knochenmark vorhanden sind, mobilisiert werden, so daß ein Teil dieser Zellen innerhalb weniger Tage vom Knochenmark ins periphere Blut eintritt (Lapidot & Petit, 2002). Die Mobilisierung ist für den Patienten nach bisherigen Erkenntnissen mit nur geringen Nebenwirkungen verbunden, und mobilisierte HSC können in der Regel von fast allen Patienten gewonnen werden. Diese Zellen in Leukapheresaten aus vorbehandelten Patienten sollten daher das Ausgangsmaterial für diese Studie darstellen.

Aus den Leukapheresaten wurden durch magnetische Zellseparation (MACS) mit dem Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) CD34-Zellen von einer Frequenz unter 1% auf etwa 90% Reinheit angereichert. In Abb. 3.13 ist beispielhaft das Ergebnis einer CD34-Anreicherung gezeigt.

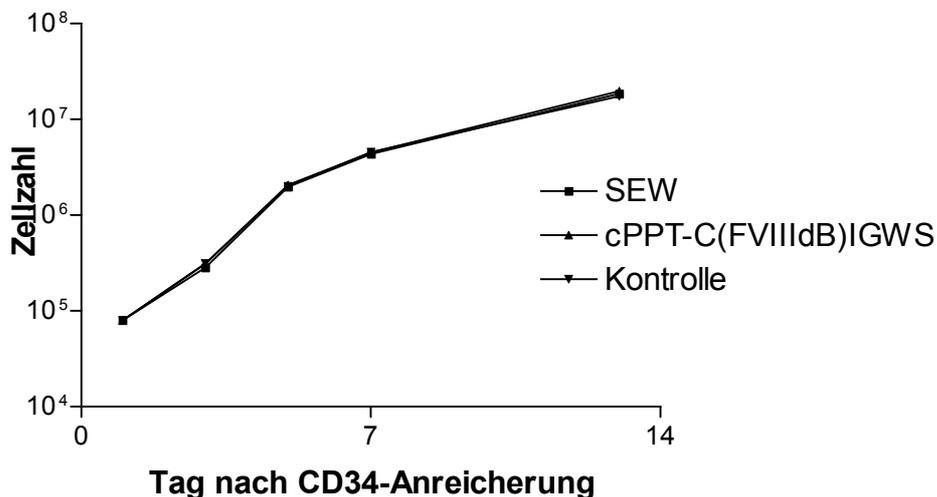


**Abb. 3.13. Anreicherung von CD34-positiven Zellen aus peripherem Blut mit MACS.** Zellen aus peripherem Blut eines mit G-CSF (Neupogen<sup>®</sup>) vorbehandelten Spenders wurden vor der magnetischen Zellseparation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD34 und CD45 gefärbt (A). Um die Qualität der Anreicherung zu überprüfen, wurden Zellaliquots aus den Negativfraktionen (B) sowie der Positivfraktion (C) mit den gleichen Antikörpern markiert. Die Expression von CD34 und CD45 wurde durchflußzytometrisch detektiert. Die Zahlen geben den Anteil der CD34/CD45-positiven Zellen im oberen rechten Quadranten an.

### Expansionskultur mit IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L

Die Zellen wurden nach Isolation (Tag 0) wie in 2.2.6.3 beschrieben mit den rekombinanten humanen Zytokinen IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L kultiviert. Unter den gewählten Bedingungen war eine Expansion der Gesamtzellzahl um 100-200 innerhalb der ersten zwei Wochen möglich (Abb. 3.14).

Nach 7 und 15 Tagen wurden die untransduzierten Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenantigene gefärbt, um die Zellpopulationen im Verlauf der Expansion zu charakterisieren. Wie Tab. 3.4 zeigt, lag zu Beginn des Experimentes (an Tag 0 direkt nach der CD34-Isolation) eine Zellpopulation vor, die fast komplett das Leukozyten-antigen CD45 und zu 90% den Stammzellmarker CD34 exprimierte. Im Verlauf der Kultur blieb der Prozentsatz der CD45-Expression konstant, da CD34-positive Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen nur in verschiedene Leukozyten-Subtypen und ihre Vorläufer, nicht aber in andere Zellen differenzieren konnten. Die Expression des Stammzellmarkers CD34 verschwand dagegen fast völlig bei längerer *ex vivo*-Kultur. Die Daten belegten, daß die Zellen während der Expansion in die Richtung von myeloiden (Granulozyten und Makrophagen) und lymphoiden (B-) Zellen differenzierten. Myeloide Zellen exprimieren CD14 (Monozyten/Makrophagen) und CD15 (Granulozyten), und die Expression von CD20



**Abb. 3.14. Expansion von CD34-Zellen.** Nach Anreicherung der CD34-positiven Zellen an Tag 0 wurde ein Teil der Zellen an den Tagen 1 und 2 insgesamt zweimal mit den Vektoren SEW und cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS (MOI jeweils 100) transduziert. Sowohl transduzierte Zellen als auch nicht-transduzierte Zellen (Kontrolle) wurden mit IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L expandiert. Im Diagramm ist die kumulative Gesamtzellzahl der Kulturen aufgetragen.

Oberflächenantigen	Expressionsmuster	Tag 0	Tag 7	Tag 15
CD45	alle Leukozyten	99,2%	98,9%	99,7%
CD34	HSC	90,1%	36,7%	1,4%
CD14	Monozyten/Makrophagen, Granulozyten	n.g.	8,8%	11,5%
CD15	Granulozyten, Monozyten/Makrophagen	n.g.	0,9%	38,7%
CD3	T-Zellen	n.g.	<0,1%	<0,1%
CD20	B-Zellen	n.g.	6,5%	21,5%
HLA-DR	Monozyten/Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen	n.g.	97,1%	40,8%

**Tab. 3.4. Veränderung des Expressionsmusters von Oberflächenantigenen bei der Expansion von HSC.** CD34-positive HSC wurden über 15 Tage in Gegenwart von IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L kultiviert und durch Inkubation mit den angegebenen monoklonalen Antikörpern charakterisiert (n.g., nicht gemessen).

deutet auf B-Zellen oder B-Zell-Vorläufer hin. T-Zellen, für die die Expression von CD3 charakteristisch ist, konnten nicht detektiert werden. Diese Interpretation wird gestützt durch die Tatsache, daß an Tag 15 nur noch ein Teil der Zellen für HLA-DR positiv war, dessen Expression auf Monozyten/Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen begrenzt ist, aber auf anderen hämatopoetischen Zellen wie Granulozyten oder T-Lymphozyten nicht gefunden wird.

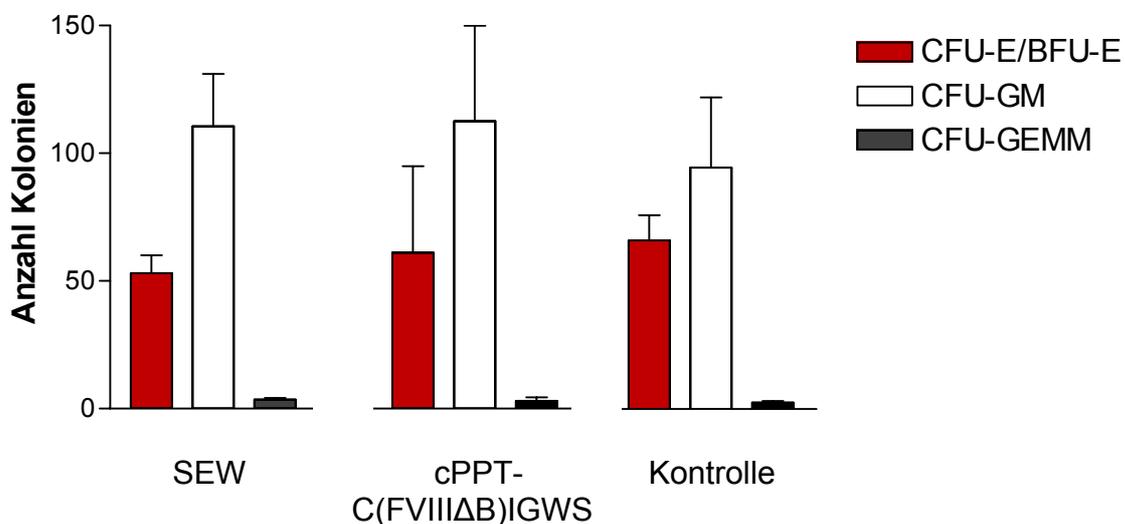
#### Lentivirale Transduktion von CD34-positiven Zellen

Nach Vorstimulation mit IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L wurden die Zellen an den Tagen 1 und 2 insgesamt zweimal mit den Vektoren SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS (MOI jeweils 100) transduziert. Der Vektor cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS wurde gewählt, da mit diesem in Experimenten mit Zelllinien (3.1.3) höhere Virustiter und höhere Transgenexpression sowohl in bezug auf Transduktionseffizienz wie auch auf Intensität der FVIII- und EGFP-Expression erreicht wurden als mit dem Vorgängerkonstrukt C(FVIII $\Delta$ B)IGWS ohne cPPT/CTS-Element.

Während der Transduktion und der nachfolgenden Expansion wurde die Zusammensetzung des Mediums konstant gehalten. Ein Teil der transduzierten Zellen sowie der nicht-transduzierten Kontrollzellen wurden an Tag 3 für Methylcellulose-Assays mit MethoCult H4434

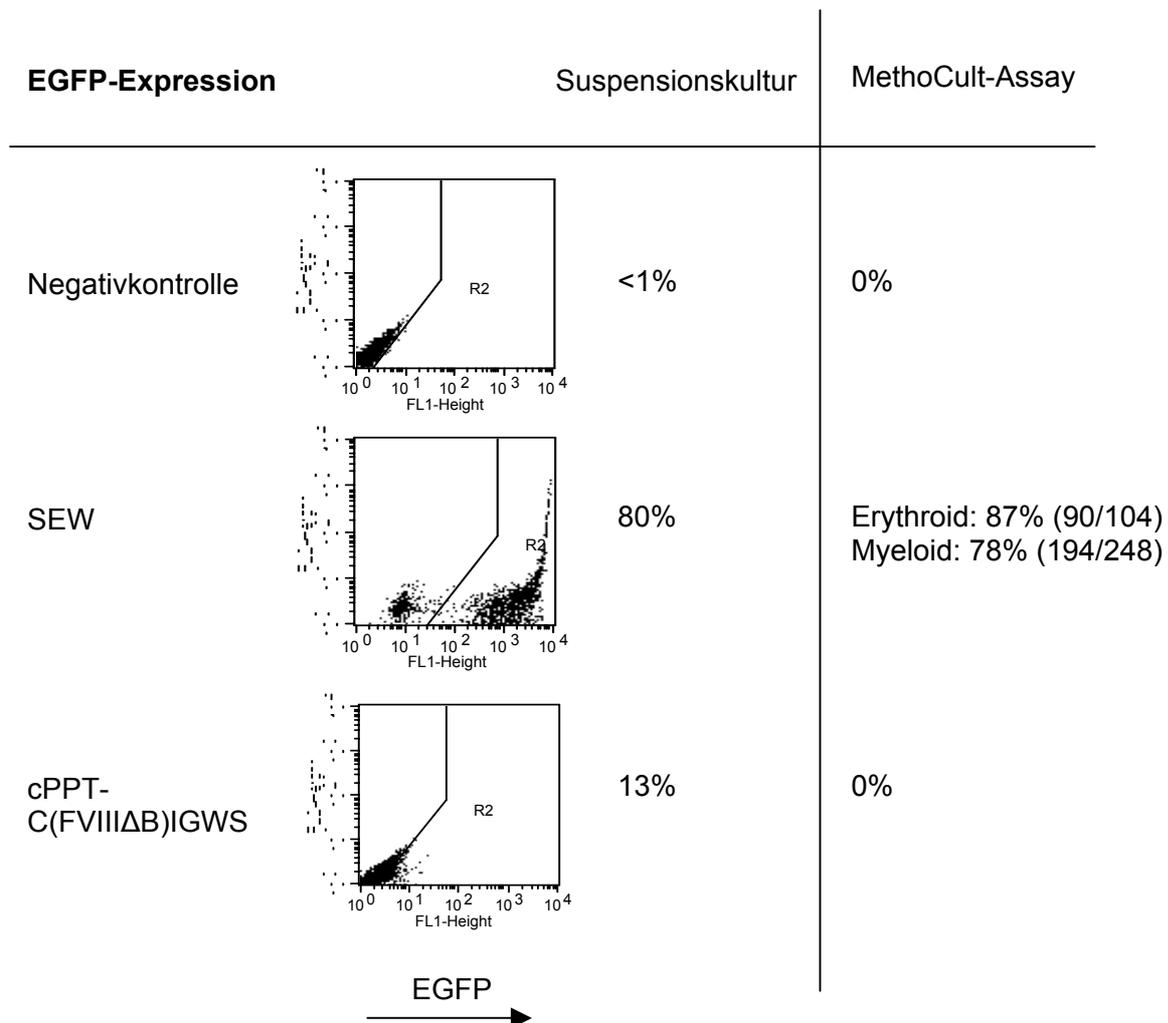
(StemCell) verwendet. Die Transduktion hatte keinen Einfluß auf die Proliferation der Zellen (Abb. 3.14) oder auf die Fähigkeit, im Methycellulose-Assay myeloide und erythroide Kolonien zu bilden (Abb. 3.15).

Die EGFP-Expression wurde durchflußzytometrisch an den Tagen 7, 13 und 15 bestimmt. Nach Transduktion mit dem Vektor SEW lag der Anteil der EGFP-positiven Zellen recht stabil bei 80,3%, 65,9% und 68,0%. Nach Transduktion mit dem Vektor cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS konnte an Tag 7 eine sehr schwache EGFP-Expression in 12,5% der Zellen detektiert werden, die an Tag 13 (1,2%) bzw. Tag 15 (<1%) kaum noch meßbar war. Abb. 3.16 zeigt die EGFP-Expression der Expansionskulturen an Tag 7. Zudem wurde die EGFP-Expression der Zellen in den Progenitorzell-Assays an Tag 19 bestimmt. In den SEW-transduzierten Zellen, die als Positivkontrolle dienten, waren 90 von 104 erythroiden Kolonien bzw. 194 von 248 myeloiden Kolonien EGFP-positiv (87% bzw. 78%). Insgesamt konnten also 81% der koloniebildenden Zellen transduziert werden. Die cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierten Zellen bildeten keine EGFP-positiven Kolonien, so daß für diesen Vektor weder durch FACS-Charakterisierung der Suspensionskultur noch durch Auszählung fluoreszenter Kolonien die Effizienz des Gentransfers bestimmt werden konnte.



**Abb. 3.15. Koloniebildung im MethoCult-Assay.** CD34-Zellen wurden an den Tagen 1 und 2 jeweils einmal mit den genannten Vektoren (MOI 100) transduziert. An Tag 3 wurden in zwei Schälchen je 500 Zellen der einzelnen Kulturen in MethoCult H4434 ausgesät. Die Kolonien wurden an Tag 19 gezählt. Etwa 30-35% der ausplattierten Zellen bildeten Kolonien. Angegeben sind die Mittelwerte der Duplikate mit der zugehörigen Standardabweichung (SD). Abkürzungen: CFU-E/BFU-E: erythroide Kolonien; CFU-GM: myeloide Kolonien; CFU-GEMM: gemischte (myeloide und erythroide) Kolonien.

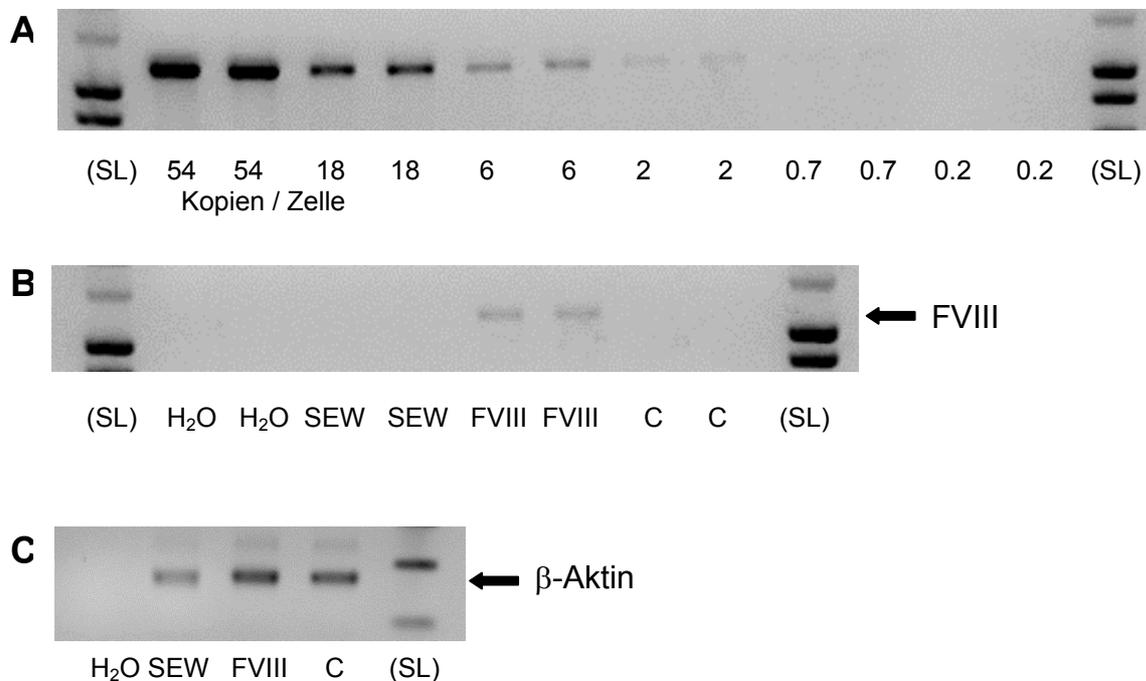
Um zu überprüfen, ob das Fehlen der EGFP-Expression in den cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierten Zellen auf niedrige Effizienz des Gentransfers oder auf Expressionsprobleme zurückzuführen war, wurde genomische DNA der transduzierten sowie der nicht-transduzierten Zellen isoliert und für PCR-Ansätze mit BDD FVIII- und  $\beta$ -Aktin-spezifischen Oligonukleotiden verwendet. In jeder FVIII-PCR wurde die gleiche Menge an genomischer DNA (100 ng) eingesetzt, um dann die Banden, die mit genomischer DNA aus transduzierten Zellen erhalten wurden, mit Referenzbanden zu vergleichen, die aus PCRs mit definierten Kopienzahlen eines BDD FVIII-kodierenden Plasmids stammten. Zusätzlich zu den verschiedenen Mengen an Plasmid-DNA enthielten die PCR-Ansätze für die Kalibrierung genomische DNA aus untransduzierten oder SEW-transduzierten Zellen ohne BDD FVIII-Transgen, so daß die Reaktionsbedingungen so einheitlich wie möglich waren. Die



**Abb. 3.16. EGFP-Expression in lentiviral transduzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen.** MACS-angereicherte CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden je zweimal mit den Vektoren SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert und in Suspensionskulturen expandiert bzw. nach der zweiten Transduktion für Progenitorzell-Assays in MethoCult H4434 ausplattiert. Nach 7 bzw. 19 Tagen wurden die Anteile der EGFP-positiven Zellen im FACS bzw. der EGFP-positiven Kolonien durch Auszählen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

PCR-Ansätze für  $\beta$ -Aktin sollten als Kontrollen dienen und zeigen, daß die eingesetzte DNA-Menge in allen Ansätzen ungefähr gleich war und daß das Fehlen von FVIII-Banden in den jeweiligen PCRs auf die Abwesenheit der FVIII-cDNA und nicht etwa auf unzureichende Menge oder Qualität der verwendeten DNA zurückzuführen war.

In Abb. 3.17 ist am Beispiel des bereits oben beschriebenen Experimentes eine Bestimmung der FVIII-cDNA-Kopien in transduzierten Zellen mit semi-quantitativer PCR dargestellt. In Abb. 3.17A sind die FVIII-Kalibrierungsbanden (jeweils in Duplikaten) zu sehen, in Abb. 3.17B die Banden aus transduzierten und nicht-transduzierten Zellen sowie Negativkontrollen ohne DNA (nur H<sub>2</sub>O). Abb. 3.17C zeigt die Banden der  $\beta$ -Aktin-Kontrollen.

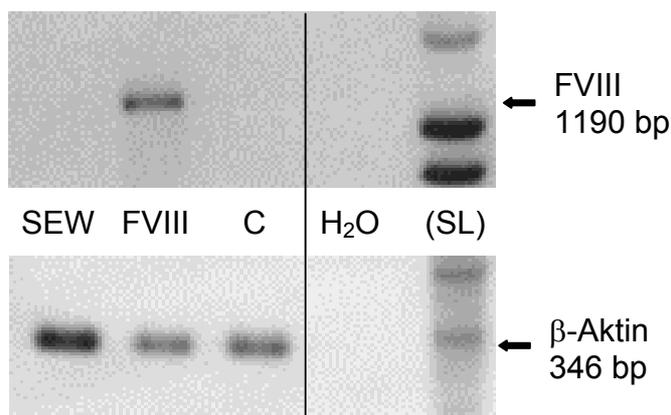


**Abb. 3.17. Gentransfer von BDD FVIII cDNA in humane HSC.** Genomische DNA aus CD34-Expansionskulturen (Tag 14) wurde für PCR-Ansätze mit BDD FVIII- und  $\beta$ -Aktin-spezifischen Oligonukleotiden verwendet. Ein Gemisch von 100 ng genomischer DNA und definierten Mengen an Plasmid-DNA wurde für eine FVIII-Kalibrierung eingesetzt (A; jeweils Duplikate). PCR-Ansätze mit genomischer DNA (100 ng) von transduzierten und nicht-transduzierten Zellen erlaubten eine Bestimmung der mittleren BDD FVIII-Kopienzahl in diesen Zellen (B; jeweils Duplikate) durch Quantifizierung der Bandenintensitäten und lineare Regression.  $\beta$ -Aktin-PCRs wurden zu Kontrollzwecken ebenfalls durchgeführt (C). (Abkürzungen: FVIII, cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS; C: untransduzierte Kontrolle; SL, Größenmarker; H<sub>2</sub>O, Wasserkontrolle)

Die Intensitäten der FVIII-Banden wurden mit der Software Quantity One bestimmt, und die Kopienzahl in den cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen wurde über lineare Regression ermittelt. Nach einer zweifachen Durchführung der in Abb. 3.17 gezeigten PCR wurde ein Mittelwert von 2 BDD FVIII-Kopien in den cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen erhalten.

Nach Isolation von polyA<sup>+</sup>-mRNA aus transduzierten und nicht-transduzierten Zellen an Tag 14 wurde durch RT-PCR überprüft, ob in den cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen BDD FVIII-mRNA vorlag. Wie bei den PCR-Ansätzen mit genomischer DNA dienten β-Aktin-Ansätze als Kontrollen. Abb. 3.18 demonstriert, daß nur in den cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen BDD FVIII-mRNA exprimiert wurde, nicht aber in den SEW-transduzierten Zellen und in den nicht-transduzierten Zellen. Die β-Aktin-PCR lieferte erwartungsgemäß Banden für alle drei mRNA-Präparationen. Kontrollen mit Taq-Polymerase, aber ohne Reverse Transkriptase ergaben keine PCR-Produkte, so daß die in Abb. 3.18 dargestellten Banden nicht auf Kontaminationen mit genomischer DNA zurückführbar waren.

Nach dem Nachweis, daß die cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen sowohl BDD FVIII-DNA als auch BDD FVIII-mRNA enthielten, wurden Kulturüberstände der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten auf FVIII-Protein im Überstand mit ELISA (FVIII:Ag) getestet. Transduzierte und nicht-transduzierte Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 24 Stunden in einer Zelldichte von 10<sup>6</sup>/ml kultiviert. Die Überstände der Tage 5, 14 und 21 wurden im ELISA untersucht. In allen Ansätzen lag jedoch die FVIII:Ag-Konzentration unter dem Detektionslimit von 2 ng/ml (Tab. 3.5).



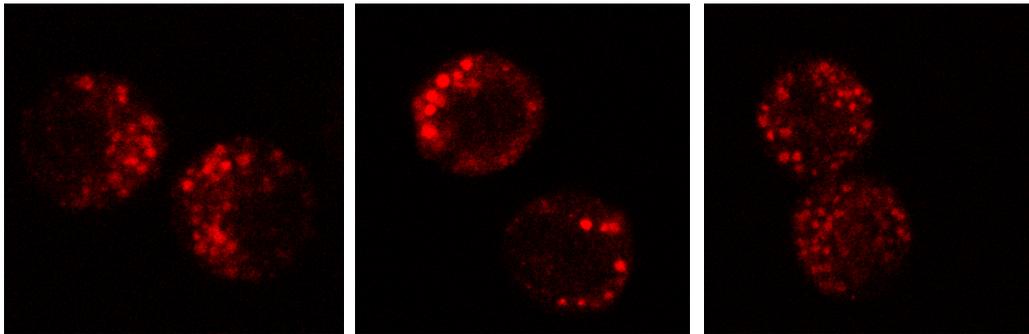
**Abb. 3.18. Transkription von BDD FVIII-mRNA in humanen CD34-Expansionskulturen (Tag 14).** PolyA<sup>+</sup>-mRNA wurde für RT-PCR-Ansätze mit BDD FVIII- und β-Aktin-spezifischen Oligonukleotiden verwendet. (Abkürzungen: FVIII, cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS; C: untransduzierte Kontrolle; SL, Größenmarker; H<sub>2</sub>O, Wasserkontrolle)

Vektor	ng FVIII/10 <sup>6</sup> Z. x 24h (Tag 5)	ng FVIII/10 <sup>6</sup> Z. x 24h (Tag 14)	ng FVIII/10 <sup>6</sup> Z. x 24h (Tag 21)
SEW	<2	<2	<2
cPPT- C(FVIIIΔB)IGWS	<2	<2	<2
Negativkontrolle	<2	<2	<2

**Tab. 3.5. Messung von FVIII:Ag im Überstand von CD34-Expansionskulturen.** Transduzierte und untransduzierte Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Expansion in einer Zelldichte von 10<sup>6</sup> Zellen je ml ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und im ELISA auf FVIII:Ag getestet. In allen Messungen lagen die FVIII:Ag-Konzentrationen unter dem Detektionslimit von etwa 2 ng/ml.

Die Anwesenheit von BDD FVIII-RNA und die Abwesenheit von FVIII:Ag im Kulturüberstand könnten verschiedene Ursachen wie ineffiziente intrazelluläre Prozessierung oder ineffiziente Sekretion des FVIII-Proteins haben. Mit einer intrazellulären immunzytochemischen Färbung sollte daher die abschließende Hypothese geprüft werden, daß das FVIII-Protein zwar translatiert, dann aber nicht aus der Zelle sezerniert werden kann.

Zellen wurden nach Transduktion mit dem Vektor cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS (MOI jeweils 50) an den Tagen 1 und 2 expandiert und an Tag 11 für die intrazelluläre Färbung verwendet. Die Färbung wurde mit einem FVIII-spezifischen Erstantikörper und einem Alexa-Rot-markierten Sekundärantikörper durchgeführt. Die Auswertung wurde mit einem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop vorgenommen. In einem Teil der cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen wurden starke rote Fluoreszenzsignale detektiert (Abb. 3.19), die in analog gefärbten untransduzierten Zellen nicht zu sehen waren, so daß die rote Fluoreszenz ein BDD FVIII-spezifisches Signal darstellte. Die gezeigten Beispiele deuteten eine Verteilung des FVIII-Proteins in diskreten Aggregaten in der Zellen an, während cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierte K562-Zellen oder HUVEC, die sehr hohe Mengen an aktivem FVIII-Protein sezernierten, ein anderes Verteilungsmuster aufwiesen (Signale gleichmäßiger Intensität im Zytoplasma, keine Aggregate dieser Größe; Dr. Sven Becker, persönliche Mitteilung).



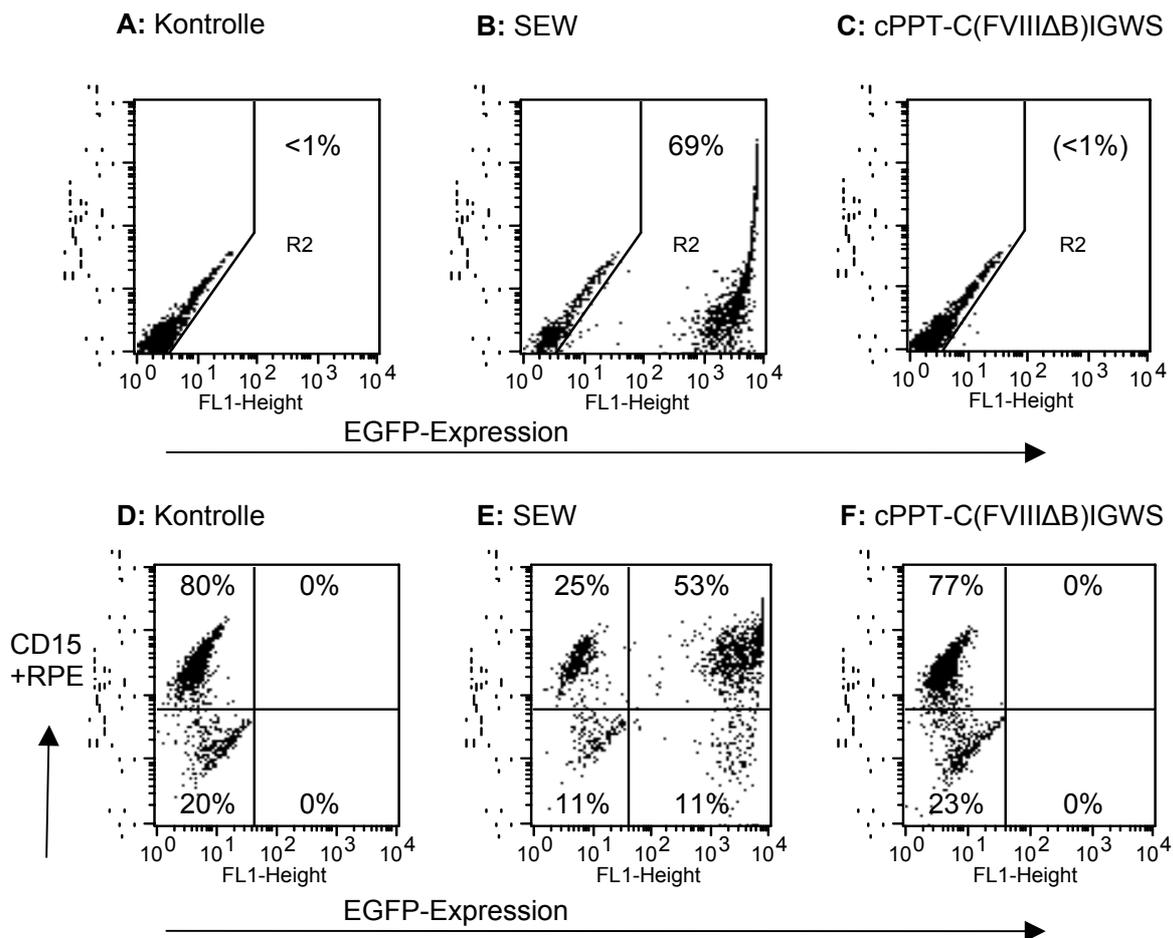
**Abb. 3.19. Immunzytochemische Anfärbung von FVIII in transduzierten hämatopoetischen Zellen.** CD34-positive Zellen wurden zweimal mit dem Vektor cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert (MOI jeweils 50) und in Anwesenheit von IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L expandiert. Zehn Tage nach der ersten Transduktion wurden die Zellen mit einem FVIII-spezifischen Erstantikörper und einem Alexa-Rot-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die Detektion des FVIII-Signals erfolgte durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie. Untransduzierte Zellen wurden als Negativkontrollen mitgeführt und zeigten keine FVIII-spezifischen Signale. Die intrazelluläre Färbung und die anschließende Auswertung wurden von Dr. Sven Becker (BSD) durchgeführt.

### 3.3.1.2 Differenzierung von Granulozyten aus lentiviral transduzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen

Granulozyten stellen mit 50% bis 60% die größte Subpopulation aller Leukozyten im Blut dar und sind damit von besonderem Interesse bei der rekombinanten Expression von Proteinen durch hämatopoetische Zellen. In der in 3.3.1 beschriebenen Expansionskultur von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L kommt es innerhalb von 15 Tagen zwar zu Differenzierungsprozessen in die Richtung myeloider Zellen (Expression von CD15 und CD14), aber mit einem spezifischeren Differenzierungsprotokoll können der Anteil von funktionalen Granulozyten noch deutlich erhöht (Becker et al., 1998) und die potentielle Expression von BDD FVIII in diesem Zelltyp exakter untersucht werden.

Parallel zu dem in 3.3.1.1 beschriebenen Experiment wurden CD34-positive Zellen aus peripherem Blut in IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L kultiviert und an den Tagen 1 und 2 nach CD34-Anreicherung mit den lentiviralen Vektoren SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS (MOI jeweils 100) transduziert. An Tag 7 betrug die Gesamtzellzahl das 50-60fache der Ausgangszellzahl für die Transduktion (Abb. 3.14). Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Teil der Zellen zur Bestimmung der Transduktionseffizienz durchflußzytometrisch auf die Expression von EGFP untersucht. Die SEW-transduzierten Zellen waren zu 80,3% EGFP-positiv, und 12,5% der cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierten Zellen zeigten eine schwache EGFP-Expression (Abb. 3.16). Diese Zellen sowie untransduzierte Kontrollzellen wurden in MyeloCult H5100 in

Gegenwart von Hydrocortison, G-CSF und SCF kultiviert und an Tag 20 in diesem Medium auf eine Zelldichte von  $10^6$ /ml eingestellt. Nach 24 Stunden wurden der Überstand der Zellen für FVIII-Assays und die Zellen für FACS-Analysen verwendet. Die FACS-Analyse zeigte, daß der Anteil CD15-exprimierender Zellen von unter 1% (Tab. 3.4) auf fast 80% erhöht werden konnte (Abb. 3.20D). Dieser Differenzierungsprozeß wurde durch die lentivirale Transduktion nicht beeinflusst (Abb. 3.20E&F).



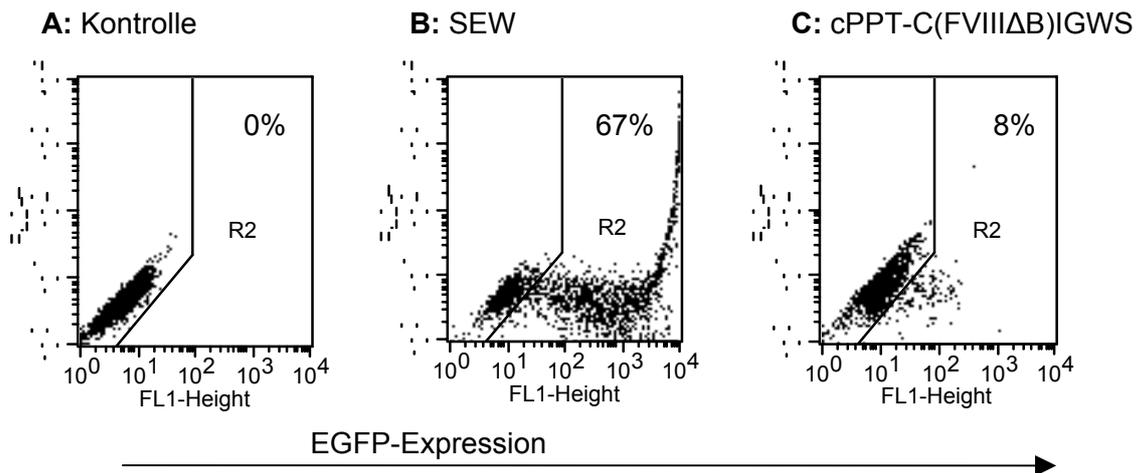
**Abb. 3.20. Differenzierung von lentiviral transduzierten HSC in Granulozyten.** CD34-positive HSC aus peripherem Blut wurden während der Expansion mit IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L (Tage 0-7) zweimal mit einer MOI von 100 transduziert (Tage 1 und 2, Konstrukte SEW und cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS). An Tag 7 wurden transduzierte und nicht-transduzierte Zellen für Granulozyten-Differenzierungskulturen in MyeloCult H5100 (StemCell) mit Hydrocortison, G-CSF und SCF eingesetzt. Nach fünfzehntägiger Differenzierung wurde ein Teil der Zellen durchflußzytometrisch auf EGFP-Expression untersucht (A-C), während die restlichen Zellen mit einem Erstantikörper gegen den Granulozyten-Marker CD15 und einem RPE-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt wurden, so daß durchflußzytometrisch sowohl die CD15- als auch die EGFP-Expression untersucht werden konnten (D-F). In A&D sind untransduzierte Kontrollzellen gezeigt, in B&E bzw. C&F sind SEW- bzw. cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierte Zellen dargestellt.

Die EGFP-Expression der SEW- und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierten Zellen betrug 68,5% bzw. <1% (Abb. 3.20D-F) und unterschied sich somit nicht vom Verhalten der Mischkulturen, die mit IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L expandiert wurden (3.3.1.1). Die Zellkulturüberstände der transduzierten sowie der nicht-transduzierten Zellen wurden im ELISA auf FVIII:Ag untersucht. Die Meßwerte aller Kulturen lagen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze von 2 ng/ml, so daß sich die differenzierten Granulozyten in bezug auf FVIII-Expression nicht von CD34-positiven HSC unterschieden.

### 3.3.1.3 Transduktion von Makrophagen

In der in 3.3.1.1 beschriebenen Expansionskultur von CD34-positiven Zellen kam es gerade in der zweiten Woche der Kultur zu Differenzierungsprozessen, die durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker sichtbar wurde. Die Zusammensetzung des Mediums war jedoch nicht geeignet, um aus HSC reife Makrophagen entstehen zu lassen, deren Potential zur FVIII-Expression ebenfalls untersucht werden sollte. Neben der Option, Makrophagen aus CD34-positiven HSC zu gewinnen, besteht die Möglichkeit, mit mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC) nicht-mobilisierter Spender zu arbeiten. Das in dieser Studie verwendete Protokoll basiert auf der Isolation von PBMC aus Buffy Coats über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Die PBMC wurden in Teflonbeuteln mit Medium kultiviert, das u. a. humanes AB-Serum enthielt. Am Tag 7 wurden die Zellen geerntet und über einen Adhärenzschritt so aufgearbeitet, daß eine morphologisch reine Makrophagen-Population erhalten wurde.

Am Tag 10 wurden die Makrophagen einmal mit den lentiviralen Vektoren SEW bzw. cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert (MOI jeweils 105; je Vertiefung  $2 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l). Überstände dieser Kulturen sowie von nicht-transduzierten Zellen an den Tagen 12, 14 und 17 wurden im ELISA auf FVIII:Ag getestet. In allen untersuchten Überständen lagen die FVIII:Ag-Konzentrationen jedoch unterhalb der Detektionsschwelle von 2 ng/ml. Die Zellen wurden am Tag 19 mit Accutase abgelöst und im FACS auf EGFP-Expression untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 3.21) zeigten, daß das verwendete lentivirale System durchaus für die Transduktion dieses Zelltyps geeignet ist (Transduktionseffizienz der Positivkontrolle SEW bei 67,3%). Dennoch war der Anteil der Zellen, die das bicistronische Konstrukt cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS exprimierten, recht gering (EGFP-Expression in 7,6% der Zellen), so daß eine potentielle FVIII-Expression nicht nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 3.21. Lentivirale Transduktion von humanen Makrophagen.** Reife Makrophagen wurden aus PBMC in Humanserum-haltigem Medium ausdifferenziert und mit den lentiviralen Vektoren SEW und cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS transduziert (je eine Transduktion, MOI 105). Neun Tage nach Transduktion und Kultur in Humanserum-freiem Medium wurden die Zellen mit Accutase abgelöst und im FACS auf EGFP-Expression untersucht. In A, B und C sind nicht-transduzierte Zellen, SEW-transduzierte Zellen bzw. cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierte Zellen dargestellt.

### 3.3.2 FVIII-Gentransfer in primäre Mauszellen

#### Isolation von Knochenmarkzellen und Anreicherung von koloniebildenden Zellen

Adulte Mäuse (C57BL/6 und E-17 FVIII-defiziente Mäuse) wurden durch zervikale Dislokation getötet und Knochenmark durch Ausspülen von Femora und Tibiae gewonnen. Um Zellen mit Stammzeleigenschaften anzureichern, wurden differenzierte hämatopoetische Zellen, die die Oberflächenantigene CD5, CD45R, CD11b, Gr-1, TER119 oder das vom 7/4-Antikörper erkannte Epitop exprimierten, durch magnetische Zellseparation mit dem StemSep-System wie in 2.2.5.3 beschrieben depletiert, so daß sogenannte 'lineage'-negative Zellen übrig blieben.

Die Anreicherung von Stammzellen wurde durch einen Surrogatassay überprüft, indem ein Teil der Zellen in Methylcellulose (Methocult M3434) ausplattiert und der Anteil der koloniebildenden Zellen bestimmt wurden (vgl. 2.2.5.6). Der Anteil an koloniebildenden Zellen betrug vor Depletion  $0,54\% \pm 0,12\%$ . Durch die Depletion von bereits differenzierten hämatopoetischen Zellen konnte dieser Anteil um den Faktor  $14,1 \pm 4,2$  auf  $7,4\% \pm 1,8\%$  gesteigert werden. Diese Werte beziehen sich auf 4 unabhängige Experimente mit je 20-30 Mäusen.

### Lentivirale Transduktion von Maus-KMZ

Liniendepletierte KMZ von E-17- und C57BL/6-Mäusen wurden nach Prästimulation mit IL-3, IL-6 und SCF zweimal mit den lentiviralen Vektoren SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert. Nach 16 bzw. 11 Tagen wurden die Anteile der EGFP-positiven Zellen durchflußzytometrisch in Suspensionskulturen bzw. durch Auszählen von Kolonien von Progenitorzell-Assays bestimmt. Die in den Versuchen erreichten Transduktionseffizienzen waren nicht einheitlich und schienen von den Spendermäusen und von der jeweiligen Zellpräparation abzuhängen.

In Abb. 3.22 sind die Ergebnisse eines Experimentes mit FVIII-defizienten E-17-Mäusen dargestellt. In der Expansionskultur der mit dem EGFP-Konstrukt SEW transduzierten Zellen waren 72% EGFP-positiv, während in den entsprechenden Methylcellulosen 44% der Kolonien EGFP exprimierten (117 von 263 Kolonien). In den Suspensionskulturen und Progenitorzell-Assays der untransduzierten Zellen sowie der mit dem bicistronischen Konstrukt cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduzierten Zellen waren keine EGFP-exprimierenden Zellen detektierbar.

In einem parallelen Versuch mit C57BL/6-Zellen betrug die Transduktionseffizienzen für SEW in der Suspensionskultur 36,7% und in den MethoCult-Assays 26,9% (21 von 78 Kolonien). In den cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-Kulturen sowie in den untransduzierten Zellen war ebenfalls keine EGFP-Expression meßbar.

Um zu überprüfen, ob bei der Transduktion mit dem Konstrukt cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS ein Gentransfer stattgefunden hat, wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert und für PCR-Ansätze mit BDD FVIII- und  $\beta$ -Aktin-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. In beiden Mausstämmen wurden deutliche BDD FVIII-Banden für die Zellen, die mit dem Vektor cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert wurden, gefunden, nicht aber für die Negativkontrollen (SEW und untransduziert; Abb. 3.23). Mit Hilfe einer Standardkurve von Plasmid-DNA vor dem Hintergrund derselben Menge genomischer DNA konnte eine mittlere Kopienzahl von 4,2 und 2,2 für die E-17- bzw. C57BL/6-Suspensionskulturen, für die keine EGFP-Expression nachweisbar war, ermittelt werden.

Ein ähnliches Bild ergab sich für die Progenitorzell-Assays des E-17-Versuchs. In den cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-Ansätzen waren von 40 Kolonien, die in der PCR ein positives  $\beta$ -Aktin-Signal aufwiesen, 26 Kolonien (65%) auch BDD FVIII-positiv, während bei untransduzierten oder SEW-Zellen alle  $\beta$ -Aktin-positiven Kolonien BDD FVIII-negativ waren (Abb. 3.23).

Mit BDD FVIII-spezifischen (nicht-quantitativen) RT-PCR-Ansätzen wurde geprüft, ob die BDD FVIII-cDNA, die durch Transduktion mit dem Konstrukt cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS in die Zellen eingebracht wurde, auch transkribiert wurde. Wie Abb. 3.24 zeigt, führte die FVIII-

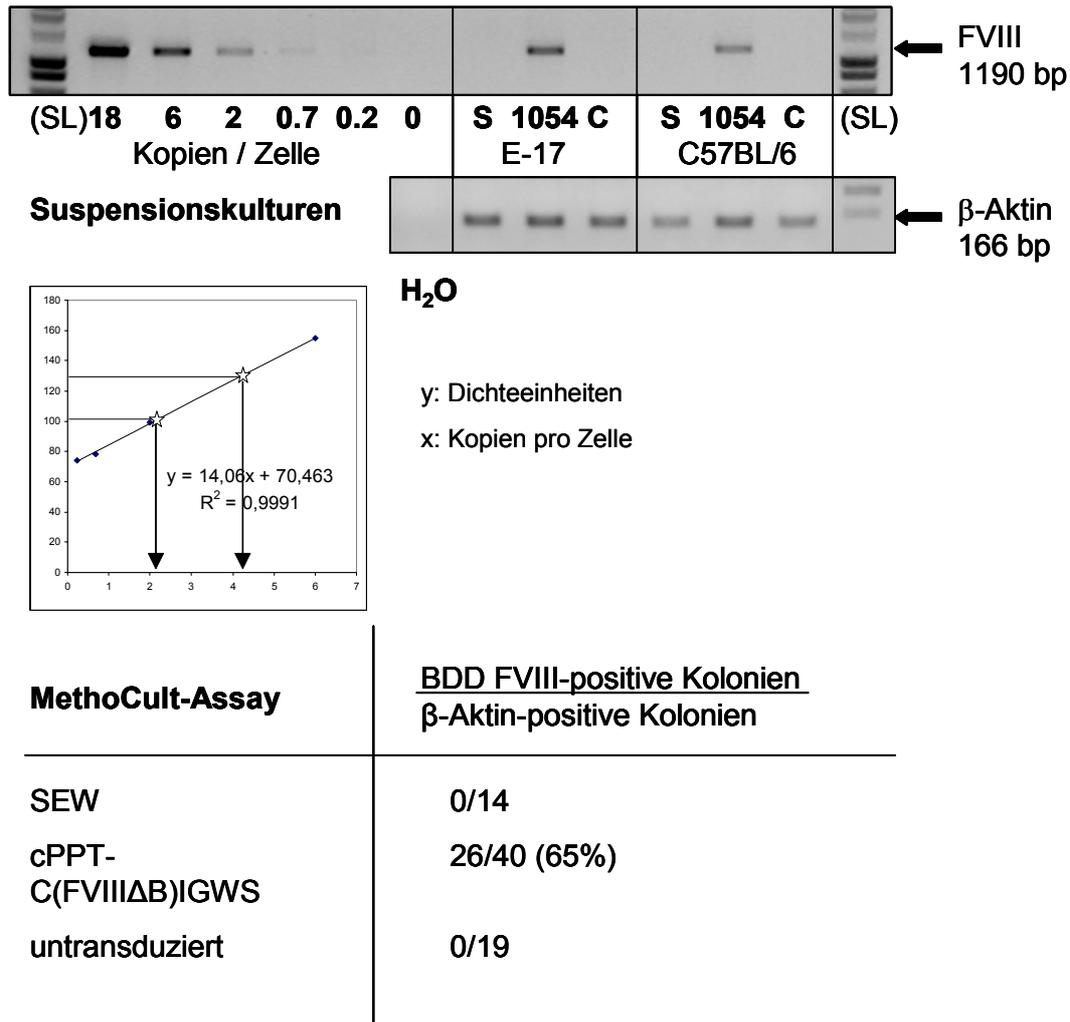
spezifische RT-PCR zu Banden für die cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen und für eine Positivkontrolle, während die SEW- und die untransduzierten Zellen sowie eine Negativkontrolle keine Signale lieferten.

Parallel zu den RT-PCRs mit Reverser Transkriptase und Taq-Polymerase im gleichen Ansatz wurden ebenfalls PCR-Ansätze mit Taq-Polymerase, aber ohne Reverse Transkriptase unter identischen Bedingungen durchgeführt. In diesen Ansätzen waren keine Signale für die cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten Zellen erkennbar, so daß die Banden in den RT-PCR-Ansätzen auf RNA-Transkripte und nicht auf Kontaminationen durch genomische DNA zurückzuführen waren (Daten nicht gezeigt).

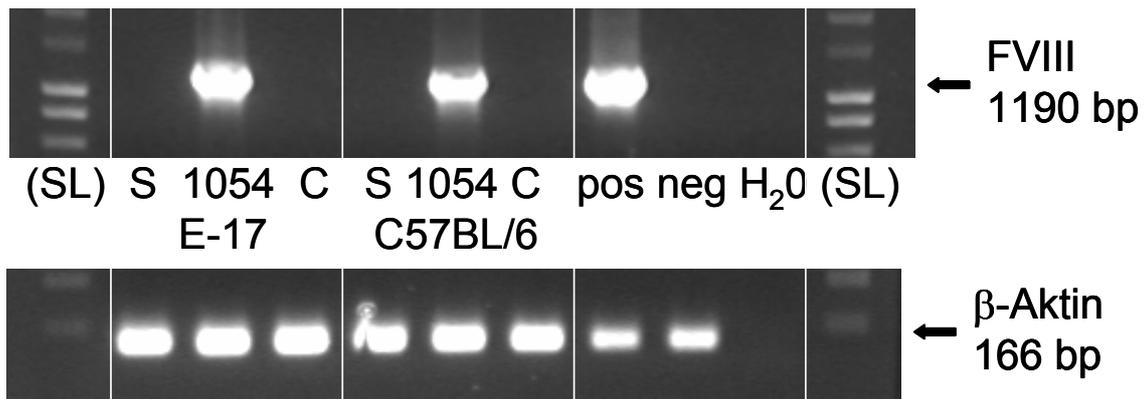
EGFP-Expression	Suspensionskultur	MethoCult-Assay
Negativkontrolle	<1%	0%
SEW	72%	44% (117/263)
cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS	<1%	0%

**Abb. 3.22. EGFP-Expression in lentiviral transduzierten Maus-KMZ.** Liniendepletierte E-17-Zellen wurden jeweils zweimal mit den Vektoren SEW und cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS transduziert und in Suspensionskulturen expandiert bzw. nach der zweiten Transduktion für Progenitorzell-Assays in MethoCult M3434 ausplattiert. Nach 16 bzw. 11 Tagen wurden die Anteile der EGFP-positiven Zellen bzw. Kolonien im FACS bzw. durch Auszählen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt (FL-1-Height: EGFP-Fluoreszenz).

Zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der ersten 15 Tage nach Transduktion wurden Kulturüberstände im ELISA auf FVIII:Ag getestet. Unter den gegebenen Expansionsbedingungen, d. h. in Kultur mit IL-3, IL-6 und SCF, lag jedoch die FVIII:Ag-Konzentration in allen untersuchten Überständen von E-17- und C57BL/6-KMZ unter dem Detektionslimit von 2 ng/ml. Tab. 3.6 gibt die Meßwerte für E-17-Zellen an, die 14 Tage nach der ersten Transduktion über 24 Stunden in Zelldichten von  $10^6$ /ml und  $5 \times 10^5$ /ml ausgesät wurden.



**Abb. 3.23. Gentransfer von BDD FVIII-cDNA in Maus-KMZ.** Von transduzierten und untransduzierten Mauszellen wurde genomische DNA für β-Aktin- und BDD FVIII-spezifische PCR-Ansätze isoliert (oben; Abkürzungen: S, SEW; 1054, cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS; C, Negativkontrolle; SL, Marker). Durch den Vergleich der Banden für die transduzierten Zellen mit der Verdünnungsreihe wurde durch lineare Regression die mittlere Anzahl von BDD FVIII-Kopien pro Zelle ermittelt (Mitte). Die Effizienz des Gentransfers in koloniebildende Zellen wurde ebenfalls durch β-Aktin- und BDD FVIII-spezifische PCR-Reaktionen bestimmt (unten).



**Abb. 3.24. BDD FVIII-Transkription in cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierten Zellen.** RNA aus transduzierten und untransduzierten Zellen wurde mit  $\beta$ -Aktin- und BDD FVIII-spezifischen Oligonukleotiden in RT-PCR-Ansätzen auf Anwesenheit der jeweiligen Transkripte untersucht (Abkürzungen: S, SEW; 1054, cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS; C, Negativkontrolle; SL, Marker). Als Positiv- und Negativkontrollen (pos, neg) für die PCR wurde genomische DNA aus Maus-KMZ eingesetzt, die bereits in vorangehenden PCR-Ansätzen BDD FVIII-positiv bzw. negativ waren.

Suspensionszellen E-17:	ng FVIII:Ag/ 10 <sup>6</sup> Zellen x 24 h
Vektor	
SEW	<2
cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS	<2
untransduziert	<2

**Tab. 3.6. Messung von FVIII:Ag im Überstand von Maus-KMZ.** Transduzierte und untransduzierte E-17-KMZ wurden nach 14tägiger Expansion mit IL-3, IL-6 und SCF in einer Zelldichte von 10<sup>6</sup> Zellen je ml ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und im ELISA auf FVIII:Ag getestet. In allen Messungen lagen die FVIII:Ag-Konzentrationen unter dem Detektionslimit von etwa 2 ng/ml.

Zusammenfassend läßt sich daher festhalten, daß ein lentiviraler Transfer von BDD FVIII-cDNA in liniendepletierte Maus-KMZ mit koloniebildendem Potential möglich war, daß transduzierte Zellen in Suspensionskultur diese cDNA auch transkribierten, aber daß im Kulturüberstand dieser Zellen kein BDD FVIII-Protein nachgewiesen werden konnte.

### **3.4 FVIII-Expression in primären Endothelzellen**

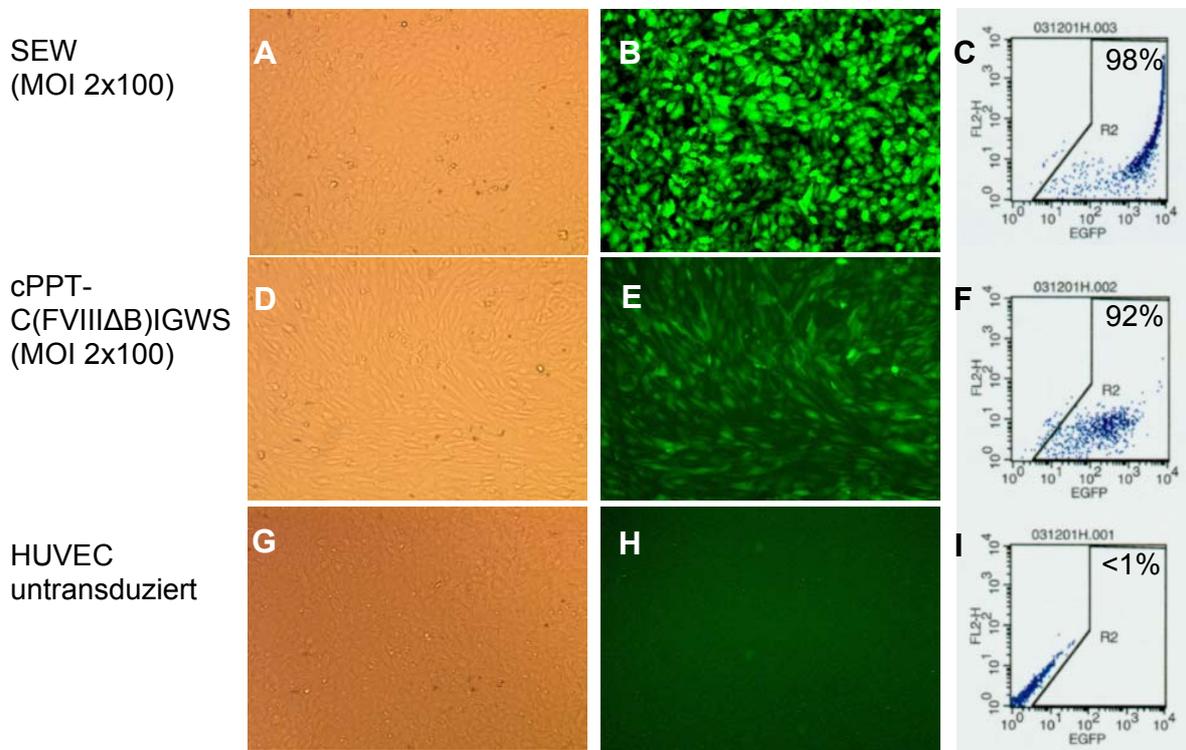
Da der lentivirale Transfer einer BDD FVIII-cDNA weder in CD34-positiven HSC noch in differenzierten hämatopoetischen Zellen zu einer therapeutisch relevanten FVIII-Sekretion führte, wurde untersucht, ob durch eine Differenzierung von CD34-positiven Zellen in Endothelprogenitorzellen (EPC) eine Zellpopulation erhalten werden kann, die das FVIII-Protein exprimieren und sezernieren kann. Da HSC und EPC gemeinsame Eigenschaften wie leichte Verfügbarkeit, Expandierbarkeit und Zugang zum Blutkreislauf besitzen, die für die rekombinante FVIII-Expression im Rahmen eines gentherapeutischen Ansatzes interessant sind, sollte in einem Vorversuch zuerst geklärt werden, ob das für hämatopoetische Zellen verwendete Vektorsystem für Endothelzellen geeignet ist (3.4.1). Zu diesem Zweck wurden humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) als Zielzellen gewählt, die als Zellsystem gut etabliert und von allen primären humanen Endothelzellen am einfachsten verfügbar sind. In einem weiteren Schritt sollten Endothelzellen aus CD34-positiven Nabelschnurblutzellen differenziert und lentiviral transduziert werden, um die Fähigkeit dieser Zellen zur FVIII-Produktion untersuchen und damit ihre mögliche Bedeutung in einem gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung der Hämophilie A abschätzen zu können (3.4.2).

#### **3.4.1 FVIII-Expression in lentiviral transduzierten HUVEC**

HUVEC wurden mit den lentiviralen Konstrukten SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert. Dabei wurden verschiedene Transduktionsbedingungen ausgetestet: je eine Transduktionsrunde bei einer MOI von 10 bzw. 100 sowie zwei Transduktionsrunden bei einer MOI von jeweils 100. Die Zellen wurden an Tag 0 in EGM, das mit 10% FCS supplementiert wurde, ausplattiert ( $2 \times 10^5$  Zellen in 1 ml; Passage 3). An Tag 1 fanden die Transduktionen statt, und an Tag 2 wurde der Virusüberstand von den Zellen abgenommen, und die Zellen erhielten frisches Medium. An den Tagen 4 und 7 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, und das konditionierte Medium wurde für FVIII-Assays verwendet.

Die Transduktionseffizienz wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop und durchflußzytometrisch dokumentiert. Abb. 3.25 zeigt in A, D und G die fast konfluenten HUVEC im Phasenkontrast. Die EGFP-Expression war im Fluoreszenzmikroskop deutlich sichtbar (B und E; Negativkontrolle H), und die FACS-Daten belegten Transduktionseffizienzen von 98% für eine zweimalige Transduktion mit SEW (C) bzw. 92% mit cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS (F; Negativkontrolle I).

Die FVIII:Ag-Konzentrationen, die mit ELISA in den Kulturübständen gemessen wurden, sind in Tab. 3.7 zusammengefaßt. Mit dem lentiviralen Konstrukt cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS konnten FVIII:Ag-Konzentrationen von über 6 IU/ml gemessen werden, wobei eine Transduktion mit einer MOI von 100 auszureichen schien, um die Kapazität der Zellen, FVIII:Ag zu sezernieren, voll auszuschöpfen. Das detektierte FVIII-Protein war gerinnungsaktiv, da der Vergleich von chromogenem Assay und ELISA ein Verhältnis FVIII:C/FVIII:Ag von  $0,91 \pm 0,23$  (n=6) ergab. Dieser Befund deckte sich mit der spezifischen Aktivität des rekombinanten FVIII-Proteins, das von verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien exprimiert wurde, die mit dem Vorgängerkonstrukt C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert wurden (vgl. Tab. 3.3).



**Abb. 3.25. Lentivirale Transduktion von HUVEC.** HUVEC (Passage 3 an Tag 0) wurden an Tag 1 zweimal mit den Konstrukten SEW (A-C) und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS (D-F) transduziert (MOI jeweils 100). Als Negativkontrolle dienten nicht-transduzierte Zellen (G-I). An Tag 5 wurden von den transduzierten Zellen sowie den nicht-transduzierten Kontrollzellen Aufnahmen im Phasenkontrast im Durchlicht bzw. im Fluoreszenzmodus gemacht (A, D, G bzw. B, E, H) gemacht. An Tag 7 der Kultur wurden die Zellen trypsinisiert und die EGFP-Expression durchflußzytometrisch quantifiziert (C, F, I).

Vektor	MOI	Transduktions- runden	FVIII:Ag in IU/ml (Tag 4)	FVIII:Ag in IU/ml (Tag 7)
cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS	10	1	0,39	1,30
cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS	100	1	1,55	5,68
cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS	100	2	1,50	6,36
(Wildtyp)	-	-	<0,01	<0,01

**Tab. 3.7. FVIII:Ag-Konzentrationen im Kulturüberstand von lentiviral transduzierten HUVEC.**

HUVEC wurden an Tag 0 in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  in EGM/10% FCS ausplattiert und an Tag 1 mit dem Konstrukt cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS transduziert. Nach einem kompletten Mediumwechsel an Tag 2 wurden die Zellen in den Kulturplatten belassen, und die Überstände an den Tagen 4 und 7 wurden abgenommen und für FVIII-Assays verwendet. Die FVIII:Ag-Werte für untransduzierte Kontrollzellen lagen unter dem Detektionslimit des ELISA von 0,01 IU/ml.

### 3.4.2 FVIII-Expression in lentiviral transduzierten EPC

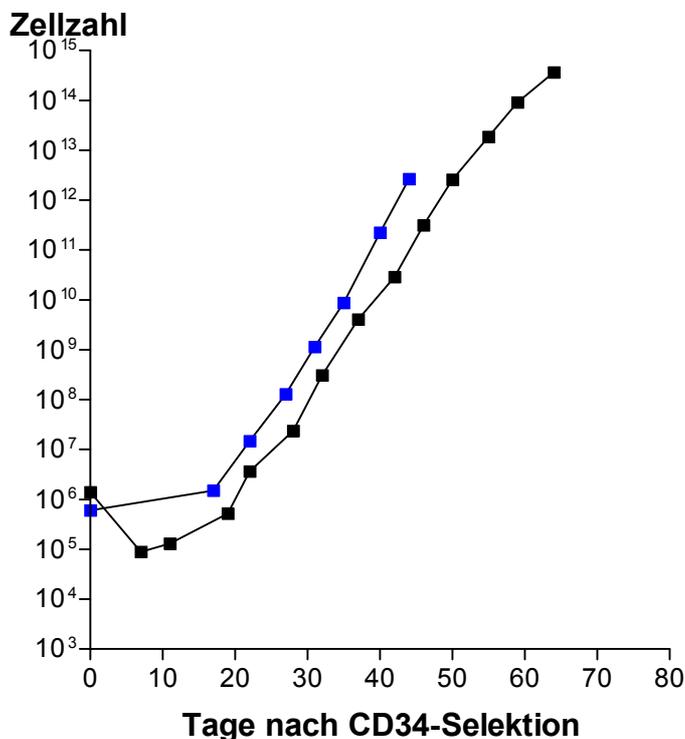
#### 3.4.2.1 Differenzierung von Endothelzellen aus CD34<sup>+</sup>-Nabelschnurblutzellen

CD34-positive Zellen aus Nabelschnurblut wurden mit demselben Verfahren isoliert wie HSC aus Leukapheresaten (vgl. 3.3.1.1), d. h. durch magnetische Zellseparation (MACS) mit dem Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Die Positivfraktionen enthielten CD34-positive Zellen mit einer Frequenz von etwa 80% bis 95%. Zellen von Einzelspendern oder Pools von Zellen verschiedener Spender wurden in EDM mit VEGF, FGF-2, SCF und SCGF-β in Endothelprogenitorzellen (EPC) differenziert und passagiert, bevor die Kulturen konfluent wurden. Nach der ersten Passage erfolgte die Kultur in EGM-2, das neben 2% FCS noch VEGF, EGF, FGF-2, R<sup>3</sup>-IGF, Hydrocortison, Ascorbinsäure, Heparin, Gentamicin und Amphotericin B enthielt. Bei Ausgangszellzahlen von  $10^5$  bis  $10^7$  CD34-positiven Zellen konnten die adhärenenten Zellen um den Faktor  $10^5$  bis  $10^9$  expandiert werden. Zwei Beispiele von Wachstumskurven unter optimierten Bedingungen sind in Abb. 3.26 gezeigt. Die durchschnittliche Verdoppelungszeit für die dargestellten Zellchargen betrug ungefähr 30-35 Stunden.

In Kulturen mit MC aus Nabelschnurblut vor CD34-Selektion oder mit Zellen aus der Negativfraktion der MACS-Anreicherung kam es nicht in allen Fällen und nur mit geringen Ausbeuten zur Differenzierung von EPC. Dies zeigt, daß die Anreicherung von CD34-positiven Zellen eine wichtige Rolle für die Einleitung des Differenzierungsprozesses spielte und legt nahe, daß die EPC aus CD34-positiven Zellen hervorgingen.

Die adhärennten Zellen wuchsen als spindelförmige Zellen mit vereinzelt Bereichen von Zellen, die eher 'Pflasterstein-Morphologie' aufwiesen (Abb. 3.27). Die Zellen besaßen typische Endothelzell-Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Aufnahme von Dil-Ac-LDL, die im Durchflußzytometer und im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.27), sowie die Ausbildung von röhrenförmigen Strukturen und polygonalen Netzen im Matrigel-Assay (siehe 3.4.2.2; Abb. 3.30).

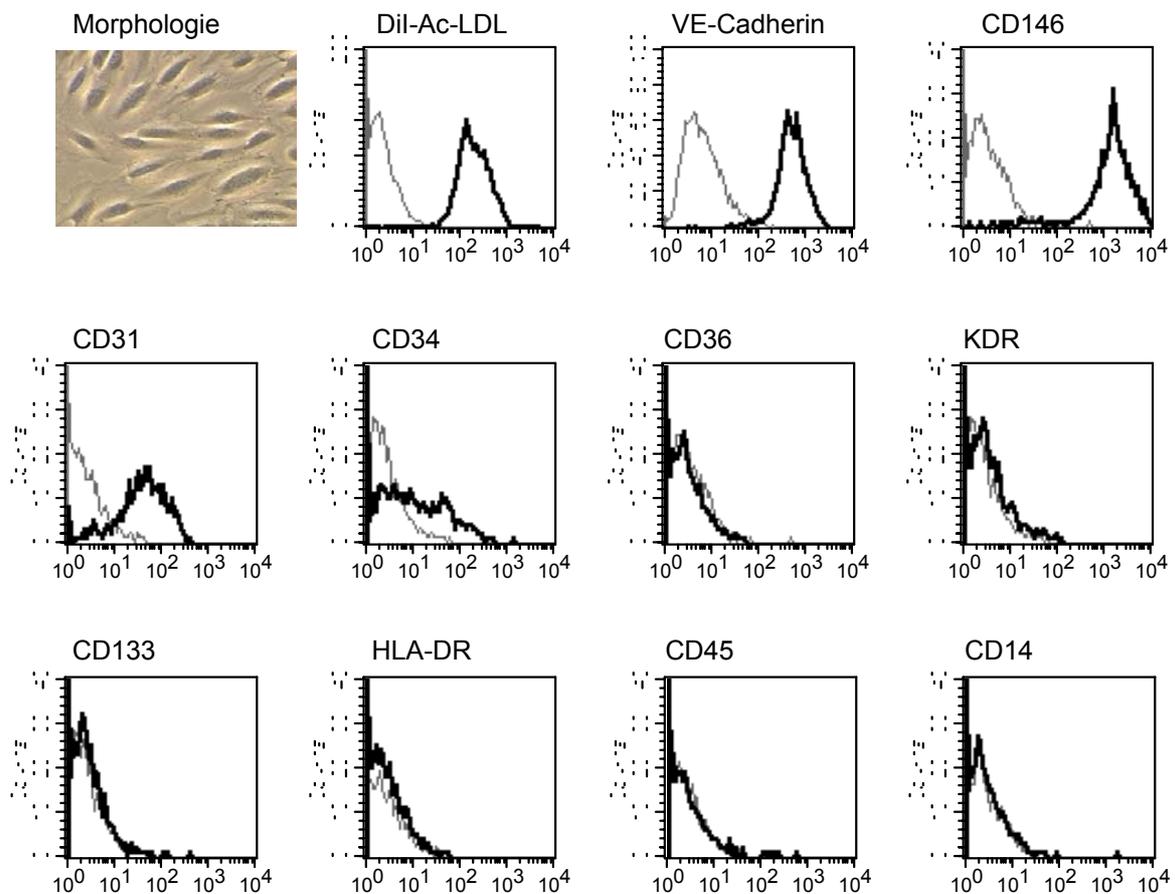
Zudem wurden die Zellen durch FACS-Analyse der Expression von Oberflächenantigenen charakterisiert, die auf hämatopoetischen und/oder Endothelzellen zu finden sind. Über 99% der Zellen waren positiv für die Endothelzellmarker VE-Cadherin (CD144), CD146 und CD31 und negativ für die hämatopoetischen Marker CD45, CD14, CD133 und HLA-DR (Abb. 3.27).



**Abb. 3.26. Differenzierung und Expansion von EPC aus CD34-positiven Nabelschnurblutzellen.**

In den Wachstumskurven zweier repräsentativer Experimente sind die kumulativen Zellzahlen im zeitlichen Verlauf der Kultur aufgetragen. Die Ausgangszellzahlen von etwa  $10^6$  an Tag 0 bezeichnen die eingesetzten CD34-positiven Zellen (Pools verschiedener Spender) nach MACS-Anreicherung an diesem Tag.

Die expandierten Zellpopulationen waren jedoch nicht absolut homogen, da nur 5% bis 45% der Zellen positiv für den Marker CD34 färbten, der sowohl auf Endothelzellen als auch auf HSC vorkommt. Zudem gab es eine kleine Population von maximal 5%, auf der der endothelspezifische VEGF-Rezeptor KDR/VEGF-R2 exprimiert wurde. Die Expression der erwähnten Marker blieb während der Expansionszeit unverändert.

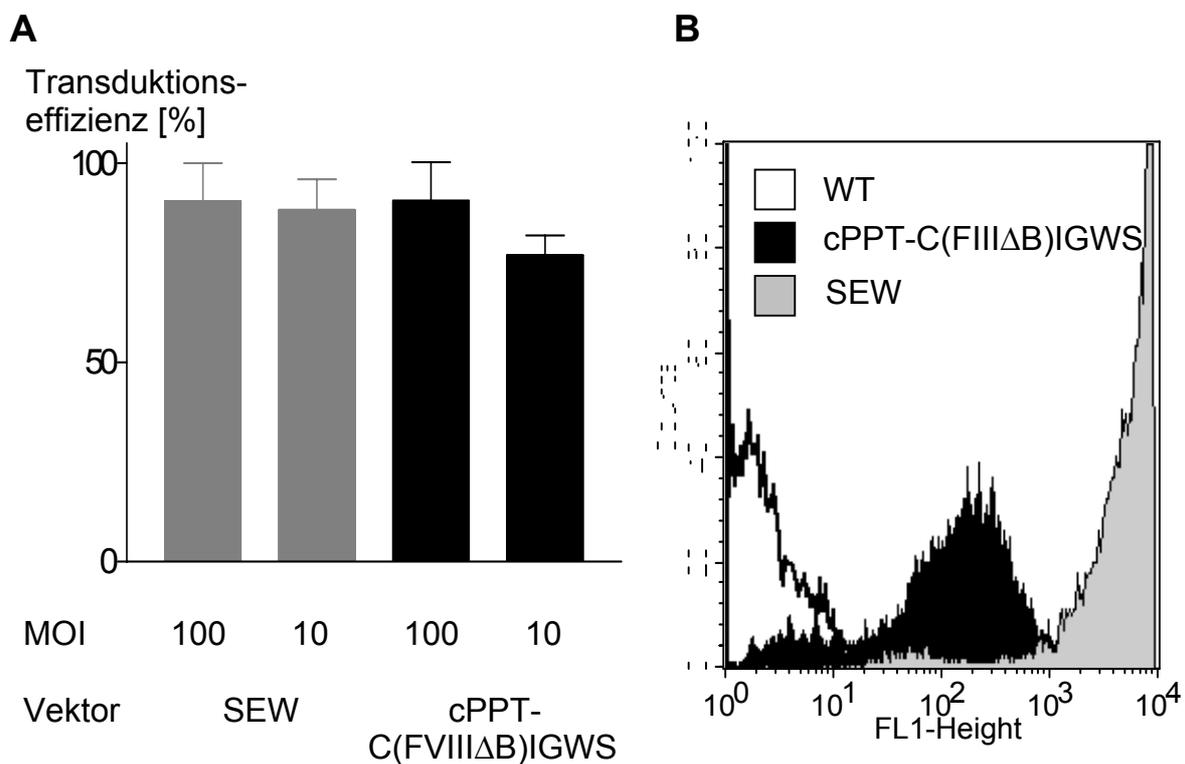


**Abb. 3.27. Morphologie und phänotypische Charakterisierung der EPC aus CD34-positiven Nabelschnurblutzellen.** EPC verschiedener Spender bzw. Spenderpools wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Expansion auf ihre Fähigkeit zur Aufnahme von Dil-Ac-LDL sowie auf ihre Expression bestimmter Zelloberflächenmarker getestet. Die Abbildung faßt die Daten der durchflußzytometrischen Analyse zusammen, wobei die Fluoreszenzintensitäten als Abszissen und die Zellzahlen als Ordinaten aufgetragen sind. Zellen, die mit Di-Ac-LDL bzw. mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert wurden, sind durch die dicken Linien dargestellt, während die Negativkontrollen (ungefärbte Zellen oder Isotypkontrollen) durch dünne Linien gegeben sind.

### 3.4.2.2 Lentivirale Transduktion und FVIII-Expression in Nabelschnurblut-EPC

#### EGFP-Expression nach lentiviraler Transduktion

In einer ersten Versuchsreihe wurden Endothelzellen von vier verschiedenen Spendern bzw. Spenderpools mit den lentiviralen Konstrukten SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert. Die Zellen befanden sich in der Expansionsphase zwischen Passage 3 und 8, und die Vektoren wurden mit den MOIs 10 und 100 eingesetzt. Die Transduktionseffizienz wurde bestimmt durch die durchflußzytometrische Quantifizierung der EGFP-positiven Zellen. Bei einer MOI von 10 wurden für die Vektoren SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS Transduktionseffizienzen von  $88,2 \pm 7,6\%$  (80,3%-95,6%) bzw.  $76,9\% \pm 5,0\%$  (73,1%-84,2%) erreicht (Abb. 3.28A).

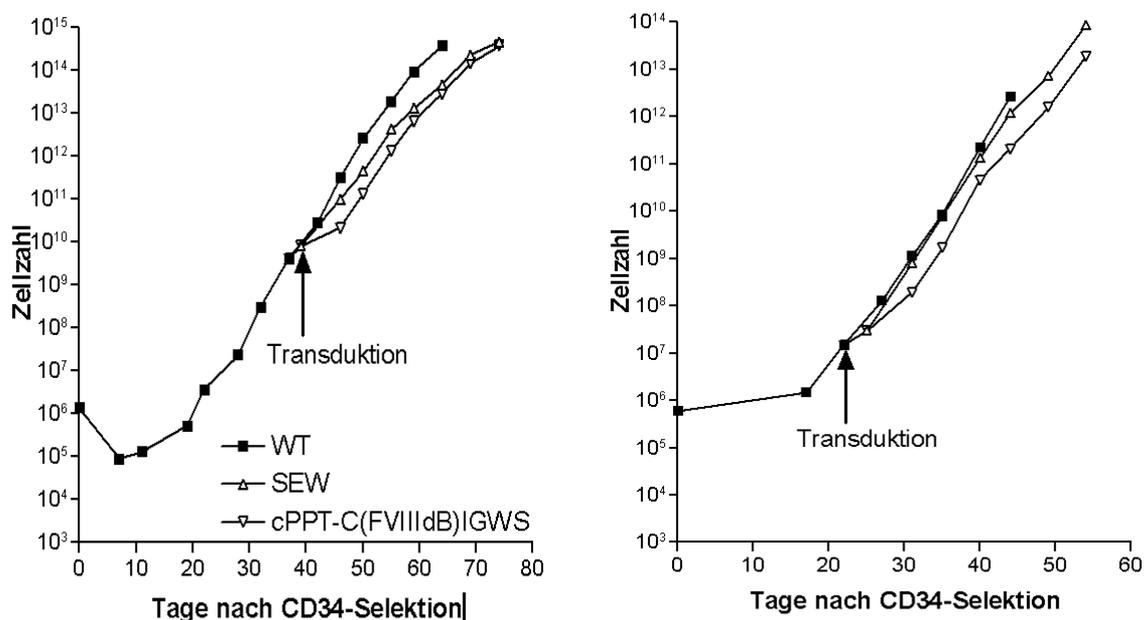


**Abb. 3.28. Lentivirale Transduktion von EPC aus CD34<sup>+</sup>-Nabelschnurblutzellen.** EPC (n=4) in den Passagen 3 bis 8 wurden mit den Vektoren SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS transduziert. (A) Für die Transduktionen wurden für beide Vektoren MOIs von 10 und 100 eingesetzt. Transduktionseffizienzen wurden durchflußzytometrisch zu mindestens zwei Zeitpunkten und nicht früher als acht Tage nach der Transduktion bestimmt. (B) Das Histogramm beschreibt die EGFP-Expression von Zellen eines Spenders, die mit den Vektoren SEW (graue Fläche) und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS (schwarze Fläche; MOI jeweils 10) transduziert wurden. Die Messung erfolgte 30 Tage nach der Transduktion mit untransduzierten Zellen (farblose Fläche) als Negativkontrolle.

Eine Erhöhung der MOI auf 100 führte nicht zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Transduktionseffizienzen ( $90,4\% \pm 9,7\%$  für SEW,  $90,6\% \pm 9,7\%$  für cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS;  $p > 0,05$  für beide Vektoren [t-test; paired, two-tailed]; Abb. 3.28A). Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen und auch die Stärke der EGFP-Expression blieben während des Kulturzeitraums relativ konstant. Abb. 3.28B zeigt die EGFP-Expression in transduzierten und nicht-transduzierten Zellen eines Spenders 30 Tage nach Transduktion mit einer MOI von 10.

### Keine wesentlichen Veränderungen des EPC-Phänotyps durch die lentivirale Transduktion

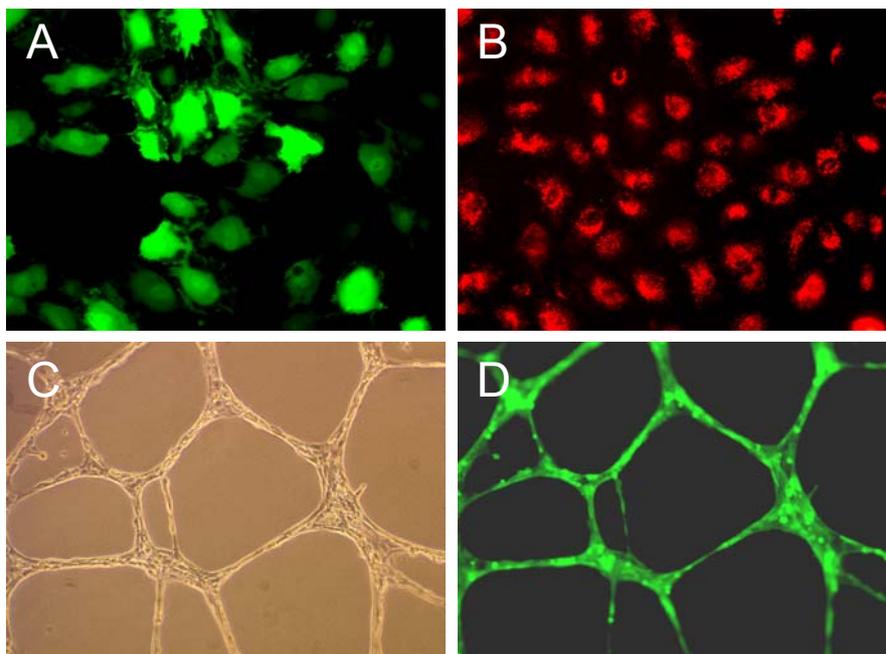
Bei der Expansion der transduzierten Zellen fiel auf, daß die Inkubation mit den lentiviralen Partikeln einen leichten toxischen Effekt auf die Zellen hatte. Insbesondere bei der höheren MOI von 100 kam es zu Zelltod während/nach der Transduktion und zu einem verzögerten Wachstum. Wie Abb. 3.29 an zwei repräsentativen Beispielen zeigt, war jedoch das Proliferationspotential der transduzierten Zellen gegenüber den nicht-transduzierten Zellen nahezu unbeeinträchtigt. Der Pfeil in der Abbildung markiert den Zeitpunkt, an dem ein Teil der Zellen mit den Vektoren SEW und cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS transduziert wurde (MOI 10), und im weiteren Zeitverlauf sind kumulative Wachstumskurven dargestellt.



**Abb. 3.29. Expansion von transduzierten EPC aus CD34<sup>+</sup>-Nabelschnurblutzellen.** Die Wachstumskurven zweier repräsentativer Experimente zeigt die kumulative Zellzahl von transduzierten und nicht-transduzierten Zellen eines Spenderpools im zeitlichen Verlauf der Kultur. An Tag 39 bzw. Tag 25 nach CD34-Selektion wurden jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen mit den Vektoren SEW und cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS transduziert (MOI 10) und ebenso wie die Wildtyp-Zellen bis zur Seneszenz der Kulturen expandiert.

Zusätzlich zum möglichen Effekt der lentiviralen Transduktion auf die Proliferationseigenschaften der Zellen wurde der Phänotyp der transduzierten und der nicht-transduzierten Zellen analysiert. Einige Wochen nach der Transduktion war das Expressionsmuster der Oberflächenantigene CD146, CD34, KDR, CD36 und CD133 unverändert (FACS-Daten hier nicht gezeigt). Ebenso unverändert war die Fähigkeit der Zellen, Dil-Ac-LDL aufzunehmen (Abb. 3.30A&B).

Außerdem wurde ein Matrigel-Assay mit den Zellen durchgeführt, indem die Zellen auf eine komplexe extrazelluläre Matrix ausgesät wurden. Sowohl die nicht-transduzierten Zellen als auch die transduzierten Zellen (Abb. 3.30C&D) formten kapillarartige Röhren und Netzstrukturen, wie sie für funktionale Endothelzellen charakteristisch sind, so daß sich zusammenfassend sagen läßt, daß in den durchgeführten *in vitro*-Versuchen keine negativen Auswirkungen der Transduktion auf die EPC zu beobachten waren.



**Abb. 3.30. Phänotyp der transduzierten Endothelzellen: Dil-Ac-LDL-Aufnahme und Matrigel-Assay.** (A&B) Fünf Wochen nach Transduktion mit dem Konstrukt SEW (MOI 100) wurden die Zellen für eine Stunde mit Dil-Ac-LDL inkubiert und nach einem Mediumwechsel mit einem Fluoreszenzmikroskop auf EGFP-Expression (A) und Aufnahme von Dil-Ac-LDL (B) untersucht. (C&D) Für den Matrigel-Assay wurden Endothelzellen mit Trypsin/EDTA von der Kulturoberfläche abgelöst und in EGM-2-Medium auf eine Matrigel-Matrix (siehe 2.2.7.5) ausgesät. Nach 8 bis 10 Stunden wurde licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch die Bildung polygonaler Netze dokumentiert (C: Phasenkontrast; D: EGFP-Expression).

### Charakterisierung der FVIII-Expression der transduzierten EPC

Die Transduktionsexperimente wurden durchgeführt, um das Potential der Nabelschnurblut-EPC zur FVIII-Sekretion zu beschreiben. Im Folgenden sind die Ergebnisse aus Versuchen mit Zellen von drei unabhängigen Spenderpools aufgeführt. Zellen wurden mit den lentiviralen Konstrukten SEW und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS mit MOIs von 10 wie oben beschrieben transduziert und bis zur Seneszenz kultiviert. Die Transduktionseffizienzen lagen im Mittel bei etwa 90%. Die FVIII-Sezernierung wurde quantifiziert, indem zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transduktion cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierte Zellen sowie SEW-transduzierte und nicht-transduzierte Zellen in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$ /ml in EGM-2 ausgesät und der Zellüberstand nach 48 Stunden abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren wurden.

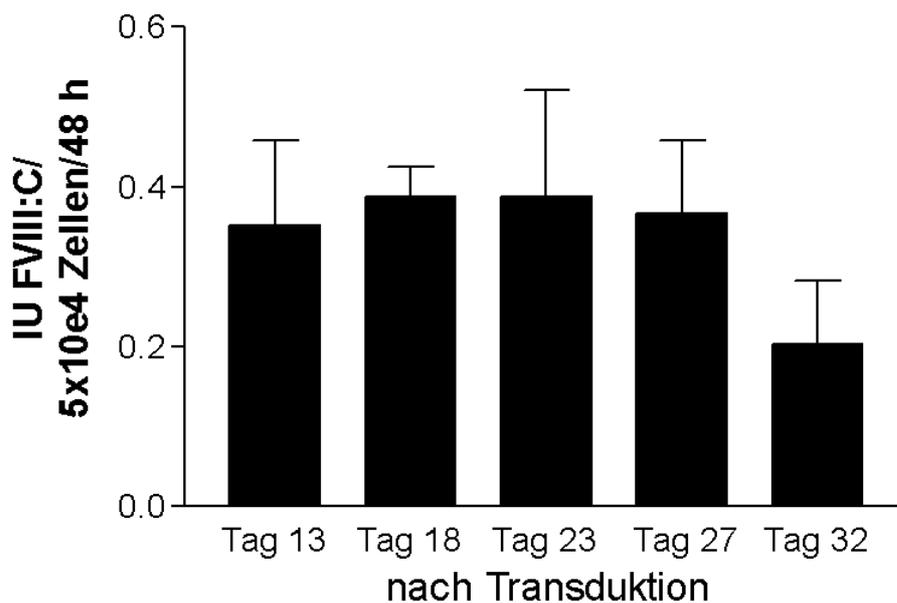
Für die Charakterisierung der FVIII-Produktion wurden die gesammelten Kulturüberstände im chromogenen Assay auf FVIII:C-Aktivität sowie im ELISA auf FVIII:Ag-Protein getestet. Die FVIII:C-Werte, die im chromogenen Assay gemessen wurden, blieben während der Kultur der Zellen relativ konstant (Abb. 3.31). Innerhalb der ersten vier Wochen nach Transduktion lag die Sezernierung von FVIII:C durch die cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierten Zellen bei 0,35-0,39 IU/ $5 \times 10^4$  Zellen/48h bei einer MOI von 10, was 7,0-7,8 IU/ $10^6$  Zellen/48h entsprach ( $n=3$ ). Die anschließende Abnahme der FVIII:C-Sekretion wurde begleitet von einer Reduktion der Proliferationsrate bis zur Seneszenz der Kulturen. Untransduzierte und SEW-transduzierte Zellen sezernierten kein FVIII:C ( $<0,01$  IU/ $5 \times 10^4$  Zellen/48h).

In einem weiteren Experiment mit Endothelzellen von vier Spenderpools bzw. Einzelspendern wurde geprüft, ob die FVIII:C-Sekretion durch eine Erhöhung der MOI von 10 auf 100 gesteigert werden kann. Etwa 30 Tage nach der Transduktion wurden die FVIII:C-Konzentrationen in den Überständen bestimmt, und es zeigte sich, daß Zellen, die mit einer MOI von 100 transduziert wurden, keine statistisch signifikant höheren Mengen an FVIII:C sezernieren konnten ( $n=4$ ;  $p>0,05$  [t-Test; paired, two-tailed]).

Ebenfalls gemessen wurden die FVIII:Ag-Spiegel in den Kulturüberständen, die in einem ELISA mit einem Antikörperpaar gegen die leichte Kette ermittelt wurden. Bei einer MOI von 10 wurde innerhalb der ersten vier Wochen nach Transduktion eine FVIII:Ag-Sezernierung von 0,45-0,66 IU/ $5 \times 10^4$  Zellen/48h gemessen ( $n=3$ ), die im Vergleich zu den FVIII:C-Daten erhöht war. Daraus resultierten Werte für das Verhältnis FVIII:C/FVIII:Ag von 0,54-0,83 ( $n=3$ ), die unter den Vergleichsdaten von hämatopoetischen Zelllinien (3.2.3; Tab. 3.3; Tonn et al., 2002) und HUVEC (3.4.1) lagen, die mit FVIII-kodierenden Vektoren mit derselben Transgen-Expressions-cassette transduziert wurden.

Um angesichts dieses unerwarteten Ergebnisses zu überprüfen, ob Endothelzellen FVIII-Protein sezernierten, das korrekt prozessiert war, wurde BDD FVIII mittels Ultrafiltration aus Zellkulturüberständen angereichert. Da FCS-haltige Kulturüberstände nicht effektiv konzentriert werden konnten, wurden die Endothelzellen für 15 bis 24 Stunden in EGM-2 ohne FCS kultiviert. Konditioniertes Medium wurde dann bis zu 400fach eingengt und mit ELISA, chromogenem Assay und Western Blot untersucht.

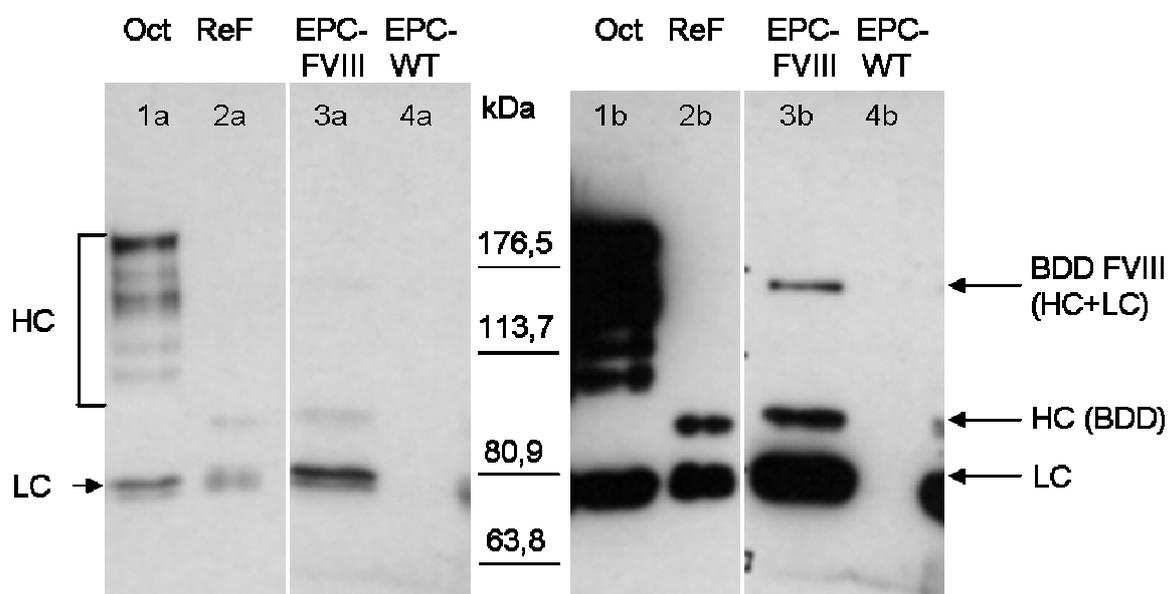
Wie in Abb. 3.32 gezeigt, wurden konzentrierte Überstände von cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS-transduzierten und nicht-transduzierten Endothelzellen für SDS-PAGE- und Western Blot-Experimente eingesetzt. Neben einem Proteinmarker als Größenstandard wurden mit Octanate® (FVIII-Konzentrat aus Humanplasma) und ReFacto® (rekombinantes BDD FVIII-Protein) zwei kommerziell erhältliche und therapeutisch eingesetzte FVIII-Präparate als Positivkontrollen mitgeführt. Octanate® besteht aus einer leichten Kette von etwa 80 kDa (Dublett von 83 und 79 kDa) und aus schweren Ketten verschiedener Größen (90-200 kDa)



**Abb. 3.31. Quantifizierung von FVIII:C im Kulturüberstand von EPC.** EPC von drei verschiedenen Spenderpools wurden mit dem BDD FVIII-kodierenden Konstrukt cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS transduziert (MOI 10). Um die Sekretion von FVIII:C zu quantifizieren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion  $5 \times 10^4$  Zellen in 1 ml EGM-2 für 48h kultiviert und dann die Überstände für weitere Analysen abgenommen. In jedem Assay wurden Überstände von SEW-transduzierten und nicht-transduzierten Kontrollzellen mitgeführt, in denen kein FVIII:C detektiert werden konnte (Werte unterhalb des Detektionslimits von  $0,01 \text{ IU}/5 \times 10^4 \text{ Zellen}/48\text{h}$ ). Die dargestellten Werte ( $n=3$ ) sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD).

aufgrund der komplexen FVIII-Prozessierung *in vivo*, die mehrere proteolytische Spaltungen innerhalb der B-Domäne umfaßt (vgl. Abb. 1.4). ReFacto® enthält eine leichte Kette von 80 kDa (Dublett von 83 und 79 kDa) und eine schwere Kette von 90 kDa. Die Deletion der B-Domäne in ReFacto® ist bis auf wenige Aminosäuren identisch mit der Deletion im hier verwendeten Transgenvektor cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS.

Für die FVIII-Detektion wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der für die leichte Kette sowohl in den beiden FVIII-Präparaten als auch im EPC-Überstand Signale bei etwa 80 kDa liefern sollte. Zudem wurden Signale bei 90 kDa für die schwere Kette für ReFacto® und für den EPC-Überstand erwartet. Abb. 3.32 illustriert, daß dies in der Tat der Fall war. Zudem ergab der Western Blot für das Endothelzellkonzentrat eine weitere Bande bei etwa 170 kDa,



**Abb. 3.32. FVIII-Detektion im Überstand von EPC mit Western Blot.** Serumfreie Kulturüberstände von untransduzierten und cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierten EPC wurden durch Ultrafiltration 200-400fach konzentriert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit einem polyklonalen Antikörper gegen humanen FVIII inkubiert. In den Spuren 1a/1b und 2a/2b sind als Positivkontrollen zwei klinisch eingesetzte FVIII-Präparate aufgetragen. Die Spuren 3a/3b und 4a/4b enthalten konzentrierte Überstände von Endothelzellen aus Nabelschnur-CD34<sup>+</sup>-Zellen. Um sowohl starke als auch schwache Banden hinreichend gut detektieren und unterscheiden zu können, wurden Autoradiographiefilme für verschiedenen Zeiträume auf die Membran gelegt (links 1a-4a: 1 Min., rechts 1b-4b: 20 Min.).

Spur 1a/b: Oct, Octanate; Spur 2a/b: Ref, ReFacto; Spur 3a/b: EPC-FVIII, konzentrierter Überstand von cPPT-C(FVIII $\Delta$ B)IGWS-transduzierten EPC; Spur 4a/b: EPC-WT, konzentrierter Überstand von nicht-transduzierten EPC; HC: schwere Kette, LC: leichte Kette; HC+LC: BDD FVIII ohne intrazelluläre proteolytische Spaltung.

was darauf hindeutete, daß ein Teil des FVIII-Proteins ohne intrazelluläre Spaltung in schwere und leichte Kette ausgeschieden wurde. Im konzentrierten Überstand von untransduzierten Zellen konnte kein FVIII nachgewiesen werden.

Vor der Verwendung der Konzentrate im Western Blot wurden die Proben im ELISA auf FVIII:Ag-Konzentration untersucht. Die Bandenintensität im Western Blot und die gemessenen FVIII:Ag-Spiegel stimmten dabei recht gut überein. Im chromogenen Assay konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß die spezifische FVIII-Aktivität in den Konzentraten vergleichbar war mit der in unkonzentriertem Überstand. Für das in Abb. 3.32 verwendete Konzentrat wurde im ELISA eine FVIII:Ag-Konzentration von 38,5 IU/ml gemessen, während im chromogenen Assay eine FVIII:C-Aktivität von 60,4 IU/ml detektiert wurde. Daraus ergab sich ein Verhältnis FVIII:C/FVIII:Ag von 0,64.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß sich Endothelprogenitorzellen aus Nabelschnurblut mit hoher Effizienz mit lentiviralen Vektoren transduzieren ließen. Die Zellen sezernierten etwa 7,0-7,8 IU FVIII:C je  $10^6$  Zellen in 48 Stunden, und das Protein konnte nicht nur mit dem chromogenen Assay, sondern auch im ELISA und im Western Blot nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes für die Hämophilie A

Die Hämophilie A stellt aus einer Reihe von wichtigen Gründen eine attraktive Krankheit für die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze dar: (i) Sie ist eine monogenetische Erkrankung, die sich im Fehlen oder in einer Verminderung der FVIII-Aktivität im Plasma manifestiert. (ii) Das FVIII-Gen wurde 1984 von zwei verschiedenen Gruppen kloniert (Toole et al., 1984; Gitschier et al., 1984), so daß nicht nur die FVIII-cDNA für Experimente zur rekombinanten Expression zur Verfügung steht, sondern auch die kausale Mutation in den Patienten genau charakterisiert werden kann. (iii) Mit einer Inzidenz von 100 bis 200 Fällen je 1 Million männliche Neugeborene gehört sie zu den häufigsten Erbkrankheiten (Nathwani & Tuddenham, 1992).

Patienten werden in einer Substitutionstherapie mit FVIII-Präparaten aus Humanplasma oder aus rekombinanter Herstellung behandelt, die jedoch aufgrund der hohen Kosten nur von den Gesundheitssystemen der Industrieländer finanziert werden können, während für 75% der Hämophilie-Patienten weltweit kein Zugang zu einer adäquaten Therapie besteht (Srivastava, 1998; Antunes, 2002). Nachdem bis in die 1980er Jahre die FVIII-Präparate aus Plasma mit einem hohen Risiko für die Übertragung lebensbedrohlicher Virusinfektionen behaftet waren, konnte diese Gefahr durch die Einführung von Virusinaktivierungsverfahren und von rekombinanten Produkten weitgehend gebannt werden. Dennoch bleibt die Behandlung von Patienten mit schwerer Hämophilie insbesondere bei einer Hemmkörperbildung, die gegen das substituierte FVIII-Protein gerichtet ist, schwierig. Die Notwendigkeit regelmäßiger intravenöser Infusionen ist mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden. Zudem können auch bei optimaler Behandlung wiederkehrende Blutungen in Gelenke mit schwerwiegenden Entzündungen und Gelenkdeformationen nicht komplett vermieden werden.

Aus diesen Gründen suchen viele Gruppen weltweit nach einem geeigneten gentherapeutischen Protokoll. Die Vielzahl der Ansätze läßt sich in *in vivo*- und *ex vivo*-Ansätze unterteilen, wobei bei *in vivo*-Ansätzen in der Regel ein viraler Vektor intravenös appliziert wird, während *ex vivo*-Ansätze durch den Gentransfer in zumeist autologe Zielzellen außerhalb des Patienten charakterisiert sind. Trotz des Einsatzes verschiedener Vektoren und Zielzellen (siehe 1.3.4 und 1.3.5) blieben die bisher durchgeführten präklinischen und klinischen Studien wenig erfolgreich, da niedrige Effizienzen von Gentransfer und/oder FVIII-Sekretion in den Zielzellen, Inhibitorbildung gegen das rekombinante FVIII-Protein und Vektortoxizität insbesondere bei systemischer Applikation

meist nur zu transienten therapeutisch wirksamen FVIII-Plasmaspiegeln führten. In einigen Studien mit Hämophilie A-Tiermodellen wurden sogar physiologische und supraphysiologische FVIII-Plasmaspiegel *in vivo* über mehrere Monate erzielt (Tab. 1.3). Diese hohen Werte konnten aufgrund einer Inhibitorbildung jedoch nur in einem Teil der Versuchstiere erreicht werden (VandenDriessche et al., 1999), oder sie nahmen während der Dauer des Experimentes ab (Reddy et al., 2002).

In dieser Studie sollten daher Zielzellen identifiziert werden, mit denen die wichtigsten der oben genannten Probleme vermieden werden können. Ein Gentransfer *ex vivo* besitzt grundsätzlich den Vorteil, daß Komplikationen durch eine Toxizität des Vektors nicht entstehen und daß immunogene Bestandteile des Vektors keine Adjuvanswirkung für eine potentielle Inhibitorbildung gegen das therapeutische Protein besitzen. Die Zielzellen sollten leicht und ohne invasive Maßnahmen verfügbar sein und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* expandierbar sein. Somit sollte ein *ex vivo*-Gentransfer mit autologen Zellen möglich sein, die nach Transduktion mit einem viralen Vektor dem Patienten retransplantiert werden könnten. Da FVIII im Blut benötigt wird und um erhöhten lokalen FVIII-Konzentrationen vorzubeugen, sollten die Zielzellen einen direkten Zugang zur Zirkulation haben. Als mögliche Zielzellen kommen hämatopoetische Zellen und Endothelprogenitorzellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut in Frage, da sie die oben genannten Vorteile in sich vereinen. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen, bei denen allogene Stammzellen im Menschen oder retroviral transduzierte Stammzellen im Tiermodell transplantiert wurden, daß die Expression von Fremd-Proteinen durch hämatopoetische Zellen antigenspezifisch Toleranz induzieren kann (siehe 1.4). Diese Eigenschaft hämatopoetischer Zellen würde neben der FVIII-Substitution auch die Vermeidung einer Inhibitorbildung gegen FVIII mit sich bringen

Da die Transduktion von HSC *ex vivo* mit lentiviralen Vektoren so weit optimiert werden konnte, daß mit ihnen hohe Transduktionseffizienzen unter Erhaltung der Stammeigenschaften erreicht wurden, wurden in dieser Arbeit geeignete lentivirale Vektoren für die rekombinante FVIII-Expression in hämatopoetischen Zellen entwickelt. Die FVIII-Vektoren wurden durch Transduktionsexperimente mit hämatopoetischen Zelllinien evaluiert (4.2) und dann für die Transduktion von HSC und sich aus diesen ableitende differenzierte Blutzellen (4.3) eingesetzt. Über die effiziente Transduktion von Endothelprogenitorzellen lagen zu Beginn der Studie keine Daten vor, so daß ein weiteres Ziel der Arbeit darin bestand, geeignete Transduktionsbedingungen für EPC, die aus CD34-positiven Zellen differenziert wurden, zu etablieren und diese Zellen auf ihr Potential zur rekombinanten FVIII-Expression zu testen (4.4).

## 4.2 FVIII-Expression in hämatopoetischen Zelllinien

### 4.2.1 Klonierung eines lentiviralen FVIII-Vektors

Für den Transfer der FVIII-cDNA in hämatopoetische Zellen wurde ein lentiviraler Vektor verwendet, da dieser Vektortyp sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen transduzieren kann. Die lentiviralen Partikel wurden durch die Verwendung des VSV-G-Proteins als Hüllprotein stabilisiert, so daß durch Ultrazentrifugation sehr hohe Virustiter erreicht werden konnten, die hohe Transduktionseffizienzen ermöglichten. Bei der Klonierung des Vektors wurde eine FVIII-cDNA mit einer Deletion hergestellt, die den größten Teil der B-Domäne umfaßt. Die B-Domäne ist für die Gerinnungsaktivität des FVIII-Proteins verzichtbar, und ihre Deletion bringt drei wichtige Vorteile mit sich:

(i) Durch die Deletion konnte die Länge der FVIII-cDNA von 7,2 kb auf 4,6 kb reduziert werden. In einer systematischen Analyse der Korrelation zwischen Proviruslänge und dem Titer lentiviraler Vektorpräparationen wurde gezeigt, daß der Vektortiter bei steigender Länge des Provirus immer weiter abnahm (Kumar et al., 2001). Infektiöse Partikel mit Genomen von bis zu 18 kb, die somit deutlich länger als das HIV-1-Wildtyp-Genom waren (9,7 kb), konnten hergestellt werden. Ihre Vektortiter waren jedoch im Vergleich zu den kürzeren Konstrukten unter 10 kb so stark erniedrigt, daß auch effiziente Konzentrationsverfahren wie die Ultrazentrifugation nicht zu therapeutisch relevanten Titern führen würden.

(ii) Die Deletion der B-Domäne erlaubte die Verwendung eines bicistronischen Konstruktes, das neben der B-Domänen-deletierten (BDD) FVIII-cDNA auch das EGFP als Markergen enthielt. Von diesem Konstrukt entsteht eine bicistronische mRNA mit BDD FVIII als erstem Cistron, das in Abhängigkeit der sogenannten 5'-Cap-Struktur translatiert wird, und EGFP als zweitem Cistron hinter einem IRES-Element, welches 5'-Cap-unabhängig translatiert wird (Gingras et al., 1999). Die EGFP-Expression kann nicht nur zur Bestimmung der Transduktionseffizienz verwendet werden, sondern auch für die durchflußzytometrische Anreicherung transduzierter Zellen, die die Charakterisierung der FVIII-Expression in einer Mischpopulation erleichtert.

(iii) Die dritte Überlegung, die für den Gebrauch einer BDD FVIII-cDNA sprach, beruhte auf Beobachtungen in anderen rekombinanten Expressionssystemen. Studien der Gruppe von R. J. Kaufman zeigten, daß BDD FVIII auf RNA-Ebene besser exprimiert wurde als Wildtyp-FVIII, so daß auch mehr Protein entstand. Zwar erfolgte die Sekretion des verkürzten Proteins ineffizienter (Pipe et al., 1998), aber in den bisher beschriebenen rekombinanten Expressionssystemen konnte die höhere Syntheserate den leichten Exportdefekt mehr als kompensieren, so daß mehr BDD FVIII als Wildtyp-FVIII im Kulturüberstand gemessen werden konnte (Pittman et al., 1994; Pipe et al., 1998).

In dieser Arbeit wurden in Anlehnung an die Studie von Kaufmans Gruppe (Pittman et al., 1993) die Aminosäuren 760-1639 deletiert. Sowohl die BDD FVIII-cDNA als auch die für das Wildtyp-FVIII-Protein kodierende cDNA wurden in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert und in 293T-Zellen durch transiente Transfektion exprimiert. Erwartungsgemäß ließ sich mit beiden Konstrukten gerinnungsaktives FVIII-Protein im Kulturüberstand erzielen, welches in einem Mangelplasma-Assay quantifiziert wurde. Im Einklang mit anderen Arbeiten (Dorner et al., 1987; Pittman et al., 1993) führte die Transfektion von BDD FVIII zu einer etwa fünfzehnfach höheren Expression (58% FVIII-Aktivität im Kulturüberstand) als die Transfektion von Wildtyp-FVIII (4%). Die Deletion 760-1639 enthält keine der drei Thrombin-Spaltstellen des FVIII-Proteins (hinter den Argininresten 372, 740 und 1689; siehe 1.2.2), die für die Heterotrimer-Struktur und somit für die volle Aktivierung des FVIII-Proteins notwendig sind, damit sich das gerinnungsaktive FVIII-Protein, das vom BDD FVIII-Konstrukt kodiert wird, nicht von Wildtyp-FVIII unterscheidet. Die hier verwendete Deletion ist bis auf wenige Aminosäuren mit der Deletion des bisher einzigen kommerziell erhältlichen rekombinanten BDD FVIII identisch (ReFacto<sup>®</sup>, Deletion der AS 744-1637; Berntorp, 1997).

#### **4.2.2 Lentiviraler FVIII-Gentransfer in hämatopoetische Zelllinien**

Für den Gentransfer in hämatopoetische Zellen wurde die BDD FVIII-cDNA in einen lentiviralen Vektor kloniert, so daß das bicistronische Konstrukt C(FVIII $\Delta$ B)IGWS entstand, das für BDD FVIII und EGFP kodiert. Mit diesem Vektor wurde die Effizienz von Gentransfer und FVIII-Expression in sechs verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien getestet, die unterschiedliche Subtypen von Leukozyten repräsentieren. Aus heterogenen Mischpopulationen von transduzierten und nicht-transduzierten Zellen wurden für eine genauere Analyse der FVIII-Expression die transduzierten Zellen mit der stärksten EGFP-Expression durchflußzytometrisch angereichert. In den sortierten Zellpopulationen betrug der Anteil der EGFP-positiven Zellen 72% bis 93%.

Die Analyse der FVIII-Expression ergab, daß nur vier der sechs untersuchten Zelllinien detektierbare Mengen an FVIII-Protein sezernierten. In den Überständen von jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen/ml konnten nach 48 Stunden für die Zelllinien K562 und TF-1 in einem chromogenen Assay 76,4 ng/ml bzw. 41,6 ng/ml (380 mU/ml bzw. 210 mU/ml FVIII:C) gemessen werden. Die FVIII-Konzentrationen der Zelllinien Raji und Jurkat lagen mit 6,7 ng/ml bzw. 1,8 ng/ml (34 mU/ml bzw. 9 mU/ml FVIII:C) deutlich niedriger, während im Überstand der Linien PLB-985 und KG-1 keine FVIII-Aktivität detektiert werden konnte. Die Messungen der FVIII-Aktivität wurden durch die Bestimmung der FVIII:Ag-Konzentrationen in einem ELISA bestätigt.

Die Quantifizierung der mittleren Anzahl der BDD FVIII-Kopien in den transduzierten Zelllinien durch PCR ergab, daß die Unterschiede in der FVIII-Sekretion nicht auf Unterschiede der Gentransfereffizienz oder der durchflußzytometrischen Anreicherung zurückgeführt werden konnten. Die hoch-exprimierenden Zelllinien K562 und TF-1 enthielten im Durchschnitt 10 bzw. 16 BDD FVIII-Kopien je Zelle, die niedrig-exprimierenden Linien Raji und Jurkat 4 bzw. 19 Kopien, und auch in den Linien PLB-985 und KG-1, die kein FVIII-Protein sezernierten, wurden 20 bzw. 5 Kopien gefunden. Um zu prüfen, ob die BDD FVIII-Transkription in den Linien PLB-985 und KG-1 inhibiert sein könnte, wurde eine RT-PCR mit BDD FVIII-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt, die jedoch für alle transduzierten Zellpopulationen die Anwesenheit von FVIII-mRNA anzeigte.

Dieser Befund deutet darauf hin, daß sich die untersuchten hämatopoetischen Zelllinien in ihrer Fähigkeit zur Translation oder Sekretion des FVIII-Proteins unterscheiden. Beim Vergleich der Leukozytentypen, die die sechs Zelllinien repräsentieren, fällt auf, daß sie sich in drei Gruppen unterteilen lassen: Die Zelllinien K562 und TF-1, die hohe Mengen an FVIII-Protein sezernieren können, besitzen ähnliche Differenzierungspotentiale und können sowohl in die Richtung von Megakaryozyten als auch von erythroiden Zellen differenziert werden (Andersson et al., 1979; Gewirtz et al., 1982; Kitamura et al., 1989; Murate et al., 1993). Die niedrig-exprimierenden Linien Raji und Jurkat sind lymphozytäre Zellen (aus Patienten mit Burkitt-Lymphom bzw. akuter T-Zell-Leukämie; Pulvertaft, 1964; Schneider et al., 1977), während die Linien PLB-985 und KG-1, die kein FVIII-Protein sezernieren, myeloiden Charakter besitzen (Tucker et al., 1987; Koeffler & Golde, 1978). Möglicherweise existieren zwischen den verschiedenen Leukozytenlinien Unterschiede in der Expression von Genen, die für Proteine des Translations- oder Sekretionsapparats kodieren. Diese Unterschiede könnten sowohl die Effizienz der FVIII-Translation als auch die komplexe Prozessierung des Proteins (siehe auch 4.3.2) beeinflussen.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Megakaryozyten neben Endothelzellen Ort der physiologischen Expression von von Willebrand-Faktor (vWF) sind. Durch die Bindung an vWF im Plasma wird das FVIII-Protein stabilisiert (Weiss et al., 1977; Over et al., 1978; Wise et al., 1991). In CHO-Zellen führte die Koexpression von vWF und FVIII zu einer Steigerung der FVIII-Sekretion, obwohl kein gemeinsamer Transportweg der beiden Proteine gefunden werden konnten (Kaufman et al., 1989). Im selben Expressionssystem konnte später gezeigt werden, daß FVIII intrazellulär in Aggregaten akkumulierte und daß ein Teil des intrazellulären vWF-Pools transient in diesen Aggregaten zu finden war (Tagliavacca et al., 2000). Auch wenn die Exportwege und -bedingungen für diese beiden Proteine partiell verschieden zu sein scheinen, so ist es dennoch möglich, daß vWF nicht nur durch Destabilisierung der FVIII-Aggregate zu einer effizienteren Ausschleusung des FVIII-Proteins aus den Zellen führt (Tagliavacca et al., 2000), sondern daß Zellen, die vWF sezernieren

können, auch genau die Proteine innerhalb des Sekretionsweges im ER und im Golgi-Apparat exprimieren, die für die FVIII-Expression benötigt werden.

Allerdings bleibt bei der Frage nach dem Grund für die differentielle FVIII-Expression zu beachten, daß die untersuchten Zelllinien aus Leukämiepatienten etabliert wurden und keine primären Leukozyten aus gesunden Spendern darstellen. In diesen zum Teil seit Jahrzehnten in der Zellkultur etablierten Krebszelllinien haben sich oftmals chromosomale Aberrationen und Mutationen akkumuliert, die die Gen- und Proteinexpression beträchtlich deregulieren und die Fähigkeiten zur Proteinsekretion dementsprechend verändern.

### 4.2.3 Vergleich der Daten mit anderen FVIII-Expressionssystemen

Die Möglichkeit der rekombinanten Expression von FVIII in humanen hämatopoetischen Zelllinien ist zuvor bereits von der Gruppe von M. K. L. Chuah und T. VandenDriessche untersucht worden. Die lymphozytären Zelllinien Raji und SupT1 (T-Zell-Lymphom) wurden mit einem bicistronischen retroviralen Vektor transduziert, der neben der BDD FVIII-cDNA noch ein IRES-Element und ein Neomycin-Resistenzgen ( $neo^R$ ) enthielt. Anstelle der in der vorliegenden Studie durchgeführten durchflußzytometrischen Anreicherung mittels Expression des Markergens EGFP wurden von Chuah et al. die transduzierten Zellen durch die Kultur in Gegenwart von G418 auf  $neo^R$ -Expression selektioniert (Chuah et al., 1995). Im Überstand beider Zelllinien konnte keine FVIII-Aktivität gemessen werden. Ein möglicher Grund für den Unterschiede zur vorliegenden Arbeit, in der FVIII-Sekretion in Raji-Zellen und Jurkat-Zellen detektiert wurde, kann in der Effizienz der Anreicherung der transduzierten Zellen liegen, die von Chuah et al. nicht durch die Bestimmung der BDD FVIII-Kopien im Genom der transduzierten Zellen überprüft wurde. Zudem erfolgte hier die FVIII-Transkription in Abhängigkeit eines internen konstitutiven CMV-Promotors in einem lentiviralen Vektor und nicht wie bei Chuah et al. von der retroviralen 5'-LTR (aus dem murinen Moloney-Leukämievirus), so daß Unterschiede in bezug auf die Effizienz der Transkription nicht ausgeschlossen werden können.

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, daß hämatopoetische Zellen durchaus in der Lage sind FVIII zu sezernieren und somit attraktive Zielzellen für die rekombinante FVIII-Expression im Kontext eines Gentherapieprotokolls darstellen könnten (Tonn et al., 2002). Die FVIII-Expression in den hämatopoetischen Linien K562 und TF-1 liegt zwar etwa zehn- bis zwanzigfach unter den Höchstwerten, die mit anderen Zelltypen erzielt werden können (Tab. 4.1), aber die Tatsache, daß lymphoide Zelllinien nach Transduktion mit dem verwendeten lentiviralen Vektor gerinnungsaktives FVIII-Protein sezernierten, was in früheren

Experimenten mit einem retroviralen Vektor nicht erreicht werden konnte (Chuah et al., 1995), legt die Eignung des Vektors für weitere Versuche mit primären hämatopoetischen Zellen nahe.

Zellen	FVIIIcDNA	Vektor	Zellzahl/ Meßzeitraum	[FVIII] in mU	FVIII-Assay	Referenz
K562	hBDDF8	Lentivirus	5x10 <sup>5</sup> /48h	380	FVIII:C	Diese Arbeit/ Tonn et al., 2002
TF-1	hBDDF8	Lentivirus	5x10 <sup>5</sup> /48h	210	FVIII:C	Diese Arbeit/ Tonn et al., 2002
Raji	hBDDF8	Lentivirus	5x10 <sup>5</sup> /48h	34	FVIII:C	Diese Arbeit/ Tonn et al., 2002
Jurkat	hBDDF8	Lentivirus	5x10 <sup>5</sup> /48h	9	FVIII:C	Diese Arbeit/ Tonn et al., 2002
293T	hBDDF8	Lentivirus	10 <sup>6</sup> /24h	1650	FVIII:C (1S)	Diese Arbeit
Endothel- progenitorzellen	hBDDF8	Lentivirus	5x10 <sup>4</sup> /48h	350-390	FVIII:C	Diese Arbeit
HUVEC	hBDDF8	Lentivirus	2x10 <sup>5</sup> /48h	1500	FVIII:Ag	Diese Arbeit
Primäre hum. Hepatozyten	-	-	10 <sup>6</sup> /24h	20-80	FVIII:Ag	Ingerslev et al., 1988
HUVEC	hBDDF8	Retrovirus	10 <sup>6</sup> /24h	165	FVIII:C	Chuah et al., 1995
Raji	hBDDF8	Retrovirus	10 <sup>6</sup> /24h	<1	FVIII:C	Chuah et al., 1995
SupT1	hBDDF8	Retrovirus	10 <sup>6</sup> /24h	<1	FVIII:C	Chuah et al., 1995
Primäre hum. Myoblasten	hBDDF8	Retrovirus	10 <sup>6</sup> /24h	1600-2000	FVIII:Ag	Dwarki et al., 1995
HepG2	hWTF8	Adenovirus	10 <sup>6</sup> /24h	1060	FVIII:C	Connelly et al., 1999
HepG2	hBDDF8	Adenovirus	10 <sup>6</sup> /24h	5070	FVIII:C	Connelly et al., 1999
Primäre hum. Hepatozyten	hWTF8	Adenovirus	10 <sup>6</sup> /60h	800	FVIII:C	Andrews et al., 1999
Primäre hum. Hepatozyten	hBDDF8	Adenovirus	10 <sup>6</sup> /60h	6300	FVIII:C	Andrews et al., 1999
Primäre hum. KM-Stromazellen	hBDDF8	Retrovirus	10 <sup>6</sup> /24h	700-2500	FVIII:C	Chuah et al., 2000
Primäre hum. Hautfibroblasten	hBDDF8	Plasmid-DNA	10 <sup>6</sup> /24h	800-6700	FVIII:Ag	Roth et al., 2001

**Tab. 4.1. FVIII-Expression in verschiedenen Systemen *in vitro*.** Abkürzungen: FVIII:Ag, ELISA; FVIII:C, chromogener Assay; FVIII:C (1S), Einstufentest (Mangelplasma-Assay); hBDDF8, humaner B-Domänen-deletierter FVIII; HepG2, humane Hepatomzelllinie; HUVEC, humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene; hWTF8, humaner Wildtyp-FVIII; SupT1, humane T-Lymphom-Zelllinie.

### **4.3 FVIII-Expression in primären hämatopoetischen Zellen**

#### **4.3.1 Fehlende Sekretion von FVIII in primären hämatopoetischen Zellen**

Nach der Evaluation des lentiviralen Vektors C(FVIII $\Delta$ B)IGWS wurde dieser aufgrund neuer Erkenntnisse bezüglich der Entwicklung lentiviraler Transfervektoren durch die Insertion eines cPPT/CTS-Elements 5' der FVIII/EGFP-Expressions-cassette optimiert (vgl. 3.1.3) und für die Transduktion primärer hämatopoetischer Zellen verwendet. Die Transduktion humaner CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen (HSC) sowie muriner Knochenmarkzellen (KMZ) führte zwar zu einer mittleren Anzahl von etwa zwei bis vier Kopien BDD FVIII-cDNA in den transduzierten Zellen und auch zur Expression von BDD FVIII-mRNA, nicht jedoch zu meßbaren FVIII:Ag-Konzentrationen im Kulturüberstand. Weder die Differenzierung in verschiedene lymphoide und myeloide Zelltypen aus den CD34-positiven Zellen durch Kultur mit IL-3, IL-6, SCF und Flt-3L noch die Differenzierung in Granulozyten mit G-CSF, SCF und Hydrocortison resultierten in einem detektierbaren Anstieg der FVIII-Sezernierung. Auch die Transduktion reifer humaner Makrophagen blieb bezüglich FVIII-Sekretion ohne Erfolg.

Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen bereits publizierter Studien. Hoeben et al. transduzierten Maus-KMZ mit einem retroviralen Vektor, der neben einer BDD FVIII-cDNA auch ein neo<sup>R</sup>-Gen enthält. Transduzierte Zellen wurden nach G418-Selektion in letal bestrahlte Mäuse injiziert, und nach 12 Tagen konnten in der Milz zwar Vektorsequenzen und BDD FVIII-mRNA detektiert werden, aber kein FVIII-Protein im Plasma (Hoeben et al., 1992). In einem ähnlichen experimentellen Ansatz transplantierten Evans & Morgan BDD FVIII/neo<sup>R</sup>-transduzierte Maus-KMZ in subletal bestrahlte Mäuse, in deren Plasma weder FVIII:C noch FVIII:Ag gemessen werden konnte. Allerdings schien die Gabe dieser Zellen in etwa der Hälfte der Tiere eine Immuntoleranz gegen transgenes FVIII-Protein zu induzieren. Dieser Befund deutet darauf hin, daß transduzierte Stammzellen oder aus diesen differenzierte Zellen FVIII-Protein im Thymus und/oder im Knochenmark exprimiert haben müssen (Evans & Morgan, 1998).

#### **4.3.2 Intrazelluläre Akkumulation von FVIII in primären hämatopoetischen Zellen: Besonderheiten des FVIII-Sekretionswegs**

Weitere Analysen der lentiviral transduzierten Zellen konnten in dieser Arbeit zeigen, daß nach der Transduktion CD34-positiver Zellen in einem Teil der Zellen FVIII-Protein exprimiert wurde, aber in Aggregaten akkumulierte. Dies steht im Kontrast zu den hohen FVIII-

Sekretionsraten, die ebenfalls in dieser Arbeit unter Verwendung von Vektoren mit gleicher Expressionscassette in hämatopoetischen Zelllinien (3.2.1) und Endothelzellen (3.4.1, 3.4.2) gemessen wurden. Ein direkter Vergleich der FVIII-Expression von primären hämatopoetischen Zellen mit den zuvor untersuchten hämatopoetischen Zelllinien ist sicher nur sehr begrenzt aussagekräftig, da die Zelllinien aufgrund ihres leukämischen Phänotyps eine Reihe von Mutationen besitzen müssen, die die Expression verschiedener Gene und Proteine so stark verändern, daß die korrekte Prozessierung und der Export des FVIII-Proteins ermöglicht werden.

Insgesamt legt aber der Vergleich der primären hämatopoetischen Zellen mit primären Endothelzellen nahe, daß das Ausbleiben einer FVIII-Sezernierung in den primären hämatopoetischen Zellen nicht auf unzureichende Effizienz des Gentransfers oder auf Defizite des verwendeten FVIII-Vektors zurückzuführen ist, sondern auf anderen, bisher nicht identifizierten Faktoren beruht, die in der Biologie des individuellen hämatopoetischen Zelltyps zu suchen sind. Da der Export von Proteinen nicht nur von einer kurzen Signalsequenz, sondern von komplexen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen im Verlauf des Sekretionswegs abhängt, soll kurz skizziert werden, welche Informationen über besondere Anforderungen des FVIII-Proteins an dieses System vorliegen, um anschließend mögliche Besonderheiten der hämatopoetischen Zellen zu diskutieren. Bisher liegen keine nicht-transformierten Zelllinien vor, die FVIII exprimieren, so daß die Erkenntnisse über die Expression und den Sekretionsweg auf Zelllinien beruhen, die mit einer (BDD) FVIII-cDNA transfiziert oder transduziert wurden.

FVIII besitzt in seiner primären Aminosäuresequenz ein Signalpeptid von 19 AS, das noch während der Translation die Translokation ins ER bewirkt. Da keine weiteren Lokisationsmotive im FVIII-Protein vorhanden sind, bleibt das Protein im Sekretionsweg, der über vesikulären Transport durch den Golgi-Apparat zur Freisetzung an der Plasmamembran führt. Während dieses Transports finden nicht nur die bereits beschriebenen posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung und Sulfatierung statt (siehe 1.3.2), sondern auch die bisher noch nicht diskutierte Proteinfaltung, die in der korrekten Tertiär- und Quartärstruktur resultiert, die für die Wechselwirkung von FVIII mit anderen Plasmaproteinen und damit für die Gerinnungsaktivität essentiell ist. Die Proteinfaltung im ER wird durch die oxidierende Umgebung, die die Bildung von Disulfidbrücken begünstigt, und durch Proteine wie Protein-Disulfid-Isomerase, Peptidylprolyl-Isomerase und Chaperone katalysiert. Die meisten Chaperone binden ATP-unabhängig und transient an Faltungsintermediate, um vorzeitige Faltung und die Aggregatbildung von unvollständig gefalteten Proteinen zu verhindern. Die Freisetzung erfolgt unter ATP-Hydrolyse und erlaubt eine partielle Faltung

freier Proteindomänen. Diese Interaktionen sind Teil eines Systems zur Qualitätskontrolle von Proteinen, die diese nur bei korrekter Faltung und korrekter Glykosylierung passieren können, um anschließend über den Golgi-Apparat in die Plasmamembran oder aus der Zelle zu gelangen. Inkorrekte Prozessierung führt zur Retention in der Zelle und letztlich zu intrazellulärem Abbau (im wesentlichen durch Proteasomen im Zytoplasma) und/oder zur Akkumulation unlöslicher Aggregate. Dieser Prozeß ist nicht nur ursächlich für FVIII-Sekretionsdefekte, sondern auch für verschiedene weitere Krankheitsbilder, in denen Proteine wie die  $\Delta F508$ -Mutante des CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) nicht von Chaperonen wie Calnexin dissoziieren und schließlich abgebaut werden (was im angeführten Beispiel zu Mukoviszidose führt) (Bergeron et al., 1994; Hebert et al., 1995; Kopito, 1997; Fewell et al., 2001).

Zu den Chaperonen, denen im Kontext des FVIII-Exports eine entscheidende Rolle zugeschrieben wurde, gehören BiP, Calnexin und Calreticulin (Dorner et al., 1987; Pipe et al., 1998). BiP (auch GRP78: glucose-regulated protein of 78 kDa) gehört zu den Hitzeschockproteinen und wird von allen Zelltypen exprimiert. BiP besitzt eine peptid-abhängige ATPase-Aktivität und bindet an ungefaltete oder partiell gefaltete Proteine, um so die Bildung von Proteinaggregaten zu verhindern, die den Export beeinträchtigen würden. Der Einfluß von BiP auf den FVIII-Export wurde durch Modulation der BiP-Expressionsstärke untersucht. Eine BiP-Überexpression inhibierte die FVIII-Sekretion (Kaufman et al., 1997), während eine Reduktion der BiP-Expression durch Antisense-RNA zu einer gesteigerten FVIII-Sekretion führte (Dorner et al., 1988; Dorner & Kaufman, 1994). Die Abhängigkeit des BiP-vermittelten Exports von ATP wurde durch Depletion des intrazellulären ATP-Spiegels nachgewiesen. Die Dissoziation des FVIII-Proteins von BiP schien deutlich sensitiver gegen eine Reduktion der ATP-Konzentration zu sein als die Dissoziation des Komplexes anderer Proteine mit BiP (Dorner et al., 1990, Kaufman et al., 1997). Zwar liegen über die Expression von BiP oder über die intrazellulären ATP-Spiegel in verschiedenen Zelltypen nicht genügend Daten vor, um Zelltypen, die FVIII sezernieren können, mit primären hämatopoetischen Zellen vergleichen zu können, aber angesichts der erwähnten Studien könnten eine höhere BiP-Expression oder niedrige ATP-Spiegel in hämatopoetischen Zellen zum ineffizienten FVIII-Export beitragen.

Eine zweite wichtige Funktion von Chaperonen steht im Zusammenhang mit der FVIII-Glykosylierung. Die Chaperone Calnexin und Calreticulin erkennen und binden transient an Zwischenprodukte des komplexen Prozesses der N-Glykosylierung und verhindern so den weiteren Transport dieser Faltungsintermediate entlang des Sekretionswegs (Pipe et al., 1998). Dies gilt auch für das FVIII-Protein, wobei zuerst unklar war, ob diese Interaktion die

Sekretion fördert oder behindert. Die N-Glykosylierung beginnt mit dem Transfer eines „Zuckerbaums“ aus 14 Sacchariden an bestimmte Asparaginreste innerhalb des FVIII-Proteins. Im Anschluß erfolgt die sequentielle Abspaltung von drei terminalen Glukose-Einheiten durch die Enzyme Glukosidase I und Glukosidase II. Nach der Abspaltung von zwei Glukoseresten bleibt eine monoglukosylierte Zuckerkette übrig, die von Calnexin und Calreticulin erkannt wird. Die Bindung der Chaperone an Glykoproteine wie FVIII verlängert die Zeit, die Proteine im ER verbleiben und in der sie mit der Unterstützung anderer Chaperone gefaltet werden können. Abschließend wird der letzte Glukoserest entfernt, und die korrekt gefalteten Proteine werden nach diesem als „Trimming“ bezeichneten Prozeß in Richtung des Golgi-Apparates transportiert, während ungefaltete oder unvollständig/falsch gefaltete Proteine durch das Enzym UDP-Glukose:Glykoprotein-Glukosyltransferase (UGGT) reglukosyliert werden (Hebert et al., 1995; Kopito, 1997). UGGT kann daher als eine Art „Faltungssensor“ angesehen werden, der eine erneute Proteinbindung an Calnexin und Calreticulin erlaubt und zu einer Retention von FVIII im ER führt (Ellgaard & Helenius, 2001). Bei der rekombinanten Expression in CHO-Zellen wurde demonstriert, daß die Stärke der Bindung von FVIII an Calnexin und Calreticulin deutlich reduziert wurde, wenn die B-Domäne deletiert war, die den größten Teil der N-glykosylierten Asparaginreste enthält. Diese Abschwächung der Wechselwirkung geht mit einer ineffizienteren Sekretion einher, so daß sich die Fähigkeit des FVIII-Proteins, diese beiden Chaperone zu binden, positiv auf den FVIII-Export auswirkt (Pipe et al., 1998). Die Komplexität der N-Glykosylierung und der Proteinfaltung legt nahe, daß Unterschiede in bezug auf die Aktivität einzelner Enzyme in der Glykosylierung oder in der Konzentration bestimmter Chaperone, deren Wechselwirkung mit FVIII möglicherweise noch nicht beschrieben ist, durchaus die Fähigkeit eines Zelltyps zum FVIII-Exports beeinträchtigen könnten. Eine Analyse der am Proteinexport beteiligten Proteine könnte zeigen, ob sich hämatopoetische Zellen durch Besonderheiten auszeichnen, die sich auf die FVIII-Expression ungünstig auswirken. Ein interessantes Beispiel für unterschiedliche Glykosylierungskapazitäten findet sich in einer Studie von Tiffany et al., die die Fähigkeit zur Expression des Ribonukleasetoxins EDN (eosinophil-derived neurotoxin) in verschiedenen Zelltypen untersuchte. Während EDN aus reifen Eosinophilen aus peripherem Blut als Glykoprotein von 18-25 kDa vorlag, kam es sowohl in Eosinophilen, die *in vitro* aus CD34-positiven Zellen differenziert wurden, als auch in einer hämatopoetischen Zelllinie zu einer Hyperglykosylierung, die in einem Protein von 22-45 kDa resultierte (Tiffany et al., 1995). Dieses Ergebnis legt nahe, daß sich diese Zellen in grundsätzlichen Mechanismen der posttranslationalen Modifikation von Glykoproteinen unterscheiden und daß solche Unterschiede auch zwischen anderen Zelltypen und bei der Expression hochglykosylierter Proteine wie FVIII denkbar sind.

Die Bedeutung einer korrekten Proteinfaltung für den FVIII-Export wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß FVIII-Mutanten gefunden wurden, bei denen der Austausch oder die Deletion einer einzigen Aminosäure zu reduzierter Sekretion und intrazellulärer Akkumulation und/oder proteolytischem Abbau von FVIII führen: Cys329Ser (David et al., 2001), Arg593Cys (Roelse et al., 2000), Asn618Ser (Roelse et al., 2000); DeltaPhe652/3 (Deletion von Phe652 oder Phe653; Amano et al., 1998), Gly1948Asp (David et al., 2001), Ile2098Ser (Jacquemin et al., 2000), Arg2150His (Jacquemin et al., 2000) und Arg2307Gln (Pipe & Kaufman, 1996; Voorberg et al., 1996). Die mutierten Codons liegen in den A- und C-Domänen, die für die Faltung und Aktivität von FVIII essentiell sind. Patienten mit diesen Mutationen zeigten reduzierte oder fehlende FVIII-Aktivitäten im Plasma. Durch rekombinante Expression von FVIII-cDNA mit ebendiesen Mutationen konnte nachgewiesen werden, daß diese Mutationen ursächlich für den hämophilen Phänotyp der Patienten waren. Der genaue Mechanismus, der zur Akkumulation und/oder verminderten Sezernierung führte, ist bisher nicht bekannt. Die Lage der betroffenen Aminosäuren im Protein läßt jedoch vermuten, daß die jeweiligen Mutationen beträchtliche Konsequenzen für die Faltung des FVIII-Proteins besitzen.

Neben dem Einfluß der erwähnten Chaperone auf die korrekte Faltung und Sekretion von FVIII spielt die Bindung des Proteins ERGIC-53 eine Rolle, das nicht für die Proteinfaltung, wohl aber für den Transport des FVIII-Proteins vom ER in den Golgi-Apparat wichtig ist. Mutationen von ERGIC-53 verursachen die seltene kombinierte FV-FVIII-Defizienz (Nichols et al., 1998). Die Patienten besitzen jeweils nur etwa 5%-30% der FV- und FVIII-Aktivität im Plasma, während die Konzentration der anderen Plasmaproteine im normalen Bereich liegt. ERGIC-53 wird als Transmembranprotein in Vesikeln vom ER über das ER-Golgi-intermediäre Kompartiment in den Golgi-Apparat und anschließend wieder zurück ins ER transportiert. Die Hauptfunktion von ERGIC-53 scheint darin zu bestehen, nach korrekter Faltung und Glukose-„Trimming“ an das FVIII-Protein zu binden und dessen Transport in den Golgi-Apparat zu unterstützen. Der milde hämophile Phänotyp deutet an, daß auch ein ERGIC-53-unabhängiger FVIII-Exportweg existieren könnte, der jedoch noch nicht charakterisiert wurde (Moussalli et al., 1999). Ein Vergleich von Wildtyp-FVIII und BDD FVIII zeigte, daß die Bindung an ERGIC-53 im wesentlichen durch die stark glykosylierte B-Domäne vermittelt wurde (Moussalli et al., 1999). Da die FVIII-cDNA, die in dieser Arbeit verwendet wurde, B-Domänen-deletiert war, erscheint es unwahrscheinlich, daß ein Unterschied der ERGIC-53-Expression zwischen hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen für die verschiedenen Effizienzen der FVIII-Sekretion verantwortlich war. Allerdings wären ein Vergleich der Expression von Wildtyp-FVIII und BDD FVIII in den Zelltypen

interessant, um herauszufinden, wie groß der Einfluß des ERGIC-53-abhängigen bzw. –unabhängigen Systems auf die FVIII-Expression in hämatopoetischen Zellen ist.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß lentiviral transduzierte, primäre hämatopoetische Zellen FVIII-Protein intrazellulär in Aggregaten exprimieren, aber nicht sezernieren können, während primäre Endothelzellen, die mit dem gleichen Vektor transduziert wurden, hohe Mengen an aktivem FVIII-Protein sezernieren. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte in Unterschieden in der Proteinexpression im ER (Glykosyltransferasen oder Glukosylasen; Chaperone; Transportproteine) liegen. Die hier durchgeführte intrazelluläre Anfärbung des FVIII-Proteins in primären hämatopoetischen Zellen erlaubt jedoch noch keine Aussage über die genaue subzelluläre Lokalisation der Aggregate. Im allgemeinen werden Proteine, die aufgrund inkorrektter Faltung nicht sezerniert werden können, aus dem ER ins Zytoplasma transportiert. Dort werden sie deglykosyliert, zum Teil ubiquitiniert und von zytoplasmatischen Proteasomen abgebaut (Parodi, 2000; Jarosch et al., 2002). Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde beschrieben, daß ein Teil dieser Glykoproteine nach Transport aus dem ER über den Golgi-Apparat in der Vakuole degradiert wird, die dem Lysosom in Säugerzellen entspricht (Hong et al., 1996). Im Zusammenhang mit der rekombinanten FVIII-Expression in Zelllinien wurde berichtet, daß FVIII-Aggregate im ER gefunden wurden (Tagliavacca et al., 2000) bzw. daß intrazelluläres FVIII-Protein über einen Lactacystin-abhängigen Weg abgebaut wurde, was auf die Beteiligung zytoplasmatischer Proteasomen hindeutet (Pipe et al., 1998). Für ein besseres Verständnis des FVIII-Sekretionsdefekts in hämatopoetischen Zellen sind Kolokalisierungsversuche mit ER-Proteinen (zum Beispiel Calnexin), mit Untereinheiten des Proteasoms und mit lysosomalen Proteinen erforderlich.

Falls der FVIII-Sekretionsdefekt in hämatopoetischen Zellen auf fehlende Chaperone, Glykosyltransferasen, Endoglukosidasen oder Transportproteine zurückführbar wäre, ließe sich das entsprechende Protein in einem bicistronischen Vektor mit FVIII koexprimieren (anstelle von EGFP im hier verwendeten Vektor). Auch eine Erhöhung der FVIII-Sekretion durch Modifikation von Chaperonbindestellen stellt einen attraktiven Ansatz zur Erhöhung der FVIII-Sekretion dar. Durch die Mutation einer potentiellen BiP-Bindestelle innerhalb des FVIII-Gens konnte in einer Zelllinie demonstriert werden, daß dieser Weg zu einer Erhöhung der Effizienz der FVIII-Sezernierung führen kann (Swaroop et al., 1997).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die vorliegende Arbeit zeigt, daß auch primäre hämatopoetische Zellen in der Lage sind, FVIII-Protein rekombinant zu exprimieren. Da der FVIII-Export aus den Zellen gestört zu sein scheint, ist ein besseres Verständnis der intrazellulären FVIII-Prozessierung und des FVIII-Transports durch Kolokalisierungsversuche

und vergleichende Analysen der Proteinexpression in hämatopoetischen und anderen, FVIII-sezernierenden Zellen notwendig. Die Ergebnisse solcher anschließenden Studien könnten eine gezielte Steuerung der FVIII-Expression erlauben, die die hämatopoetischen Zellen nicht nur im Kontext einer Toleranzinduktion, sondern auch im Rahmen einer FVIII-Substitution therapeutisch relevant sein ließen. Zudem könnten die in der vorliegenden Dissertation etablierten hämatopoetischen Zelllinien hilfreich sein, Faktoren zu identifizieren, die die effiziente Sekretion von FVIII vermitteln können.

#### **4.4 FVIII-Expression in Endothelzellen**

##### **4.4.1 Endothelzellen als Zielzellen einer Hämophilie A-Gentherapie**

Da hämatopoetische Stammzellen (HSC) und Endothelprogenitorzellen (EPC) gemeinsame Eigenschaften wie leichte Verfügbarkeit, Expandierbarkeit und Zugang zum Blutkreislauf besitzen, die für die rekombinante FVIII-Expression im Rahmen eines gentherapeutischen Ansatzes interessant sind, wurden in der vorliegenden Arbeit auch EPC untersucht. Es ist bekannt, daß sinusoidale Endothelzellen in der Leber neben Hepatozyten unter physiologischen Bedingungen FVIII sezernieren (Do et al., 1999; Hollestelle et al., 2001). Hiermit lag die Frage nahe, ob nicht auch EPC aus peripherem Blut, Knochenmark oder Nabelschnurblut mögliche Zielzellen in einer gentherapeutischen Behandlung der Hämophilie A sein könnten. Zu den weiteren potentiellen Vorteilen dieses Zelltyps gehört die Expression von vWF in Endothelzellen, der als Trägerprotein im Plasma das FVIII-Protein stabilisiert und die FVIII-Sekretion erhöhen könnte (Kaufman et al., 1989; Wise et al., 1991).

Schon seit den ersten Jahrzehnten des vergangenen Jahrhunderts deuten Beobachtungen der Embryogenese bei Wirbeltieren darauf hin, daß es eine enge Beziehung zwischen HSC und EPC geben muß (Sabin, 1920; Murray, 1932), die zur Postulierung einer als „Hämangioblast“ bezeichneten gemeinsamen Vorläuferzelle führte, welche Expansions- und Differenzierungspotential in beide Zelltypen besitzt. Ob Hämangioblasten nur während der Embryonalentwicklung existieren oder auch postnatal vorkommen und welche physiologische Rolle sie spielen, blieb jedoch lange Zeit umstritten. Erst in jüngster Zeit konnten Studien zeigen, daß es in angereicherten menschlichen HSC (Ziegler et al., 1999; Peichev et al., 2000) sowie in der Maus (Jackson et al., 2001; Sata et al., 2002; Grant et al., 2002) gemeinsame Vorläuferzellen sowohl für hämatopoetische Zellen als auch für Endothelzellen gibt. Eine phänotypische Charakterisierung ergab, daß humane postnatale Hämangioblasten in den CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>-Zellen von Nabelschnurblut und adultem Knochenmark in einer Frequenz

von etwa 5 Zellen je  $10^6$  mononukleären Zellen zu finden sind (Pelosi et al., 2002). Weitere Studien müssen klären, ob man diese Zellen als persistierende embryonale Stammzellen betrachten kann, die zum Teil oder vollständig für die vielfältigen Differenzierungsphänomene verantwortlich sind, die HSC zugeschrieben werden (Blau et al., 2001; Graf, 2002; Poulsom et al., 2002).

Verschiedene Gruppen konnten nachweisen, daß in angereicherten  $CD34^+$ - und  $CD133^+$ -Zellen aus peripherem Blut (PB), Knochenmark (KM) oder Nabelschnurblut (NB) auch EPC enthalten sind, die *in vitro* ein beträchtliches Proliferationspotential besitzen (PB: Gehling et al., 2000; KM: Nieda et al., 1997; Quirici et al., 2001) und *in vivo* zur Neubildung von Endothel in ischämischen Regionen oder Tumoren bzw. auf Implantaten beitragen (PB: Asahara et al., 1997; Gehling et al., 2000; KM: Shi et al., 1998; NB: Murohara et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals untersucht werden, ob im Nabelschnurblut EPC enthalten sind, die im Kontext einer Gentherapie der Hämophilie A aufgrund von Expandierbarkeit und hoher FVIII-Expression interessant sind. Da zwei Drittel der Hämophilie A-Fälle von der Mutter auf den Sohn übertragen werden und nicht auf spontane Mutationen zurückgeführt werden können, könnten Nabelschnur-EPC ebenso wie EPC aus Knochenmark oder peripherem Blut als autologe Quelle von FVIII-sezernierenden Zellen genutzt werden, die *ex vivo* lentiviral transduziert und dann nach Expansion, Qualitätskontrollen und Lagerung in flüssigem Stickstoff einmal oder in regelmäßigen Zeitabständen infundiert werden könnten (siehe auch 4.4.5). Die besondere Attraktivität von  $CD34^+$ -Nabelschnurblutzellen liegt darin, daß sie zumindest im Vergleich zu  $CD34^+$ -Zellen aus Knochenmark einen höheren Anteil an frühen HSC besitzen, im Schnitt über längere Telomere verfügen und *in vitro* besser proliferieren und expandieren (Vaziri et al., 1994; Mayani & Lansdorp, 1998).

#### 4.4.2 Differenzierung von EPC aus $CD34^+$ -Nabelschnurblutzellen

Nach immunmagnetischer Anreicherung aus Nabelschnurblut von Spenderpools oder Einzelspendern wurden Zellen, die zu 80-95% den HSC- und EPC-Marker  $CD34$  exprimierten, in Gegenwart von VEGF, FGF-2, SCF und SCGF- $\beta$  in EPC differenziert. Diese EPC konnten bei Verdoppelungszeiten von 30-35 Stunden um fünf bis neun Größenordnungen (bezogen auf die Zahl von eingesetzten  $CD34^+$ -Zellen) expandiert werden, bevor die Zellen seneszent wurden. Dies bedeutet, daß man bei etwa  $10^6$   $CD34$ -positiven Zellen aus einer Nabelschnur bis zu  $10^{15}$  Zellen erhalten kann. Dies sind deutlich mehr Endothelzellen, als in einem erwachsenen Menschen vorhanden sind ( $1-6 \times 10^{13}$  Zellen, die eine Fläche von bis zu  $7 \text{ m}^2$

bedecken; Cines et al., 1998). Bei der Kultur der Zellen fiel jedoch auf, daß das Proliferationspotential am höchsten war, wenn die Zellen bei niedrigen Zelldichten gehalten und deutlich vor Erreichen einer konfluenten Kultur passagiert wurden (vergleiche 2.2.7.3). Die Kontaktinhibition der Zellen beim Erreichen der Konfluenz schien sich auf die weitere Expansion der Zellen negativ auszuwirken.

Mit Hilfe verschiedener Methoden wurde der endotheliale Phänotyp der Zellen charakterisiert: Die Zellen exprimierten die endothelspezifischen Adhäsionsmoleküle VE-Cadherin (CD144) und CD146 (Solovey et al., 2001), waren aber gleichzeitig negativ für den Leukozytenmarker CD45. Die Expression von PECAM-1 (CD31) und die Fähigkeit zur Dil-Ac-LDL-Aufnahme ist zwar nicht auf Endothelzellen beschränkt, aber ebenso wie die Abwesenheit von CD14 charakteristisch für die meisten Endothelzellen (Voyta et al., 1984; Schmeisser & Strasser, 2002). Diese Befunde wurden durch das Verhalten der Zellen im funktionalen Matrigel-Assay bestätigt. Die Expression der Stammzellmarker CD34 und KDR in einem Teil der Zellen wies darauf hin, daß die erhaltenen Zellpopulationen nicht vollständig homogen waren und eine Mischpopulation aus Progenitorzellen und differenzierten Endothelzellen darstellten.

Ein Vergleich dieser Daten mit anderen Arbeiten (Gehling et al., 2000; Lin et al., 2000) zeigt, daß Modifikationen der Differenzierungsprotokolle in bezug auf Quelle und Anreicherung der Zellen sowie auf Zytokinkombination in jeder dieser Studien zu EPC-Populationen mit abweichenden Phänotypen führten. Diese Abweichungen zeigen sich in der Expression verschiedener Oberflächenantigene wie CD34, KDR, CD144, CD31 und CD36. Die von Gehling et al. charakterisierten EPC wurden aus CD133-positiven Zellen aus G-CSF-mobilisiertem peripherem Blut differenziert. Fast alle EPC exprimierten KDR, während nur Subpopulationen positiv für die Marker CD31, CD34 und CD144 waren (keine Daten für CD36 angegeben). In Lins Studie, die unter 4.4.3 diskutiert wird, konnte auf allen Zellen nicht nur die Expression von CD34, KDR, CD144 und CD31 detektiert werden, sondern auch von CD36, das auf den Nabelschnurblut-EPC in der vorliegenden Arbeit nicht vorhanden war. Bislang liegen jedoch noch keine Befunde vor, inwiefern diese charakteristischen Phänotypen auch Besonderheiten auf funktionaler Ebene und mögliche Einschränkungen eines therapeutischen Einsatzes widerspiegeln.

#### 4.4.3 Lentiviraler Gentransfer und FVIII-Expression in EPC aus Nabelschnurblut

Im Anschluß an die Differenzierung wurde die Transduzierbarkeit der EPC mit lentiviralen Vektoren evaluiert. Die durchgeführten Experimente demonstrierten, daß moderate Vektorkonzentrationen (MOI 10) ausreichen, um im Mittel über 80% der Zellen zu transduzieren. Dies bedeutet, daß hier im Vergleich zu Experimenten mit CD34<sup>+</sup>-HSC mit deutlich geringerem Aufwand höhere Transduktionsraten erzielt werden konnten. Eine Erhöhung der MOI auf 100 hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Transduktionsrate der EPC und war durch stärkere Vektortoxizität gekennzeichnet. Im Unterschied zu Studien mit retroviralem Gentransfer in Endothelzellen zeigten die lentiviral transduzierten Zellen in dieser Arbeit keine phänotypischen Abweichungen von untransduzierten Zellen, was für die These spricht, daß nicht der Gentransfer *per se*, sondern Probleme mit Vektortyp, Vektorpräparation oder viralen Sequenzen ursächlich für die früheren Beobachtungen waren, daß transduzierte Endothelzellen schwächer proliferierten als Wildtypzellen (Inaba et al., 1998).

Die Charakterisierung der FVIII-Sekretion der transduzierten Zellen erfolgte mit dem chromogenen Assay, mit einem ELISA und durch Western Blotting. Die FVIII:C-Sekretion wurde mit 0,35-0,39 IU/5x10<sup>4</sup> Zellen/48h ermittelt, was sich auf 7,0-7,8 IU/10<sup>6</sup> Zellen/48h hochrechnen läßt. Der Vergleich dieser Werte und der FVIII-Expression in lentiviral transduzierten HUVEC (etwa 7,5 IU/10<sup>6</sup> Zellen/48h; Tab. 3.7; Tab. 4.1) mit anderen rekombinanten Expressionssystemen (Tab. 4.1) zeigt deutlich, daß das hier erzielte Niveau der FVIII-Expression sehr hoch ist und daß nur in wenigen anderen Studien ähnlich gute oder bessere FVIII-Sekretionsraten erreicht wurden. Auffällig ist der Unterschied zur Studie von Chuah und Kollegen, die in Kulturen von retroviral transduzierten HUVEC nur eine FVIII-Sekretion von etwa 0,17 IU/10<sup>6</sup> Zellen/24h messen konnten (Tab. 4.1; Chuah et al., 1995). Dieser Vergleich unterstreicht die Eignung des verwendeten lentiviralen Vektors für die FVIII-Expression in Endothelzellen und EPC. Zudem konnten die EPC, die in der vorliegenden Arbeit transduziert wurden, das Expressionsniveau bis zur Seneszenz halten, und die FVIII-Expression war nicht mit Wachstumsnachteilen oder phänotypischen Veränderungen verbunden.

Die FVIII:C-Messungen wurden komplementiert durch zwei Verfahren zur FVIII:Ag-Detektion. Im ELISA wurden sogar noch höhere FVIII:Ag-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen gemessen, so daß das Verhältnis von FVIII:C/FVIII:Ag bei den EPC bei 0,54-0,83 lag (und somit unter den Vergleichswerten für die hämatopoetischen Zelllinien [0,85-1,02; Tab. 3.3; Tonn et al., 2002] bzw. HUVEC [0,91; 3.4.1]). Im Western Blot wurde deutlich, daß der

größte Teil des FVIII-Proteins intrazellulär prozessiert und in Form von schwerer und leichter Kette sezerniert wurde, während der Rest ohne intrazelluläre Proteolyse von den Zellen abgegeben wurde. Modifikationen des Glykosylierungs- oder Sulfatierungsmusters sind mit diesem Verfahren nicht sicher zu detektieren. Da die Bandenhöhen von schwerer und leichter Kette mit den mitgeführten Positivkontrollen übereinstimmten, wurden größere Prozessierungsprobleme ausgeschlossen, so daß die unvollständige Proteolyse der Grund für die leicht verringerte spezifische Aktivität des EPC-FVIII darstellen könnte. Angesichts der FVIII-Aktivierung im Plasma durch Thrombin, FIXa und FXa (Abb. 1.4) sollte sich dies jedoch nicht auf die FVIII-Funktion *in vivo* auswirken.

#### 4.4.4 Vergleich der Nabelschnurblut-EPC mit BOEC

Für die Bewertung der in 4.4.2 und 4.4.3 aufgeführten Ergebnisse ist der Vergleich mit Arbeiten der Gruppe von R. P. Hebbel wichtig: Aus peripherem Blut wurden sogenannte BOEC (Blood outgrowth endothelial cells) gewonnen, die über ein enormes Proliferationspotential *in vitro* und im NOD/SCID-Modell auch *in vivo* verfügten (Lin et al., 2000; Lin et al., 2002). Die Frequenz der BOEC-Vorläuferzellen im peripheren Blut war extrem niedrig und wurde mit etwa 20 Zellen in 50-100 ml Vollblut angegeben. Die BOEC konnten innerhalb von 65 Tagen auf  $10^{19}$  Zellen exponentiell vermehrt werden (Lin et al., 2000). Ein Teil der Zellen wurde nach anfänglicher Expansion mit einem Plasmid transfiziert, das neben einer BDD FVIII-cDNA, bei der die B-Domäne gegen EGFP ausgetauscht wurde, auch ein  $\text{neo}^R$ -Resistenzgen enthielt. Die Transkription des FVIII/EGFP-Konstruktes erfolgte - wie in der vorliegenden Arbeit - von einem CMV-Promotor. Nach G418-Selektion wurde ein Klon für weitere Versuche ausgewählt, dessen FVIII:Ag-Sekretion mit 22 ng/ml in einer Kultur mit  $5 \times 10^5$  Zellen nach 72 Stunden gegeben wurde. Ohne die Angabe des entsprechenden Kulturvolumens ist dieser Wert leider nicht mit den Daten der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Nach drei Infusionen von je  $5 \times 10^4$  bis  $4 \times 10^5$  BOEC in NOD/SCID-Mäuse konnten die Zellen im Knochenmark und in der Milz unter Beibehaltung des endothelialen Phänotyps anwachsen und proliferieren und *in vivo* humanes FVIII-Protein in supra-physiologischen Plasmakonzentrationen sezernieren (Lin et al., 2002). Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse ist noch nicht abzuschätzen, da vor allem die kontinuierliche Proliferation der Zellen in den NOD/SCID-Mäusen auf eine Transformation hinweist. Die unkontrollierte Expansion der BOEC und die stark ansteigenden FVIII-Spiegel im Plasma ohne weitere Regulationsmöglichkeiten könnten *in vivo* Probleme darstellen, die sich in unerwünschter Verdrängung des Knochenmarks mit nachfolgenden hämatologischen

Komplikationen und in erhöhtem Thromboserisiko manifestieren könnten (Kyrle et al., 2000; Monahan & White II, 2002).

Aufgrund fehlender Angaben ist ein umfassender Vergleich zwischen den BOEC und den EPC, die in der vorliegenden Studie charakterisiert wurden, nur eingeschränkt möglich. Unterschiede in bezug auf die Expression bestimmter Oberflächenantigene und somit auf den endothelialen Phänotyp wurden bereits in 4.4.2 angesprochen. Des weiteren fällt auf, daß die Zellen beider Studien hinsichtlich ihrer Proliferationsfähigkeit differieren. Für die EPC aus Nabelschnurblut konnte klar gezeigt werden, daß das Expansionspotential zwar überaus hoch, aber nicht wie bei einer transformierten Zelllinie unbegrenzt ist. Weitere Versuche zur *in vivo*-Proliferation im NOD/SCID-Modell und möglicherweise über einen längeren Beobachtungszeitraum in einem Großtiermodell wie Hämophilie A-Hunden sind erforderlich, um die Unbedenklichkeit beider Endothelzelltypen zu überprüfen. Eine Erklärung für die verschiedenen Eigenschaften dieser zwei endothelialen Zelltypen ist sicher in den unterschiedlichen Differenzierungsprotokollen zu finden. Während BOEC über einen kurzen Adhärenzschritt von 24 h auf Collagen I in EGM-2-Medium (2.2.7.3) aus PBMC isoliert wurden, erfolgte die Differenzierung der EPC in der vorliegenden Arbeit aus mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut, die in EDM mit einer anderen Zytokinkombination (2.2.7.2) auf Gelatine kultiviert wurden. Sowohl die Quelle der Zellen als auch die verwendeten Zytokine für die Differenzierung oder die Beschichtung der Kulturgefäße könnten ursächlich für die verschiedenen Phänotypen sein. Durch die Anwendung der Protokolle auf CD34-positive Zellen aus peripherem Blut, Nabelschnurblut und Knochenmark und durch Verwendung unterschiedlicher Zytokinkombinationen und Matrixproteine wie Gelatine, Collagen oder Fibronectin können die Faktoren bestimmt werden, die das unterschiedliche Proliferationspotential verursachen.

#### **4.4.5 Rekombinante FVIII-Expression durch Endothelzellen *in vivo*?**

Aufgrund der in dieser Dissertation gezeigten hohen FVIII:C-Sekretion von 7,0-7,8 IU/10<sup>6</sup> Zellen/48h läßt sich sagen, daß lentiviral transduzierte EPC aus Nabelschnurblut ein hervorragendes System für die rekombinante FVIII-Expression darstellen. Wie bereits in 4.4.1 erwähnt, sind zwei Drittel der Hämophilie A-Fälle vererbt und nicht auf spontane Mutationen zurückzuführen, so daß Nabelschnur-EPC nach Transduktion als autologe Quelle von FVIII-sezernierenden Zellen genutzt werden könnten. In dieser Arbeit wurden in der Regel Differenzierungskulturen mit CD34<sup>+</sup>-Nabelschnurblutzellen mehrerer Spender eingesetzt, da je Spender nur 20-40 ml Nabelschnurblut zur Verfügung standen. Eigene Versuche mit Zellen einzelner Spender zeigten jedoch, daß die Kulturen auch mit Zellen aus

einer einzigen Nabelschnur in kleinerem Volumen angesetzt werden konnten. Ein höheres Volumen an Ausgangsmaterial ist für eine Expansion individueller EPC-Chargen im klinischen Maßstab wünschenswert. Bei adulten Patienten müßte das vorliegende Protokoll an CD34<sup>+</sup>-Zellen aus peripherem Blut (ggf. nach G-CSF-Mobilisierung) oder aus Knochenmark adaptiert werden. Bei Zellen aus Knochenmark stellen nach ersten Vorversuchen jedoch adhärenzte Stromazellen ein Problem dar, so daß mehrere immunmagnetische Selektionsrunden für die Anreicherung von EPC erforderlich waren (R. Oostendorp, persönliche Mitteilung). Eine genauere Charakterisierung der Population innerhalb der CD34<sup>+</sup>-Zellen, die zu EPC differenziert werden kann, könnte jedoch zu einer Ausgangspopulation mit höherer Reinheit und geringeren Kontaminationen mit Stromazellen führen. Die Verwendung von CD34<sup>+</sup>-Subpopulationen für die EPC-Differenzierung, die sich in bezug auf die Expression von Markern wie CD133, CD146, CD144, KDR/VEGF-R2 oder den weiteren VEGF-Rezeptoren unterscheiden, könnte in diesem Zusammenhang wichtig sein. Der lentivirale Gentransfer erfolgte im vorliegenden Protokoll *nach* Differenzierung und anfänglicher Expansion der EPC. Die hohen Transduktionseffizienzen von 75%-95% bei einer moderaten MOI von 10 belegten, daß die verwendete Methode sehr effizient und für eine therapeutische Anwendung geeignet ist. Erste Experimente konnten zeigen, daß transduzierte Nabelschnurblut-EPC kryokonserviert und aufgetaut werden können, ohne daß die nachfolgende Expansion beeinträchtigt ist (R. Oostendorp, persönliche Mitteilung). Dieses Verfahren ermöglicht Qualitätskontrollen und Lagerung einzelner Zellchargen in flüssigem Stickstoff, die dann einmal oder in regelmäßigen Zeitabständen dem Patienten infundiert werden könnten.

Da bisher noch nicht genügend *in vivo*-Daten über die hier charakterisierten EPC aus Nabelschnurblut vorliegen, kann über das Verhalten *in vivo* nach Transduktion und Infusion im Tiermodell oder in der Klinik nur spekuliert werden. Studien über den Beitrag, den im Blut zirkulierende CD34<sup>+</sup>-Zellen *in vivo* zur Endothelbildung leisten, wiesen darauf hin, daß die Funktion dieser Zellen von ihrer Migration in bestimmte Gewebe und der Exposition gegen lokale Stimuli abhängen. Im gesunden Organismus scheinen diese Stimuli weniger stark ausgeprägt zu sein (Graf, 2002) als in pathologischen Situationen wie Ischämie in Geweben wie Myokardium oder Retina, nach Strahlungsexposition oder in der Tumorangio-genese (Beispiele in Asahara et al., 1997; Jackson et al., 2001; Grant et al., 2002). Auch wenn bereits eine Reihe von Wachstumsfaktoren bekannt sind, die spezifisch die Entwicklung von Endothelzellen *in vitro* begünstigen, so werden erst jetzt die Signale *in vivo* charakterisiert (Rafii et al., 2002), deren Manipulation möglicherweise zur therapeutischen Nutzung und zum dauerhaften Anwachsen genmodifizierter Endothelzellen führen wird. Möglicherweise wird ein Kompromiß zu schließen sein zwischen dem therapeutischen Effekt der

transduzierten EPC und einem vorher zu setzenden Gefäßschaden, der mit einem minimalen Risiko für den Patienten verbunden ist und ein Anwachsen der EPC *in vivo* erlaubt. Interessante Möglichkeiten bestünden in einer lokalen Bestrahlung oder alternativ in der Verwendung eines Vektors, der neben der FVIII-cDNA ein Gen enthält, dessen Produkt den transduzierten Zellen einen kontrollierbaren Wachstumsvorteil verschafft. Wenn man jedoch annimmt, daß einige der infundierten EPC anwachsen und *in vivo* auf einem ähnlich hohen Niveau wie *in vitro* FVIII sezernieren, dann sollten bereits etwa  $10^8$  transduzierte Zellen (bei insgesamt  $1-6 \times 10^{13}$  Endothelzellen des Erwachsenen; Cines et al., 1998) ausreichen, um einen therapeutisch gut wirksamen FVIII-Spiegel von über 10 ng/ml (5%) im Blut zu erreichen. Diese Einschätzung beruht auf der Formel  $K_0 = 24\text{h} \times 0,693 \times V_d C_{ss} / T_{1/2}$  (Chuah et al., 1998), wobei  $K_0$  die gesamte zu sezernierende FVIII-Menge in 24 h ist, um eine konstante Plasmakonzentration von  $C_{ss}$  von 10 ng/ml angesichts eines Plasmavolumens  $V_d$  von 3000 ml und einer FVIII-Halbwertszeit  $T_{1/2}$  von 12 h aufrechtzuerhalten.

Eine denkbare Alternative zu dem oben skizzierten Einsatz *ex vivo*-transduzierter EPC stellt ein gezielter *in vivo*-Gentransfer dar. Für Endothelzellen ist die Entwicklung eines Gentransfermodells wünschenswert, in dem lentivirale Partikel intravenös appliziert werden und nach selektiver Bindung an Endothelzellen diese bevorzugt *in vivo* zu transduzieren vermögen. Zwar liegen bislang noch keine Analysen für eine solche Modifikation des Tropismus lentiviraler Vektoren vor, aber im Kontext von Retroviren, Adenoviren und AAV wird mit zwei verschiedenen Strategien experimentiert:

Der erste Ansatz besteht in der Veränderung des Tropismus durch Mutation der Hüll- oder Capsidproteine, die für die Bindung der viralen Partikel an die Zielzellen und bei Retro- und Lentiviren auch für die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran verantwortlich sind. Dies kann zum Beispiel durch Insertion kleiner Peptide in AAV-Capsidproteine geschehen, die selektiv eine hohe Affinität für bestimmte Oberflächenproteine auf Endothelzellen besitzen (Nicklin et al., 2001). Die zweite Strategie verwendet molekulare Adapterproteine wie bispezifische Antikörper, die sowohl ein Virusantigen als auch einen endothelspezifischen Oberflächenmarker erkennen (Wickham et al., 1996). Unter den Oberflächenantigenen auf Endothelzellen wurden mit VE-Cadherin (CD144) und CD146 zwei Marker charakterisiert, deren Expression für diesen Zelltyp spezifisch ist, so daß sie ideale Ziele einer solchen Strategie sein könnten. Zudem ist eine Kombination beider oben genannten Ideen möglich: Die Insertion eines IgG-bindenden Peptides in ein retrovirales Hüllprotein erlaubt die Bindung eines anti-KDR-Antikörpers, der die Bindung an Endothelzellen vermitteln soll, während die Koexpression des Wildtyp-Hüllproteins die Infektiosität des Retrovirus erhält (Masood et al., 2001). Auch wenn die Effizienz dieser Ansätze im allgemeinen recht niedrig ist und noch

genauer untersucht werden muß, stellen sie interessante Verfahren für eine *in vivo*-Transduktion von Endothelzellen dar.

Bisher wurden EPC in der Regel nur als Zielzellen einer Gentherapie im Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen sowie zur Unterstützung der Neovaskularisierung in ischämischen Erkrankungen (Asahara & Isner, 2002; Iwaguro et al., 2002) oder der Inhibition der Angiogenese von soliden Tumoren (De Palma et al., 2002) diskutiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen jedoch, daß das Spektrum der potentiellen Anwendungsmöglichkeiten für transduzierte EPC durchaus zu erweitern ist auf die Hämophilie A und auf Defizienzen anderer konstitutiv exprimierter Plasmaproteine wie zum Beispiel weitere Gerinnungsfaktoren.

#### **4.5 Gentherapie der Hämophilie A: Perspektiven**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob hämatopoetische Zellen und Endothelprogenitorzellen für eine gentherapeutische Behandlung der Hämophilie A eingesetzt werden können. Während in früheren Studien diskutiert wurde, daß hämatopoetische Zellen aufgrund konzeptioneller Vorteile wie ihrer leichten Verfügbarkeit, Expandierbarkeit und ihrem Zugang zur Zirkulation interessante Zielzellen in diesem Kontext darstellen, konnte diese Arbeit zum ersten Mal zeigen, daß diese Zellen auch wirklich in der Lage sind, FVIII zu exprimieren. Sowohl die Beobachtung, daß einige hämatopoetische Zelllinien FVIII sezernieren können, als auch der Nachweis, daß primäre hämatopoetische Zellen FVIII-Protein intrazellulär exprimieren, belegen die Attraktivität dieses Zelltyps. In anschließenden Studien müssen nun die zellulären Voraussetzungen für den Export des FVIII-Proteins charakterisiert werden. Die Identifizierung bisher unbekannter Faktoren könnte neben der bereits gezeigten Toleranzinduktion durch hämatopoetische Zellen eine Steuerung der FVIII-Sekretion in hämatopoetischen Zellen und ihre Nutzung als Zielzellen für eine FVIII-Substitution ermöglichen. Des weiteren konnte diese Arbeit demonstrieren, daß CD34-positive Vorläuferzellen nicht nur deshalb interessant sind, weil ein Teil der Zellen hämatopoetische Stammzeleigenschaften besitzt, sondern auch aufgrund des Gehalts an Endothelprogenitorzellen, die sich durch leichte Transduzierbarkeit mit lentiviralen Vektoren, hohes Proliferationspotential und sehr hohe FVIII-Sekretionsraten auszeichnen. Für den Einsatz dieses rekombinanten Expressionssystems sind ebenfalls weitere Studien vielversprechend, die sich auf die Verwendung *ex vivo*-transduzierter Endothelprogenitorzellen oder auf die *in vivo*-Transduktion von Endothelzellen konzentrieren. Die Attraktivität beider Zelltypen, hämatopoetischer Zellen und Endothelprogenitorzellen, für Gentherapie-

protokolle zur Behandlung der Hämophilie A konnte in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden, auch wenn für den effizienten klinischen Einsatz noch einige weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden müssen.

Welche Perspektiven bieten sich nun über hämatopoetische Zellen und Endothelzellen hinaus an, um ein erfolgreiches Protokoll zur gentherapeutischen FVIII-Expression zu etablieren, und welche Probleme sind bei alternativen Ansätzen absehbar? Wie bereits in den Tiermodellen gezeigt, kommen durchaus verschiedene Zelltypen und Gewebe für eine rekombinante FVIII-Expression in Frage. Am unkompliziertesten in der Durchführung und am preiswertesten wäre eine Therapie, in der der Gentransfer *in vivo* erfolgt, da man in diesem Fall Vektorchargen wie Arzneimittel zur Behandlung einer großen Zahl von Patienten herstellen könnte. Dabei bleibt allerdings zu beachten, daß eine solche Applikation mit schwerwiegenden Nebenwirkungen belastet sein kann, die auf die Toxizität des Vektors zurückzuführen sind. Die klinische Phase I-Studie zur Behandlung der Ornithintranscarbamylase (OTC)-Defizienz mit einem adenoviralen Vektor an der Universität von Pennsylvania hat durch einen tragischen Todesfall demonstriert, wie begrenzt sich Daten aus Tierversuchen auf die klinische Situation übertragen lassen. In diesem Fall kam es in einem Patienten durch die Vektorinfusion in die Pfortader zu einer extrem starken Akut-Phase-Reaktion des angeborenen Immunsystems, die schließlich in einer systemischen Entzündung bis hin zum Multiorganversagen resultierte (Raper et al., 2002).

Nachdem in früheren Jahren die Entwicklung hocheffizienter Gentransfervektoren als größte Herausforderung in der Gentherapie galt, so scheint sich nun nicht nur aufgrund der OTC-Studie der Schwerpunkt vieler Arbeiten auf die Vermeidung von nachteiligen Immunantworten gegen den Vektor und gerade im Kontext der Hämophilie auch gegen das rekombinante therapeutische Protein zu verlagern. Möglichkeiten zur Vermeidung von Komplikationen durch Vektorimmunogenität werden in präklinischen Studien bereits getestet. Einige Ansätze zielen dabei auf eine Verringerung der Menge an Vektor, die für einen detektierbaren Gentransfer *in vivo* notwendig ist, da neben der direkten toxischen Wirkung des Vektors auch der Adjuvanseffekt auf die Immunreaktion gegen das Transgen berücksichtigt werden muß. Dies kann durch eine Veränderung des Tropismus geschehen, wie er bereits für Endothelzellen angesprochen wurde (4.4.5), so daß im wesentlichen das Zielgewebe transduziert wird und andere Gewebe nicht den Großteil des Vektors „abfangen“. Da gerade Makrophagen in Leber und Milz zu den Zellen gehören, die einen hohen Anteil von injizierten viralen Vektoren aufnehmen und somit nicht nur den Vektor eliminieren, sondern auch selbst aktiviert werden und vektor- bzw. transgenspezifische Immunantworten initiieren können, verringert die transiente Depletion dieser Zellen durch Clodronat vor der

Vektorgabe die therapeutisch erforderliche Mindestdosis und verlängert gleichzeitig die Zeitdauer der Expression (gezeigt für die adenovirale FVIII-Expression in Hämophilie A-Mäusen; Chuah et al., 2003).

Neben der Immunogenität viraler Vektorproteine ist bei allen Gentherapie-Protokollen für die Hämophilie A die Wahrscheinlichkeit der Bildung inhibitorischer Antikörper gegen das sezernierte FVIII-Protein zu beachten. Diese Inhibitorbildung erfordert zunächst eine Aktivierung FVIII-spezifischer T-Zellen, die im Folgenden FVIII-spezifische B-Zellen zu Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion stimulieren. Die T-Zellaktivierung beruht auf zwei Signalen: Signal 1 besteht in der antigenspezifischen Erkennung eines FVIII-Peptid-MHC-Komplexes auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen durch den T-Zellrezeptor-Komplex. Signal 2 ist nicht antigenspezifisch und wird durch die Bindung verschiedener Oberflächenantigene auf T-Zellen (CD28 und CTLA4; CD40L=CD154) an die entsprechenden Liganden auf den antigenpräsentierenden Zellen (B7.1/2=CD80/86; CD40) vermittelt (Qian et al., 2001). Aus verschiedenen Transplantationsmodellen einschließlich nicht-humaner Primaten ist bekannt, daß die Aktivierung von T-Zellen nur durch Signal 1 bei gleichzeitiger transienter Blockade der kostimulatorischen Wechselwirkungen eine Toleranz gegen Fremdanigene zu induzieren vermag (Larsen et al., 1996; Kirk et al., 1997; Kirk et al., 1999). Dieses Prinzip läßt sich auf die FVIII-Substitutionstherapie oder auf die rekombinante FVIII-Expression nach einer Gentherapie übertragen. Drei Studien belegen, daß die Gabe eines anti-CD154-Antikörpers oder des Fusionsproteins CTLA4-Ig die Inhibitorbildung durch intravenöse Applikation von rekombinantem humanem FVIII-Protein je nach Protokoll transient oder in einigen Tieren sogar permanent unterdrücken kann (Qian et al., 2000; Rossi et al., 2001; Reipert et al., 2001).

Im Kontext von Gentherapie-Protokollen sind solche Ansätze bislang noch nicht umfassend getestet worden. Drei weitere Studien zeigen jedoch, daß beim *in vivo*-Gentransfer mit Adenoviren oder AAV eine transiente Immunsuppression um die Vektorgabe herum zu höherer und deutlich längerer Expression von FVIII oder FIX führt. In Hämophilie A-Mäusen konnte dies durch Depletion der T-Zellen durch Gabe eines anti-CD4-Antikörpers erreicht werden (Sarkar et al., 2000), während in Hämophilie B-Mäusen und in einem Hämophilie B-Hund eine allgemeine Immunsuppression mit Cyclophosphamid einen vergleichbaren positiven Effekt auf die FIX-Expression hatte (Fields et al., 2001; Herzog et al., 2001).

Neben der Vermeidung einer Immunantwort gegen Vektor und Transgen besteht eine zusätzliche Herausforderung darin, eine Balance zu finden zwischen dem Wunsch nach permanenter Transgenexpression durch Integration des Transfervektors in die Zielzellen und potentiellen Nebenwirkungen durch Insertionsmutagenese. Kürzlich publizierte Arbeiten deuten darauf hin, daß dieses Risiko bei retro- und lentiviraler Transduktion nicht

vernachlässigt werden darf (Li et al., 2002; Schröder et al., 2002; Laufs et al., 2003). Bestätigt werden diese Bedenken durch den Verlauf einer klinischen Studie zur Behandlung der X-chromosomal vererbten schweren komplexen Immundefizienz (X-SCID) (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Den Patienten fehlt die gemeinsame  $\gamma\text{c}$ -Untereinheit, die für die Signaltransduktion über mindestens sechs Zytokinrezeptoren notwendig ist (Fischer et al., 2002). Dieser Defekt führt zu einer frühen Blockade der Entwicklung von funktionalen T- und NK-Zellen und konnte in zehn behandelten Patienten durch Transplantation retroviral transduzierter autologer HSC, die ebenso wie ihre Nachkommen die  $\gamma\text{c}$ -Rezeptorkette exprimierten, korrigiert werden. In zwei der Patienten wurde jedoch im dritten Jahr nach der Transplantation eine T-Zelleukämie diagnostiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Vektorintegration in einem Onkogen zurückzuführen ist (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; European Society of Gene Therapy, 2003). Bei der Bewertung dieser Fälle muß beachtet werden, daß auf den *ex vivo*-Gentransfer in HSC *in vivo* eine überaus starke Expansion und Differenzierung folgte, die durch den Selektionsvorteil der  $\gamma\text{c}^+$ -Zellen gegenüber den nicht-transduzierten Zellen begründet ist. Eine Infektion eines der beiden Patienten mit dem Varicella-Zoster-Virus (VZV) induzierte darüber hinaus eine starke T-Zellproliferation. Es ist durchaus denkbar, daß sich während der Proliferation neben der Disruption des Onkogen-Locus zusätzliche Mutationen in diesem Klon akkumulierten, die schließlich zum leukämischen Phänotyp führten. Daß Integrationen in Zielzellen mit geringerem Expansionspotential (wie bei den in dieser Arbeit verwendeten EPC) mit ähnlichen Nebenwirkungen verbunden sind, erscheint weniger wahrscheinlich. Diese Zwischenfälle verdeutlichen, daß erst eine Reihe von weiteren klinischen Studien mit den verschiedenen integrierenden Vektorsystemen (Retroviren, Lentiviren, adeno-assoziierte Viren) durchgeführt werden muß, um das Risiko einer neoplastischen Transformation durch die Integration des Transfervektors genauer angeben zu können.

Seit der ersten klinischen Gentherapie-Studie (Blaese et al., 1995) sind bereits zwölf Jahre vergangen, aber erst in den letzten zwei Jahren konnten zum ersten Mal im Rahmen der X-SCID-Studie Patienten durch Gentherapie komplett geheilt werden (Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Daß ausgerechnet diese Behandlung für zwei der Patienten so dramatische Nebenwirkungen hatte, ist geradezu tragisch und verweist auf den mehrfachen Wert dieser Arbeiten: Die Vektorsysteme sind endlich so gut optimiert, daß in Patienten mehr als nur transiente therapeutische Effekte erreicht werden. Dosis-Eskalations-Protokolle und Langzeitbeobachtungen der Patienten zeigen jedoch das schmale therapeutische Fenster auf, das sich den behandelnden Wissenschaftlern bietet, um schwerwiegende oder gar tödliche Nebenwirkungen zu vermeiden. Da im Falle der Hämophilie-Behandlung bereits eine partielle Substitution der fehlenden Gerinnungsfaktoren in einer beträchtlichen

Steigerung der Lebensqualität resultiert, wird diese Krankheit wohl zu den ersten gehören, für die ein erfolgreiches Gentherapieprotokoll entwickelt werden wird, das den in der Einleitung dieser Arbeit genannten Anforderungen entspricht: in *allen* Patienten *dauerhaft* einen *therapeutischen Effekt* (bei der Hämophilie A: einen FVIII-Plasmaspiegel von  $>1\%$ ) zu erreichen *ohne Vektortoxizität* und *ohne Inhibitorbildung*. Wahrscheinlich wird erst eine Kombination von Gentransfer und Immunmodulation zu einem Erfolg führen, aber die aktuellen Hürden werden in der nahen Zukunft wohl zu überwinden sein.

## 5 Literaturverzeichnis

Ailles L, Schmidt M, de Sio FRS, Glimm H, Cavalieri S, Bruno S, Piacibello W, von Kalle C, Naldini L (2002). Molecular evidence of lentiviral vector-mediated gene transfer into human self-renewing, multi-potent long-term NOD/SCID repopulating hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 6, 615-626

Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413

Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li Q, Planelles V, Chen ISY (1996). High-efficiency gene transfer into CD34<sup>+</sup> cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70, 2581-2585

Ali M, Lemoine NR, Ring CJA (1994). The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther* 1, 367-384

Amano K, Sarkar R, Pemberton S, Kembell-Cook G, Kazazian HH Jr, Kaufman RJ (1998). The molecular basis for cross-reacting material-positive hemophilia A due to missense mutations within the A2-domain of factor VIII. *Blood* 91, 538-548

An DS, Wersto RP, Agricola BA, Metzger ME, Lu S, Amado RG, Chen ISY, Donahue RE (2000). Marking and gene expression by a lentiviral vector in transplanted human and nonhuman primate CD34<sup>+</sup> cells. *J Virol* 74, 1286-1295

Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG (1979). Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. *Nature* 278, 364-365

Andrews JL, Weaver L, Kaleko M, Connelly S (1999). Efficient adenoviral vector transduction and expression of functional human factor VIII in cultured primary human hepatocytes. *Haemophilia* 5, 160-168

Andrews JL, Kadan MJ, Gorziglia MI, Kaleko M, Connelly S (2001). Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII. *Mol Ther* 3, 329-336

Andrews JL, Shirley PS, Iverson WO, Sherer AD, Markovits JE, King L, Lyons RM, Kaleko M, Connelly S (2002). Evaluation of the duration of human factor VIII expression in nonhuman primates after systemic delivery of an adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 13, 1331-1336

Antonarakis SE (1998). Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and haemophilia A. *Haemophilia* 4 (Suppl 2), 1-11

Antunes SV (2002). Haemophilia in the developing world: the Brazilian experience. *Haemophilia* 8, 199-204

Arruda VR, Couto L, Leonard D, Addya K, Sommer J, Herzog RW, Kay MA, Glader B, Manno C, Chew A, High KA (2002). Risk of inadvertent germline transmission of vector DNA following intravascular delivery of recombinant AAV vector. *Mol Ther* 5, S159-S160 (abstr 487) [5<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy]

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967

Asahara T, Kalka C, Isner JM (2000). Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7, 451-457

Asahara T, Isner JM (2002). Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematol Stem Cell Res* 11, 171-178

Avigen (2002). Press release: Avigen first to show long-term expression of FVIII in a hemophilia A large animal model. [http://www.avigen.com/coinfo/press/2002\\_Avigen\\_Show\\_Long-Term\\_Expression\\_F8\\_042402.htm](http://www.avigen.com/coinfo/press/2002_Avigen_Show_Long-Term_Expression_F8_042402.htm)

Balagué C, Zhou J, Dai Y, Alemany R, Josephs SF, Andreason G, Hariharan M, Sethi E, Prokopenko E, Jan HY, Lou YC, Hubert-Leslie D, Ruiz L, Zhang WW (2000). Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* 95, 820-828

Becker S, Wasser S, Hauses M, Hossle JP, Ott MG, Dinauer MC, Ganser A, Hoelzer D, Seger R, Grez M (1998). Correction of respiratory burst activity in X-linked chronic granulomatous cells to therapeutically relevant levels after gene transfer into bone marrow CD34<sup>+</sup> cells. *Hum Gene Ther* 9, 1561-1570

Begemann M (1999). *Praktische Hämatologie: Klinik – Therapie – Methodik* (11. Aufl.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 429-502

Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy JMR, Kotitschke R, Kloft M (2002). Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. *Thromb Haemost* 88, 221-229

Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz DF, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID (1988). Antigen CD34<sup>+</sup> marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 81, 951-955

Bergeron JJM, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB (1994). Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 19, 124-128

Berntorp E (1996). The treatment of haemophilia, including prophylaxis, constant infusion and DDAVP. *Bailliere's Clin Haematol* 9, 259-271

Berntorp E (1997). Second generation, B-domain deleted recombinant factor VIII. *Thromb Haemost* 78, 256-260

Bhatia M, Bonnet D, Kapp U, Wang JCY, Murdoch B, Dich JE (1997). Quantitative analysis reveals expansion of human repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* 186, 619-624

Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH Jr (1995). Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet* 10, 119-121

Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler AM, Pain J, Shumaker SL, Bedian V, Kazazian HH Jr (1996). Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood* 88, 3446-3450

- Bihoreau N, Pin S, de Kersabiec AM, Vidot F, Fontaine-Aupart MP (1993). Metal identification in human anti-hemophilia A factor (factor VIII). *C R Acad Sci III* 316, 536-539
- Björgvinsdóttir H, Ding C, Pech N, Gifford MA, Li LL, Dinauer MC (1997). Retroviral-mediated gene transfer of gp91<sup>phox</sup> into bone marrow cells rescues defect in host defense against *Aspergillus fumigatus* in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 89, 41-48
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsay WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WR (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105, 829-841
- Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentiviral vector. *J Virol* 71, 6641-6649
- Boggio LN, Green D (2001). Acquired hemophilia. *Rev Clin Exp Hematol* 5, 389-404
- Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ, Spero JA, Ragni MV, Scott JP (1987). Liver transplantation in hemophilia A. *Blood* 69, 1721-1724
- Bordignon C, Roncarolo MG (2002). Therapeutic applications for hematopoietic stem cell gene transfer. *Nat Immunol* 3, 318-321
- Bosma MJ, Carroll AM (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9, 323-350
- Bowen DJ (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 55, 127-144
- Brackmann HH, Gormsen J (1977). Massive factor-VIII infusion in a haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder. *Lancet* 2, 933
- Brackmann HH, Schwaab R, Effenberger W, Hess L, Hanfland P, Oldenburg J (2000). Antibodies to factor VIII in hemophilia A patients. *Vox Sang* 78 (Suppl 2), 187-190
- Bracy JL, Iacomini J (2000). Induction of B-cell tolerance by retroviral gene therapy. *Blood* 96, 3008-3015
- Brenner MK (1996). Gene transfer to hematopoietic cells. *N Engl J Med* 335, 337-339
- Bristol JA, Shirley P, Idamakanti N, Kaleko M, Connelly S (2000). In vivo dose threshold effect of adenovirus-mediated factor VIII gene therapy in hemophiliac mice. *Mol Ther* 2, 223-232
- Buchsacher GL Jr, Wong-Staal F (2000). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95, 2499-2504
- Bukovsky AA, Song JP, Naldini L (1999). Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus in transduced cells. *J Virol* 73, 7087-7092
- Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Emerman M, Stevenson M (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666-669

- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non-mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8033-8037
- Burt RK, Slavin S, Burns WH, Marmont AM (2002). Induction of tolerance in autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation: getting closer to a cure? *Blood* 99, 768-784
- Burton M, Nakai H, Colosi P, Cunningham J, Mitchell R, Couto L (1999). Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12725-12730
- Cameron C, Notley C, Hoyle S, McGlynn L, Hough C, Kamisue S, Giles A, Lillicrap D (1998). The canine factor VIII cDNA and 5' flanking sequence. *Thromb Haemost* 79, 317-322
- Cash JD, Gader AM, da Costa J (1974). The release of plasminogen activator and factor VIII to lysine vasopressin, arginine vasopressin, l-deamino-8-D-arginine vasopressin, angiotensin and oxytocin in man. *Br J Haematol* 27, 363-364
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bouso P, Le Deist F, Fischer A (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672
- Chao H, Mao L, Bruce AT, Walsh CE (2000). Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus vector. *Blood* 95, 1594-1599
- Chao H, Walsh CE (2000). Induction of tolerance to human factor VIII in mice. *Blood* 97, 3311-3312
- Charneau P, Clavel F (1991). A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *J Virol* 65, 2415-2421
- Charneau P, Alizon M, Clavel F (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 66, 2814-2820
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3120-3125
- Chinnasamy D, Chinnasamy N, Enriquez MJ, Otsu M, Morgan RA, Candotti F (2000). Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. *Blood* 96, 1309-1316
- Chinnasamy N, Chinnasamy D, Toso JF, Lapointe R, Candotti F, Morgan RA, Hwu P (2000). Efficient gene transfer to human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells using human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 11, 1901-1909
- Chuah MKL, VandenDriessche T, Morgan RA (1995). Development and analysis of retroviral vectors expressing human factor VIII as a potential gene therapy for hemophilia A. *Hum Gene Ther* 6, 1363-1377

- Chuah MKL, Brems H, Vanslembrouck V, Collen D, VandenDriessche T (1998). Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy of hemophilia A. *Hum Gene Ther* 9, 353-365
- Chuah MKL, Van Damme A, Zwinnen H, Goovaerts I, Vanslembrouck V, Collen D, VandenDriessche T (2000). Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gene Ther* 11, 729-738
- Chuah MKL, Collen D, VandenDriessche T (2001). Gene therapy for hemophilia. *J Gene Med* 3, 3-20
- Chuah MKL, Schiedner G, Thorrez L, Brown B, Johnston M, Gillijns V, Hertel S, Van Rooijen N, Lillicrap D, Collen D, VandenDriessche T, Kochanek S (2003). Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* 101, 1734-1743
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (Eds) (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY
- Colowick AB, Bohn RL, Avorn J, Ewenstein BM (2000). Immune tolerance induction in hemophilia patients with inhibitors: costly can be cheaper. *Blood* 96, 1698-1702
- Connelly S, Smith TAG, Dhir G, Gardner JM, Mehaffey MG, Zaret KS, McClelland A, Kaleko M (1995). In vivo gene delivery and expression of physiological levels of functional human factor VIII in mice. *Hum Gene Ther* 6, 185-193
- Connelly S, Gardner JM, McClelland A, Kaleko M (1996a). High-level tissue-specific expression of functional human factor VIII in mice. *Hum Gene Ther* 7, 183-195
- Connelly S, Mount J, Mauser A, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A, Lothrop CD Jr (1996b). Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* 88, 3846-3853
- Connelly S, Andrews JL, Gallo AM, Kayda DB, Qian J, Hoyer L, Kadan MJ, Gorziglia MI, Trapnell BC, McClelland A, Kaleko M (1998). Sustained phenotypic correction of murine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* 91, 3273-3281
- Connelly S, Andrews JL, Gallo-Penn AM, Tagliavacca L, Kaufman RJ, Kaleko M (1999). Evaluation of an adenoviral vector encoding full-length human factor VIII in hemophiliac mice. *Thromb Haemost* 81, 234-239
- Costello E, Munoz M, Buetti E, Meylan PRA, Diggelmann H, Thali M (2000). Gene transfer into stimulated and unstimulated lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* 7, 596-604
- David D, Saenko EL, Santos IMA, Johnson DJD, Tuddenham EGD, McVey JH, Kembell-Cook G (2001). Stable recombinant expression and characterization of the two haemophilic factor VIII variants C329S (CRM<sup>-</sup>) and G1948D (CRM<sup>+</sup>). *Br J Haematol* 113, 604-615

- Delorme MA, Adams PC, Grant D, Ghent C, Walker IR, Wall WJ (1990). Orthotopic liver transplantation in a person with combined hemophilia A and B. *Am J Hematol* 33, 136-138
- Demaison C, Brouns G, Blundell MP, Goldman JP, Levinsky RJ, Grez M, Kinnon C, Thrasher AJ (2000). A defined window for efficient gene marking of severe combined immunodeficient-repopulating cells using a gibbon ape leukemia virus-pseudotyped retroviral vector. *Hum Gene Ther* 11, 91-100
- Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M, Thrasher AJ (2002). High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13, 803-813
- De Palma M, Naldini L (2002). Transduction of a gene expression cassette using advanced generation lentiviral vectors. *Methods Enzymol* 346, 514-529
- De Palma M, Venneri MA, Bussolino F, Naldini L (2002). Targeting tumor angiogenesis by gene-modified bone marrow progenitor cells. *Mol Ther* 5, S302-S302 (abstr 924) [5<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy]
- Dietz HC, Valle D, Francomano CA, Kendzior RJ Jr, Pyeritz RE, Cutting GR (1993). The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science* 259, 680-682
- DiMichele DM (1998). Immune tolerance: a synopsis of the international experience. *Haemophilia* 4, 568-573
- Do H, Healey JF, Waller EK, Lollar P (1999). Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Biol Chem* 274, 19587-19592
- Donello JE, Loeb JE, Hope TJ (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72, 5085-5092
- Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ (1987). The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol* 105, 2665-2674
- Dorner AJ, Krane MG, Kaufman RJ (1988). Reduction of endogenous GRP78 levels improves secretion of a heterologous protein in CHO cells. *Mol Cell Biol* 8, 4063-4070
- Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ (1990). Protein dissociation from GRP78 and secretion is blocked by depletion of cellular ATP levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 7429-7432
- Dorner AJ, Kaufman RJ (1994). The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins. *Biologicals* 22, 103-112
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471
- Dwarki VJ, Belloni P, Nijjar T, Smith J, Couto L, Rabier M, Clift S, Berns A, Cohen LK (1995). Gene therapy for hemophilia A: production of therapeutic levels of human factor VIII in vivo in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1023-1027

Dyer MR, Herrling PL (2000). Progress and potential for gene-based medicines. *Mol Ther* 1, 213-224

Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA (1986a). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 25, 505-512

Eaton DL, Wood WI, Eaton D, Hass PE, Hollingshead P, Wion K, Mather J, Lawn RM, Vehar GA, Gorman C (1986b). Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule. *Biochemistry* 25, 8343-8347

Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Güngör T, Krackhardt B, Kornhuber B (1992). Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in hemophiliacs. *Lancet* 339, 594-598

Eisert V, Kreutz M, Becker K, Königs C, Alex U, Rübsamen-Waigmann H, Andreesen R, von Briesen H (2001). Analysis of cellular factors influencing the replication of human immunodeficiency virus type I in human macrophages derived from blood of different healthy donors. *Virology* 286, 31-44

Elder B, Lakich D, Gitschier J (1993). Sequence of the murine factor VIII cDNA. *Genomics* 16, 374-379

Ellgaard L, Helenius A (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13, 431-437

European Society of Gene Therapy (ESGT) (2002). Press release: Annual meeting of the ESGT. French gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency. <http://www.esgt.org>

European Society of Gene Therapy (ESGT) (2003). Press release: Reports of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT). <http://www.esgt.org>

Evans GL, Morgan RA (1998). Genetic induction of immune tolerance to human clotting factor VIII in a mouse model for hemophilia A. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5734-5739

Evans JT, Kelly PF, O'Neill E, Garcia JV (1999). Human cord blood CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cell transduction via lentivirus-based gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 10, 1479-1489

Evans JT, Garcia JV (2000). Lentivirus vector mobilization and spread by human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther* 11, 2331-2339

Evatt BL, Farrugia A, Shapiro AD, Wilde JT (2002). Haemophilia 2002: emerging risks of treatment. *Haemophilia* 8, 221-229

Fairman MP, Stillman B (1988). Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *EMBO J* 7, 1211-1218

Fakharzadeh SS, Zhang Y, Sarkar R, Kazazian HH Jr (2000). Correction of the coagulation defect in hemophilia A mice through factor VIII expression in skin. *Blood* 95, 2799-2805

Fallaux FJ, Hoeben RC, Cramer SJ, van der Wollenberg DJM, Briet E, van Ormondt H, van der Eb AJ (1996). The human clotting factor VIII cDNA contains an autonomously replicating sequence consensus- and matrix attachment region-like sequence that binds a nuclear

factor, represses heterologous gene expression, and mediates the transcriptional effects of sodium butyrate. *Mol Cell Biol* 16, 4264-4272

Farrugia A (2002). Risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease from factor concentrates: current perspectives. *Haemophilia* 8, 230-235

Farson D, Witt R, McGuinness R, Dull T, Kelly M, Song J, Radeke R, Bukovsky A, Consiglio A, Naldini L (2001). A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12, 981-997

Fay PJ (1999). Regulation of factor VIIIa in the intrinsic factor Xase. *Thromb Haemost* 82, 193-200

Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL (2001). The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* 35, 149-191

Fields PA, Arruda VR, Armstrong E, Chu K, Mingozzi F, Hagstrom JN, Herzog RW, High KA (2001). Risk and prevention of anti-factor IX formation in AAV-mediated gene transfer in the context of a large deletion of F9. *Mol Ther* 4, 201-210

Fischer A, Hacein-Bey S, Cavazzana-Calvo M (2002). Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* 2, 615-621

Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25, 217-222

Follenzi A, Naldini L (2002). Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol* 346, 454-465

Galimi F, Noll M, Kanazawa Y, Lax T, Chen C, Grompe M, Verma IM (2002). Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using lentiviral vectors. *Blood* 100, 2732-2736

Gallay P, Chin D, Hope TJ, Trono D (1997). HIV-1 infection of nondividing cells mediated through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9825-9830

Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL, Kayda DB, Pinkstaff AM, Kaloss M, Tinlin S, Cameron C, Notley C, Hough C, Lillicrap D, Kaleko M, Connelly S (1999). In vivo evaluation of an adenoviral vector encoding canine factor VIII: high-level, sustained expression in hemophilic mice. *Hum Gene Ther* 10, 1791-1802

Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL, Tinlin S, Webster S, Cameron C, Hough C, Notley C, Lillicrap D, Kaleko M, Connelly S (2001). Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood* 97, 107-113

Garcia-Martin C, Chuah MKL, van Damme A, Robinson KE, Vanzielegem B, Saint-Remy JM, Gallardo D, Ofosu FA, VandenDriessche T, Hortelano G (2002). Therapeutic levels of human factor VIII in mice implanted with encapsulated cells: potential for gene therapy of hemophilia A. *J Gene Med* 4, 215-223

Gatti L, Mannucci PM (1984). Use of porcine factor VIII in the management of seventeen patients with factor VIII antibodies. *Thromb Haemost* 51, 379-384

- Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-3112
- George JN (2000). Platelets. *Lancet* 355, 1531-1539
- Gewirtz AM, Burger D, Rado TA, Benz EJ Jr, Hoffman R (1982). Constitutive expression of platelet glycoproteins by the human leukemia cell line K562. *Blood* 60, 785-789
- Ghirardini A, Puopolo M, Chiarotti F, Mariani G (1996). The international registry of immune tolerance: 1994 update. *Vox Sang* 70 (Suppl 1), 42-46
- Giangrande PLF (1998). Hepatitis in haemophilia. *Br J Haematol* 103, 1-9
- Giles AR, Tinlin S, Greenwood R (1982). A canine model of hemophilic (factor VIII:C deficiency) bleeding. *Blood* 60, 727-730
- Gill JC (1999). The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost* 82, 500-504
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68, 913-963
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312, 326-330
- Gitschier J (1988). Maternal duplication associated with gene deletion in sporadic hemophilia. *Am J Hum Genet* 43, 274-279
- Glimm H, Oh IH, Eaves CJ (2000). Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G<sub>2</sub>/M transit and do not re-enter G<sub>0</sub>. *Blood* 96, 4185-4193
- Goodell MA (1999). CD34<sup>+</sup> or CD34<sup>-</sup>: does it really matter? *Blood* 94, 2545-2547
- Gothot A, van der Loo JC, Clapp DW, Srour EF (1998). Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* 92, 2641-2649
- Graf T (2002). Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 99, 3089-3101
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74
- Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GAJ, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 6, 607-612
- Groth CG, Hathaway WE, Gustaffson A, Geis WP, Putnam CW, Bjorken C, Porter KA, Starzl TE (1974). Correction of coagulation in the hemophilic dog by transplantation of lymphatic tissue. *Surgery* 75, 725-733
- Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, Dorrell C, Pereira DS, Kelly M, Naldini L, Dick JE (2000). Transduction of human CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol Ther* 1, 566-573

- Guy J, Drabek D, Antoniou M (1995). Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Mol Biotechnol* 3, 237-248
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupois-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346, 1185-1193
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580
- Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 2, 876-882
- Hay CRM, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC, Colvin BT, Hill FGH, Preston FE, Peake IR, for the UKHC-DO Inhibitor Working Party (1997). HLA class II profile. A weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. *Thromb Haemost* 77, 234-237
- Hebert DN, Foellmer B, Helenius A (1995). Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81, 425-433
- Heemskerk JWM, Bevers E, Lindhout T (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 88, 186-193
- Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7311-7315
- Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, Oumard A, Kröger A, Schirmbeck R, Reimann J, Hauser H (2001). Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 29, 3327-3334
- Herder C, Tonn T, Lützenkirchen K, Becker S, Seifried E, Grez M (2000). FVIII expression by lentivirally transduced haematopoietic cell lines. *J Gene Med* 2 (Suppl), 117 (abstr P315) [8<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Gene Therapy]
- Herder C, Tonn T, Becker S, Grez M, Seifried E (2001). FVIII expression in different haematopoietic cell lines after lentiviral gene transfer. *Thromb Haemost* 86 (Suppl) (abstr P1838) [18<sup>th</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis]
- Herzog RW, Mount JD, Arruda VR, High KA, Lothrop CD Jr (2001). Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* 4, 192-200
- Hoeben RC, van der Jagt RCM, Schoute F, van Tilburg NH, Verbeet MP, Briet E, van Ormondt H, van der Eb AJ (1990). Expression of functional factor VIII in primary human skin fibroblasts after retrovirus-mediated gene transfer. *J Biol Chem* 265, 7318-7323

Hoeben RC, Einerhand MPW, Briet E, van Ormondt H, Valerio D, van der Eb AJ (1992). Toward gene therapy in haemophilia A: retrovirus-mediated transfer of a factor VIII gene into murine haematopoietic progenitor cells. *Thromb Haemost* 67, 341-345

Hoeben RC, Fallaux FJ, Cramer SJ, van den Wollenberg DJM, van Ormondt H, Briet E, van der Eb AJ (1995). Expression of the blood-clotting factor VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. *Blood* 85, 2447-2454

Hoffbrand AV, Pettit JE, Hoelzer D (1997). *Roche Grundkurs Hämatologie*. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, pp. 320-373

Hollestelle MJ, Thinnis T, Crain K, Stiko A, Kruijt JK, van Berkel TJC, Loskutoff DJ, van Mourik JA (2001). Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo – a closer look. *Thromb Haemost* 86, 855-861

Hong E, Davidson AR, Kaiser CA (1996). A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol* 135, 623-633

Hough C, Kamisue S, Cameron C, Notley C, Tinlin S, Giles A, Lillicrap D (2002). Aberrant splicing and premature termination of transcription of the FVIII gene as a cause of severe canine hemophilia A: similarities with the intron 22 inversion mutation in human hemophilia. *Thromb Haemost* 87, 659-665

Inaba M, Toninelli E, Vanmeter G, Bender JR, Conte MS (1998). Retroviral gene transfer: effects on endothelial cell phenotype. *J Surg Res* 78, 31-36

Ingerslev J, Christiansen BS, Heickendorff L, Munck Petersen C (1988). Synthesis of factor VIII in human hepatocytes in culture. *Thromb Haemost* 60, 387-391

Ingerslev J, Sneppen O, Hvid I, Fredberg U, Kristensen HL, Sindet-Petersen S (1999). Treatment of acute bleeding episodes with rFVIIa. *Vox Sang* 77 (Suppl 1), 42-46

Israel DI, Kaufman RJ (1990). Retroviral-mediated transfer and amplification of a functional human factor VIII gene. *Blood* 75, 1074-1080

Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T (2002). Endothelial progenitor cell VEGF gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 105, 732-738

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majewsky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107, 1395-1402

Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, Vanzieleghem B, d'Oiron R, Lavergne JM, Brackmann HH, Schwaab R, VandenDriessche T, Chuah MKL, Hoylaerts M, Gilles JGG, Peerlinck K, Vermeylen J, Saint-Remy JMR (2000). A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood* 96, 958-965

Jarosch E, Geiss-Friedlander R, Meusser B, Walter J, Sommer T (2002). Protein dislocation from the endoplasmic reticulum – pulling out the suspect. *Traffic* 3, 530-536

Kafri T, Blömer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 17, 314-317

- Kane WH, Davie EW (1986). Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 6800-6804
- Kane WH, Ichinose A, Hagen FS, Davie EW (1987). Cloning of cDNAs coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of repeats. *Biochemistry* 26, 6508-6514
- Kasper CK (2000). Hereditary plasma clotting factor disorders and their management. *Haemophilia* 6 (Suppl 1), 13-27
- Kaufman RJ, Wasley LC, Davies MV, Wise RJ, Israel DI, Dorner AJ (1989). Effect of von Willebrand factor coexpression on the synthesis and secretion of factor VIII in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 9, 1233-1242
- Kaufman RJ, Pipe SW, Tagliavacca L, Swaroop M, Moussalli M (1997). Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis* 8 (Suppl 2), S3-S14
- Kaufman RJ (1999). Advances toward gene therapy for hemophilia at the millenium. *Hum Gene Ther* 10, 2091-2107
- Kaufman RJ, Pipe SW (1999). Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 82, 201-208
- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 24, 257-261
- Kazazian HH Jr, Wong C, Youssoufian HG, Scott AF, Phillips D, Antonarakis SE (1988). A novel mechanism of mutation in man: hemophilia A due to de novo insertion of L1 sequences. *Nature* 332, 164-166
- Kelley K, Verma I, Pierce GF (2002). Gene therapy: reality or myth for the global bleeding disorders community? *Haemophilia* 8, 261-267
- Kemball-Cook G, Tuddenham EGD, Wacey AI (1998). The factor VIII structure and mutation resource site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res* 26, 216-219
- Kernoff PB, Thomas NH, Lilley PA, Matthews KB, Goldman E, Tuddenham EG (1984). Clinical experience with polyelectrolyte-fractionated porcine factor VIII concentrate in the treatment of hemophiliacs with antibodies to factor VIII. *Blood* 63, 31-41
- Kim HJ, Tisdale JF, Wu T, Takatoku M, Sellers SE, Zickler P, Metzger ME, Agricola BA, Malley JD, Kato I, Donahue RE, Brown KE, Dunbar CE (2000). Many multipotential gene-marked progenitor or stem cell clones contribute to hematopoiesis in nonhuman primates. *Blood* 96, 1-8
- Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, Davis TA, Dong Y, Gray GS, Hong X, Thomas D, Fechner JH Jr, Knechtle SJ (1997). CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8789-8794
- Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K, Fechner JH Jr, Germond RL, Kampen RL, Patterson NB, Swanson SJ, Tadaki DK, DenHoor CN (1999).

Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 686-693

Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao Y, Miyazono K, Urabe A, Takaku F (1989). Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 140, 323-334

Kjalke M, Heding A, Talbo G, Persson E, Thomsen J, Ezban M (1995). Amino acid residues 721-729 are required for full factor VIII activity. *Eur J Biochem* 234, 773-779

Kochanek S (1999). High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 10, 2451-2459

Koch-Brandt C (1993). *Gentransfer: Prinzipien – Experimente – Anwendung bei Säugern*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 41-52

Koeberl DD, Halbert CL, Krumm A, Miller AD (1995). Sequences within the coding regions of clotting factor VIII and CFTR block transcriptional elongation. *Hum Gene Ther* 6, 469-479

Koeffler HP, Golde DW (1978). Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* 200, 1153-1154

Kopito RR (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88, 427-430

Koschinsky ML, Funk WD, van Ooars BA, MacGillivray RTA (1986). Complete cDNA sequence of human pre-ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5086-5090

Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12, 1893-1905

Kume A, Xu R, Ueda Y, Urabe M, Ozawa K (2000). Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes. *Gene Ther* 7, 1193-1199

Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, Weltermann A, Speiser W, Lechner K, Eichinger S (2000). High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 343, 457-462

Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Gitschier J (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 5, 236-241

Lapidot T, Petit I (2002). Current understanding of stem cell mobilization. The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 30, 973-981

Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE (1996). Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2, 1329-1337

Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Winn KJ, Pearson TC (1996). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381, 434-438

- Laufs S, Gentner B, Nagy KZ, Jauch A, Benner A, Naundorf S, Kuehlcke K, Schiedlmeier B, Ho AD, Zeller WJ, Fruehauf S (2003). Retroviral integration occurs into preferred genomic targets of human bone marrow repopulating cells. *Blood* 101, 2191-2198
- Lee CA (1996). Transfusion-transmitted disease. *Bailliere's Clin Haematol* 9, 369-394
- Lee C (1999). Recombinant clotting factors in the treatment of hemophilia. *Thromb Haemost* 82, 516-524
- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K (1998). The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 92, 3983-3996
- Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J (1990). A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 7, 1-11
- Levinson B, Bermingham JR, Metzenberg A, Kenwrick S, Chapman V, Gitschier J (1992a). Sequence of the human factor VIII-associated gene is conserved in mouse. *Genomics* 13, 862-865
- Levinson B, Kenwrick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J (1992b). Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics* 14, 585-589
- Lewis JH, Bontempo FA, Spero JA, Gorenc TJ, Ragni MV, Starzl TE (1985). Liver transplantation in a hemophiliac. *N Engl J Med* 312, 1189-1190
- Li Z, Düllmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuehlcke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296, 497
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105, 71-77
- Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP (2002). Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood* 99, 457-462
- Lipshutz GS, Sarkar R, Flebbe-Rehwaldt L, Kazazian H, Gaensler KML (1999). Short-term correction of factor VIII deficiency in a murine model of hemophilia A after delivery of adenovirus murine factor VIII in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13324-13329
- Little MT, Storb R (2002). History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2, 231-238
- Lollar P (1999). Characterization of factor VIII B-cell inhibitory epitopes. *Thromb Haemost* 82, 505-508
- Lozier JN, Dutra A, Pak E, Zhou N, Zheng Z, Nichols TC, Bellinger DA, Read M, Morgan RA (2002). The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12991-12996
- Lozzio CB, Lozzio BB (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334
- Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS, and the Kogenate previously untreated patients study group (1993). Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. *N Engl J Med* 328, 453-459

- Luthman H, Magnusson G (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res* 11, 1295-1308
- Lutzko C, Dubé ID, Stewart AK (1999). Recent progress in gene transfer into hematopoietic stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 30, 143-158
- Lynch CM, Israel DI, Kaufman RJ, Miller AD (1993). Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. *Hum Gene Ther* 4, 259-272
- Mann K (1999). Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 82, 165-174
- Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan A, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B (2002). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*, prepublished online Dec 19, 2002; DOI 10.1182/blood-2002-10-3296
- Mannucci PM, Giangrande PLF (2000). Choice of replacement therapy for hemophilia: recombinant products only? *Hematol J* 1, 72-76
- Mardiney M III, Jackson SH, Spratt SK, Li F, Holland SM, Malech HL (1997). Enhanced host defense after gene transfer in the murine p47<sup>phox</sup>-deficient model of chronic granulomatous disease. *Blood* 89, 2268-2275
- Mariani G, Ghirardini A, Bellocco R (1994). Immune tolerance in hemophilia – principal results from the international registry. Report of the factor VIII and IX subcommittee. *Thromb Haemost* 72, 155-158
- Marquette KA, Pittman DD, Kaufman RJ (1995). A 110-amino acid region within the A1-domain of coagulation factor VIII inhibits secretion from mammalian cells. *J Biol Chem* 270, 10297-10303
- Masood R, Gordon EM, Whitley MD, Wu BW, Bannon P, Evans L, Anderson WF, Gill P, Hall FL (2001). Retroviral vectors bearing IgG-binding motifs for antibody-mediated targeting of vascular endothelial growth factor receptors. *Int J Mol Med* 8, 335-343
- Mastromarino P, Conti C, Goldoni P, Hauttecoeur B, Orsi N (1987). Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J Gen Virol* 68, 2359-2369
- May C, Rivella S, Chadburn A, Sadelain M (2002). Successful treatment of murine  $\beta$ -thalassemia intermedia by transfer of the human  $\beta$ -globin gene. *Blood* 99, 1902-1908
- Mayani H, Lansdorp PM (1998). Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 16, 153-165
- Michnick DA, Pittman DD, Kaufman RJ (1994). Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem* 269, 20098-21102
- Migeon BR, McGinnis MJ, Antonarakis SE, Axelman J, Stasiowski BA, Youssoufian H, Kearns WG, Chung A, Pearson PL, Kazazian HH Jr, Muneer RS (1993). Severe hemophilia A in a female by cryptic translocation: order and orientation of factor VIII within Xq28. *Genomics* 16, 20-25

- Mikkola H, Woods NB, Sjögren M, Helgadóttir H, Hamaguchi I, Jacobsen SE, Trono D, Karlsson S (2000). Lentivirus gene transfer in murine hematopoietic progenitor cells is compromised by a delay in proviral integration and results in transduction mosaicism and heterogeneous gene expression in progeny cells. *J Virol* 74, 11911-11918
- Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72, 8150-8157
- Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE (1999). Transduction of human CD34<sup>+</sup> cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283, 682-686
- Monahan PE, White GC II (2002). Hemophilia gene therapy: update. *Curr Opin Hematol* 9, 430-436
- Moussalli M, Pipe SW, Hauri HP, Nichols WC, Ginsburg D, Kaufman RJ (1999). Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII. *J Biol Chem* 274, 32539-32542
- Murate T, Saga S, Hotta T, Asano H, Ito T, Kato K, Tsushita K, Kinoshita T, Ichikawa A, Yoshida S, Saito H (1993). The close relationship between DNA replication and the selection of differentiation of human erythroleukemia cell lines K562, HEL, and TF-1 into either erythroid or megakaryocytic lineages. *Exp Cell Res* 208, 35-43
- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T (2000). Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105, 1527-1536
- Murray PDF (1932). The development in vitro of blood of the early chick embryo. *Proc Roy Soc* 111, 497-521
- Murru S, Casula L, Pecorara M, Mori P, Pirastu M (1990). Illegitimate recombination produced a duplication within the factor VIII gene in a patient with mild hemophilia. *Genomics* 7, 115-118
- Myers G, Josephs SF, Berzofsky JA, Rabson AB, Smith TF, Wong-Staal F (Eds) (1989). *Human retroviruses and AIDS 1989*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos NM
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996a). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267
- Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996b). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11382-11388
- Nathwani AC, Tuddenham EGD (1992). Epidemiology of coagulation disorders. *Bailliere's Clin Haematol* 5, 383-439
- Naylor JA, Buck D, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F (1995). Investigation of the FVIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 4, 1217-1224
- Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, Trono D (2002). Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* 6, 199-209

- Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, Terry VH, Hertel CE, Wheatley MA, Moussalli MJ, Hauri HP, Ciavarella N, Kaufman RJ, Ginsburg D (1998). Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* 93, 61-70
- Nicklin SA, Buening H, Dishart KL, de Alwis M, Girod A, Hacker U, Thrasher AJ, Ali RR, Hallek M, Baker AH (2001). Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther* 4, 174-181
- Nicosia RF, Ottinetti A (1990). Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 119-128
- Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P, Sweetenham J, Bradley B, Hows J (1997). Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 98, 775-777
- Nilsson IM, Berntorp E, Zettervall O (1988). Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII. *N Engl J Med* 318, 947-950
- Nishikawa M, Huang L (2001). Nonviral vectors in the new millenium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 12, 861-870
- O'Brien DP, Johnson D, Byfield P, Tuddenham EG (1992). Inactivation of factor VIII by factor IXa. *Biochemistry* 31, 2805-2812
- Oldenburg J, Schwaab R, Grimm T, Zerres K, Hakenberg P, Brackmann HH, Olek K (1993). Direct and indirect estimation of the sex ratio of mutation frequencies in hemophilia A. *Am J Hum Gen* 53, 1229-1238
- Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EGD, Simpson E (1997). HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost* 77, 238-242
- Oldenburg J, Brackmann HH, Hanfland P, Schwaab R (2000). Molecular genetics in haemophilia A. *Vox Sang* 78 (Suppl 2), 33-38
- Oldenburg J (2001). Mutation profiling in haemophilia A. *Thromb Haemost* 85, 577-579
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245
- Over J, Sixma JJ, Bruine MH, Trieschnigg MC, Vlooswijk RA, Beese-Visser NH, Bouma BN (1978). Survival of 125 iodine-labeled factor VIII in normals and patients with classic haemophilia. Observations on the heterogeneity of human factor VIII. *J Clin Invest* 62, 223-234
- Owen CA, Bowie EJW, Fass DN (1979). Generation of FVIII coagulant activity by isolated, perfused neonatal pig livers and adult rat livers. *Br J Haematol* 43, 307-315
- Park F, Ohashi K, Chiu W, Naldini L, Kay MA (2000a). Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet* 24, 49-52

- Park F, Ohashi K, Kay MA (2000b). Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood* 96, 1173-1176
- Parodi AJ (2000). Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J* 348, 1-13
- Pawliuk R, Bachelot T, Wise RJ, Matthews-Roth MM, Leboulch P (1999). Long-term cure of the photosensitivity of murine erythropoietic protoporphyria by preselective gene therapy. *Nat Med* 5, 768-773
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34<sup>+</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958
- Pelletier J, Sonenberg N (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325
- Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marziali G, Masella B, Müller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C (2002). Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 100, 3202-3208
- Peplinski GR, Tsung K, Norton JA (1998). Vaccinia virus for human gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am* 7, 575-588
- Pipe SW, Kaufman RJ (1996). Factor VIII C2 domain missense mutations exhibit defective trafficking of biologically functional proteins. *J Biol Chem* 271, 25671-25676
- Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ (1998). Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 273, 8537-8544
- Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ (1992). Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry* 31, 3315-3325
- Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ (1993). Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood* 81, 2925-2935
- Pittman DD, Marquette KA, Kaufman RJ (1994). Role of the B-domain for factor VIII and factor V expression and function. *Blood* 84, 4214-4225
- Plantier JL, Rodriguez MH, Enjolras N, Attali O, Négrier C (2001). A factor VIII minigene comprising the truncated intron I of factor IX highly improves the in vitro production of factor VIII. *Thromb Haemost* 86, 596-603
- Pollok KE, Hanenberg H, Noblitt TW, Schroeder WL, Kato I, Emanuel D, Williams DA (1998). High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J Virol* 72, 4882-4892
- Popa I, Harris ME, Donello JE, Hope TJ (2002). CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element. *Mol Cell Biol* 22, 2057-2067
- Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA (2002). Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 197, 441-456

- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier HJ (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233
- Pulvertaft RJV (1964). Cytology of Burkitts' tumour (African lymphoma). *Lancet* 1, 238-240
- Qian J, Borovok M, Bi L, Kazazian HH Jr, Hoyer LW (1999). Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb Haemost* 81, 240-244
- Qian J, Collins M, Sharpe AH, Hoyer LW (2000). Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood* 95, 1324-1329
- Qian J, Saenko E, Scott D (2001). Co-stimulation blockade, hemophilic inhibitors and tolerance. *Thromb Haemost* 86, 1343-1344
- Qiu X, Lu D, Zhou J, Wang J, Yang J, Meng P, Hsueh JL (1996). Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients. *Chin Med J* 109, 832-839
- Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL (2001). Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133<sup>+</sup> cells. *Br J Haematol* 115, 186-194
- Rafii S, Heissig B, Hattori K (2002). Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther* 9, 631-641
- Ragni MV (2002). Safe passage: a plea for safety in hemophilia gene therapy. *Mol Ther* 6, 436-440
- Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG (2000). Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2, 458-469
- Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, Gao GP, Nunes F, Haskal ZJ, Furth EE, Propert KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM, Batshaw ML (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther* 13, 163-175
- Reddy PS, Sakhuja K, Ganesh S, Yang L, Kayda D, Brann T, Pattison S, Golightly D, Idamakanti N, Pinkstaff A, Kaloss M, Barjot C, Chamberlain JS, Kaleko M, Connelly S (2002). Sustained human factor VIII expression in hemophilia A mice following systemic delivery of a gutless adenoviral vector. *Mol Ther* 5, 63-73
- Reding MT, Wu H, Krampf M, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Key NS, Conti-Fine BM (1999). CD4<sup>+</sup> T cell response to factor VIII in hemophilia A, acquired hemophilia, and healthy subjects. *Thromb Haemost* 82, 509-515
- Reipert BM, Sasgary M, Ahmad RU, Auer W, Turecek PL, Schwarz HP (2001). Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. *Thromb Haemost* 86, 1345-1352
- Roberts HR (1999). The use of agents that by-pass factor VIII inhibitors in patients with haemophilia. *Vox Sang* 77 (Suppl 1), 38-41

- Robertson ES, Ooka T, Kieff ED (1996). Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11334-11340
- Roelse JC, de Laaf RTM, Timmermans SMH, Peters M, van Mourik JA, Voorberg J (2000). Intracellular accumulation of factor VIII induced by missense mutations Arg<sup>593</sup>→Cys and Asn<sup>618</sup>→Ser explains cross-reacting material-reduced haemophilia A. *Br J Haematol* 108, 241-246
- Rogoff EG, Guirguis HS, Lipton RA, Seremetis SV, DiMichele DM, Agnew GM, Karpatkin M, Barish RJ, Jones RL, Bianco C, Knothe BD, Lee MS (2002). The upward spiral of drug costs: a time series analysis of drugs used in the treatment of hemophilia: *Thromb Haemost* 88, 545-553
- Romano G, Pacilio C, Giordano A (1999). Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells* 17, 191-202
- Rosenberg JB, Greengard JS, Montgomery RR (2000). Genetic induction of a releasable pool of factor VIII in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2689-2695
- Rosenzweig M, MacVittie TJ, Harper D, Hempel D, Glickman RL, Johnson RP, Farese AM, Whiting-Theobald N, Linton GF, Yamasaki G, Jordan CT, Malech HL (1999). Efficient and durable gene marking of hematopoietic progenitor cells in nonhuman primates after nonablative conditioning. *Blood* 94, 2271-2286
- Rossi G, Sarkar J, Scandella D (2001). Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A. *Blood* 97, 2750-2757
- Rossiter JP, Young M, Kimberlanf ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schaid DJ, de Moerloose P, Sommer SS, Kazazian HH, Antonarakis SE (1994). Factor VIII gene inversions causing severe haemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* 3, 1035-1039
- Roth DA, Tawa NE Jr, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF, for the Factor VIII Transkaryotic Therapy Study Group (2001). Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia. *N Engl J Med* 344, 1735-1742
- Roth WK, Seifried E (2002). The German experience with NAT. *Transfusion Med* 12, 255-258
- Roy S, Shirley PS, Connelly S, Andrews JL, Kayda DB, Gardner JM, Kaleko M (1999). In vivo evaluation of a novel epitope-tagged human factor VIII-encoding adenoviral vector. *Haemophilia* 5, 340-348
- Sabin F (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Carnegie Inst Pub* 9-36, 214-262
- Sadelain M (2002). Globin gene transfer for the treatment of severe hemoglobinopathies: a paradigm for stem cell-based gene therapy. *J Gene Med* 4, 113-121
- Saenko EL, Scandella D (1997). The acidic region of the light chain and the C2 domain together form a high affinity binding site for von Willebrand factor. *J Biol Chem* 272, 18007-18014

- Saenko EL, Ananyeva N, Kouivaskaia D, Schwinn H, Josic D, Shima M, Hauser CAE, Pipe S (2002). Molecular defects in coagulation factor VIII and their impact on FVIII function. *Vox Sang* 83, 89-96
- Sallah S (1997). Inhibitors to clotting factors. *Ann Hematol* 75, 1-7
- Salmon P, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler RH, Trono D (2000). High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* 96, 3392-3398
- Sarkar R, Gao GP, Chirmule N, Tazelaar J, Kazazian HH Jr (2000). Partial correction of murine hemophilia A with neo-antigenic murine factor VIII. *Hum Gene Ther* 11, 881-894
- Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, Smucker B, Cornetta K (2002). Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* 9, 1155-1162
- Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R (2002). Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8, 403-409
- Sato T, Laver JH, Ogawa M (1999). Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 94, 2548-2554
- Scharrer I, Bray GL, Neutzling O (1999). Incidence of inhibitors in haemophilia A patients – a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. *Haemophilia* 5, 145-154
- Scherr M, Battmer K, Blömer U, Ganser A, Grez M (2001). Quantitative determination of lentiviral vector particle numbers by real-time PCR. *Biotechniques* 31, 520-526
- Scherr M, Battmer K, Blömer U, Schiedlmeier B, Ganser A, Grez M, Eder M (2002). Lentiviral gene transfer into peripheral blood-derived CD34<sup>+</sup> NOD/SCID-repopulating cells. *Blood* 99, 709-712
- Schmeisser A, Strasser RH (2002). Phenotypic overlap between hematopoietic cells with suggested angioblastic potential and vascular endothelial cells. *J Hematol Stem Cell Res* 11, 69-79
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-626
- Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-529
- Schroers R, Sinha I, Segall H, Schmidt-Wolf IGH, Rooney CM, Brenner MK, Sutton RE, Chen SY (2000). Transduction of human PBMC-derived dendritic cells and macrophages by an HIV-1-based lentiviral vector system. *Mol Ther* 1, 171-179
- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EG, Oldenburg J (1995). Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 74, 1402-1406
- Shaw E, Giddings JC, Peake IR, Bloom AL (1979). Synthesis of procoagulant factor VIII, factor VIII-related antigen and other coagulation factors by the isolated perfused rat liver. *Br J Haematol* 41, 585-596

- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MAS, Storb RF, Hammond WP (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92, 362-367
- Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L, Dubart-Kupperschmitt A, Charneau P (2000). The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of hematopoietic stem cells. *Blood* 96, 4103-4110
- Sjamsoedin LJ, Heijnen L, Mauser-Bunschoten EP, van Geijlswijk JL, van Houwelingen H, van Asten P, Sizma JJ (1981). The effect of activated prothrombin-complex concentrate (FEIBA) on joint and muscle bleeding in patients with hemophilia A and antibodies to factor VIII. *N Engl J Med* 305, 717-721
- Solovey AN, Gui L, Chang L, Enestein J, Browne PV, Heibel RP (2001). Identification and functional assessment of endothelial P1H12. *J Lab Clin Med* 138, 322-331
- Somia N, Verma I (2000). Gene therapy: Trials and tribulations. *Nat Rev Genet* 1, 91-99
- Soucie JM, Nuss R, Evatt B, Abdelhak A, Cowan L, Hill H, Kolakoski M, Wilber N, and the Hemophilia Surveillance System Project Investigators (2000). Mortality among males with hemophilia: relations with source of medical care. *Blood* 96, 437-442
- Soukharev S, Hammond D, Ananyeva NM, Anderson JAM, Hauser CAE, Pipe S, Saenko EL (2002). Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems. *Blood Cells Mol Dis* 28, 234-248
- Srivastava A (1998). Delivery of haemophilia care in the developing world. *Haemophilia* 4 (Suppl 2), 33-40
- Srivastava A (1999). Factor replacement for haemophilia – should cryoprecipitate be used? *Haemophilia* 5, 301-305
- Stein CS, Kang Y, Sauter SL, Townsend K, Staber P, Derksen TA, Martins I, Qian J, Davidson BL, McCray PB Jr (2001). In vivo treatment of hemophilia A and mucopolysaccharidosis type VII using nonprimate lentiviral vectors. *Mol Ther* 3, 850-856
- Sutton RE, Wu HTM, Rigg R, Böhnlein E, Brown PO (1998). Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. *J Virol* 72, 5781-5788
- Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ (1997). Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 272, 24121-24124
- Szilvassy SJ, Fraser CC, Eaves CJ, Lansdorp PM, Eaves AC, Humphries RK (1989). Retrovirus-mediated gene transfer to purified hemopoietic stem cells with long-term lymphomyelopoietic repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8798-8802
- Tagliavacca L, Moon N, Dunham WR, Kaufman RJ (1997). Identification and functional requirement of Cu(I) and its ligands within coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 272, 27428-27434
- Tagliavacca L, Wang Q, Kaufman RJ (2000). ATP-dependent dissociation of non-disulfide-linked aggregates of coagulation factor VIII is a rate-limiting step for secretion. *Biochemistry* 39, 1973-1981

Teitel JM (2000). Viral safety of haemophilia treatment products. *Ann Med* 32, 485-492

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545

Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF (1995). Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. *J Leukoc Biol* 58, 49-54

Tonn T, Herder C, Becker S, Seifried E, Grez M (2002). Generation and characterization of human hematopoietic cell lines expressing factor VIII. *J Hematol Stem Cell Res* 11, 695-704

Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 312, 342-347

Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ (1986). A large region (=95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5939-5942

Trono D (2000). Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther* 7, 20-24

Tucker KA, Lilly MB, Heck L Jr, Rado TA (1987). Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* 70, 372-378

Tuddenham EG, Lane RS, Rotblat F, Johnson AJ, Snape TJ, Middleton S, Kernoff PB (1982). Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br J Haematol* 52, 259-267

VandenDriessche T, Vanslembrouck V, Goovaerts I, Zwinnen H, Vanderhaeghen ML, Collen D, Chuah MKL (1999). Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in FVIII-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10379-10384

VandenDriessche T, Collen D, Chuah MKL (2001). Viral vector-mediated gene therapy for hemophilia. *Curr Gene Ther* 1, 301-315

VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L, Follenzi A, Moons L, Berneman Z, Collen D, Chuah MKL (2002). Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo. *Blood* 100, 813-822

Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9857-9860

Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon DJ (1984). Structure of human factor VIII. *Nature* 312, 337-342

- Veltkamp JJ, Asfaou E, van der Torren E, van der Does JA, van Tilburg NH, Pauwels EKJ (1974). Extrahepatic factor VIII synthesis. Lung transplants in hemophilic dogs. *Transplantation* 18, 56-62
- Vigna E, Naldini L (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2, 308-316
- Villar A, Jimenez-Yuste V, Quintana M, Hernandez-Navarro F (2002). The use of haemostatic drugs in haemophilia: desmopressin and antifibrinolytic agents. *Haemophilia* 8, 189-193
- Von Schwedler U, Kornbluth RS, Trono D (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of the human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6992-6996
- Voorberg J, de Laaf RTM, Koster PM, van Mourik JA (1996). Intracellular retention of a factor VIII protein with Arg<sup>2307</sup>→Gln mutation as a cause of haemophilia A. *Biochem J* 318, 931-937
- Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99, 2034-2040
- Wagers AJ, Christensen JL, Weissman IL (2002a). Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther* 9, 606-612
- Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL (2002b). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259
- Walker FJ, Chavin SI, Fay PJ (1987). Inactivation of FVIII by activated protein C and protein S. *Arch Biochem Biophys* 252, 322-328
- Wang JC, Doedens M, Dick JE (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* 89, 3919-3924
- Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW (1977). Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest* 60, 390-404
- Weissman IL (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446
- Whetton AD, Graham GJ (1999). Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol* 9, 233-238
- White GC II (2001). Gene therapy in hemophilia: clinical trials update. *Thromb Haemost* 86, 172-177
- Wickham TJ, Segal DM, Roelvink PW, Carrion ME, Lizonova A, Lee GM, Kovesdi I (1996). Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J Virol* 70, 6831-6838
- Williams DA (1993). Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells - robbing Peter to pay Paul? *Blood* 81, 3169-3172

- Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 317, 726-729
- Wise RJ, Dorner AJ, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ (1991). The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem* 266, 21948-21955
- Wood WI, Capon DJ, Simonsen CG, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EGD, Vehar GA, Lawn RM (1984). Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312, 330-337
- Woods NB, Fahlmann C, Mikkola H, Hamaguchi I, Olsson K, Zufferey R, Jacobson SE, Trono D, Karlsson S (2000). Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood* 96, 3725-3733
- World Federation of Hemophilia (2002). About hemophilia. <http://www.wfh.org/ShowDoc.asp?Rubrique=28&Document=28>
- Xu K, Ma H, McCown TJ, Verma IM, Kafri T (2001). Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 3, 97-104
- Yang TT, Cheng L, Kain SR (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 24, 4592-4593
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548
- Yokota T, Oritani K, Mitsui H, Aoyama K, Ishikawa J, Sugahara H, Matsumara I, Tsai S, Tomiyama Y, Kanakura Y, Matsuzawa Y (1998). Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for fibronectin activities on CS1 and cell binding domains. *Blood* 91, 3263-3272
- Zambidis ET, Barth RK, Scott DW (1997). Both resting and activated B lymphocytes expressing engineered peptide-Ig molecules serve as highly efficient tolerogenic vehicles in immunocompetent adult recipients. *J Immunol* 158, 2174-2182
- Zelechowska MG, van Mourik JA, Brodniewicz-Proba T (1985). Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in liver hepatocytes. *Nature* 317, 729-730
- Zennou V, Petit C, Guetard D, Nehrbass U, Montagnier L, Charneau P (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101, 173-185
- Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285, 1553-1558
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73, 2886-2892

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Potential von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und Endothelprogenitorzellen (EPC) aus peripherem Blut bzw. Nabelschnurblut sowie von aus diesen Vorläuferzellen differenzierten Zellen als Zielzellen für die Gentherapie der Hämophilie A untersucht. Der Gentransfer erfolgte mit einem lentiviralen Vektorsystem der zweiten Generation, das einen bicistronischen Transfervektor mit internem CMV-Promotor, einer FVIII-cDNA mit Deletion der B-Domäne, einem IRES-Element und dem EGFP-Gen als Markergen enthielt.

Das Vektorsystem wurde zunächst für die Transduktion humaner hämatopoetischer Zelllinien verwendet, die verschiedene Leukozytentypen repräsentierten, um es in bezug auf Gentransfer-effizienz und FVIII-Expressionsstärke zu evaluieren. Im Rahmen dieser Versuchsreihe konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß hämatopoetische Zellen grundsätzlich in der Lage sind, FVIII zu sezernieren. Zugleich verwiesen die Befunde auf mögliche Expressionsprobleme, da trotz durchweg erfolgreichen Gentransfers und FVIII-Transkription nur in den Überständen von vier der sechs charakterisierten Zelllinien FVIII-Protein meßbar war.

In anschließenden Experimenten mit humanen und murinen HSC sowie humanen Granulozyten und Makrophagen konnte nach lentiviralem Gentransfer keine Sezernierung von FVIII-Protein detektiert werden. In expandierten humanen HSC wurden jedoch FVIII-mRNA und intrazelluläres FVIII-Protein detektiert, so daß in diesen Zellen ein Exportdefekt für das FVIII-Protein vorzuliegen schien.

Da hämatopoetische Zellen und Endothelzellen mit dem Hämangioblasten eine gemeinsame Vorläuferzelle besitzen, wurde zudem geprüft, ob aus CD34-positiven Stammzellen generierte Endothelprogenitorzellen (EPC) in der Lage sind, therapeutisch relevante FVIII-Mengen zu sezernieren. In Anwesenheit von VEGF, FGF-2, SCF und SCGF- $\beta$  wurden adhärente Zellen gewonnen, die aufgrund des Musters der Expression von Oberflächenmarkern und durch ihr Verhalten im Matrigel-Assay einen eindeutig endothelialen Phänotyp besaßen. Diese Zellen wurden (bezogen auf die Zahl der eingesetzten CD34-positiven Zellen) um bis zu neun Größenordnungen expandiert. Nach lentiviraler Transduktion der Zellen, die weder das Proliferationspotential der Zellen noch ihren Phänotyp veränderte, wurde eine hocheffiziente FVIII:C-Sezernierung (7,0-7,8 IU/10<sup>6</sup> Zellen/48 Std.) gemessen. Im ELISA fielen leicht erhöhte FVIII:Ag-Werte auf, und eine nachfolgende Western Blot-Analyse legte nahe, daß dies auf unvollständige intrazelluläre Spaltung des FVIII-Polypeptids in schwere und leichte Kette zurückführbar sein könnte, die sich wegen der weiteren proteolytischen Aktivierung im Plasma jedoch nicht negativ auf die Gerinnungsaktivität *in vivo* auswirken sollte.

Die Befunde dieser Arbeit identifizieren EPC aus CD34-positiven Nabelschnurblutzellen als potentielle Zielzellen für eine FVIII-Substitution nach *ex vivo*-Gentransfer, da sie sich nicht nur durch ihr hohes Expansionsvermögen auszeichnen, sondern auch durch die Fähigkeit zur rekombinanten FVIII-Sezernierung auf sehr hohem Niveau, das nur wenig unter dem FVIII-Sekretionspotential humaner Hepatozyten liegt. Primäre hämatopoetische Zellen sind aufgrund eines Exportdefektes zwar nicht direkt für eine FVIII-Substitution, möglicherweise aber für eine Toleranzinduktion geeignet.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosindeaminase
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom
APC	aktiviertes Protein C
APTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
ATCC	American Type Culture Collection
BD	Becton Dickinson
BDD	B-Domänen-deletiert
BFU-E	burst-forming unit-erythroid
BHK	baby hamster kidney
BiP	Immunglobulin-bindendes Protein
BOEC	blood outgrowth endothelial cell
bp	Basenpaare
BSD	Blutspendedienst
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CFC	colony-forming cell
CFU-E	colony-forming unit-erythroid
CFU-GEMM	colony-forming unit-granulocyte/erythroid/monocyte/ macrophage
CFU-GM	colony-forming unit-granulocyte/macrophage
CHO	Chinese hamster ovary
CMV	Cytomegalievirus (immediate early promoter)
cPPT/CTS	central polypurine tract/central termination sequence
Da	Dalton
DDAVP	Desmopressin (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	Wasser (reinst)
Dil-Ac-LDL	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyaninperchlorat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ds	doppelsträngig
E17	Knockout des Exons 17 im FVIII-Gen
EBM/EBM-2	Endothelzellmedium
EDM	Endotheldifferenzierungsmedium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGM/EGM-2	Endothelzellmedium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Env	envelope (HIV)
EPC	Endothelprogenitorzellen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	Endoplasmatisches Retikulum-Golgi-Intermediäres Kompartiment
F(ab') <sub>2</sub>	fragment antigen binding (Pepsin-Spaltprodukt eines Immun- globulins)
FACS	fluorescence activated cell sorting

FBS	fötales Rinderserum
FGF-2	fibroblast growth factor-2
FIX	Faktor IX
FIXa	Faktor IX (aktiviert)
Flt-3L	fetal liver tyrosine kinase-3 ligand
FVIII	Faktor VIII
FVIIIa	Faktor VIII (aktiviert)
FVIII:Ag	FVIII-Antigen
FVIII:C	FVIII-Aktivität
FX	Faktor X
FXa	Faktor X (aktiviert)
Gag	group-specific antigen (HIV)
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GSH	Georg-Speyer-Haus
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HEK	human embryonal kidney cell
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA-DR	humanes Leukozyten-Antigen-DR
HSA	humanes Serum-Albumin
HSC	hämatopoetische Stammzellen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IGF	insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
IRES	internal ribosome entry site
IU	internationale Einheit(en)
kb	Kilobasenpaare
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KDR	kinase insert domain receptor
KMZ	Knochenmarkzellen
LTR	long terminal repeat
MACS	magnetische Zellseparation (magnetic activated cell separation)
Mb	Megabasenpaar(e)
MC	mononukleäre Zellen
MCS	multiple cloning site
MEM	Modified Eagle's Medium
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MWCO	molecular weight cut-off
Nef	negative regulation factor (HIV)
neo (neo <sup>R</sup> )	Neomycinphosphotransferase II
NK	natural killer
NLS	nuclear localisation signal
NOD	non-obese diabetic
OTC	Ornithintranscarbamylase
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 25:24:1)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PL	Phospholipide
Pol	Polymerase (HIV)
polyA	Polyadenylierungssignal
PTT	partielle Thromboplastinzeit
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rev	regulator of viral expression (HIV)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rh	rekombinant human
rm	rekombinant murin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RRE	Rev-responsive element
RSV	Rous-Sarkomvirus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SA	Spleißakzeptorstelle
Sca-1	stem cell antigen-1
SCF	stem cell factor
SCGF- $\beta$	stem cell growth factor- $\beta$
SCID	schwere komplexe Immundefizienz
SCID-X1	X-chromosomal vererbte SCID
SD	Spleißdonorstelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFFV	spleen focus forming virus
SIN	selbst-inaktivierend
ss	einzelsträngig
SV40	simian virus type 40
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tat	Transaktivator (HIV)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TU	transducing units
UTR	untranslatierte Region
VEGF(-R)	vascular endothelial growth factor (receptor)
Vif	viral infectivity (HIV)
Vol.	Volumen
Vpr	virales Protein R (HIV)
Vpu	virales Protein U (HIV)
VSV-G	G-Glykoprotein des Vesikulären Stomatitisvirus
vWF	von Willebrand-Faktor
WPRE	woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
$\Psi$	Verpackungssignal

## Publikationen und Kongreßbeiträge

### Daten aus dieser Arbeit sind veröffentlicht in folgenden Publikationen:

**Herder C**, Tonn T, Oostendorp R, Becker S, Keller U, Peschel C, Grez M, Seifried E (2003). Sustained expansion and transgene expression of coagulation factor VIII-transduced cord blood-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2266-2272

Tonn T, **Herder C**, Becker S, Seifried E, Grez M (2002). Generation and characterization of human hematopoietic cell lines expressing factor VIII. *J Hematol Stem Cell Res* 11, 695-704

Tonn T, Becker S, **Herder C**, Grez M, Seifried E. Hematopoietic stem cells as targets for gene therapy of hemophilia A. In: 32<sup>nd</sup> Hemophilia Symposium Hamburg 2001. Scharrer I, Schramm W, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag 2003

### Kongreßbeiträge (Auswahl):

Tonn T, Becker S, **Herder C**, Grez M, Seifried E:  
Developing hematopoietic stem cells as targets for gene therapy of hemophilia A  
27<sup>th</sup> Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT)  
Vancouver, August 2002

Tonn T, **Herder C**, Becker S, Grez M, Seifried E:  
Hämatopoetische Stammzellen als Zielzellen für die Gentherapie der Hämophilie A  
32. Hämophilie-Symposium  
Hamburg, November 2001

**Herder C**, Tonn T, Becker S, Grez M, Seifried E:  
FVIII expression in different haematopoietic cell lines after lentiviral gene transfer  
18<sup>th</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)  
Paris, Juli 2001

**Herder C**, Tonn T, Becker S, Grez M, Seifried E:  
FVIII expression in haematopoietic cell lines after lentiviral gene transfer  
6<sup>th</sup> Meeting of the European Haematology Association (EHA)  
Frankfurt am Main, Juni 2001

Tonn T, **Herder C**, Becker S, Lützenkirchen K, Grez M, Seifried E:  
Development of lentiviral vectors for gene therapy of hemophilia A  
45. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH)  
Düsseldorf, Februar 2001

**Herder C**, Tonn T, Lützenkirchen K, Becker S, Seifried E, Grez M:  
FVIII expression in lentivirally transduced haematopoietic cells  
8<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Gene Therapy (ESGT)  
Stockholm, Oktober 2000

Tonn T, **Herder C**, Lützenkirchen K, Becker S, Grez M, Seifried E:  
Lentiviral gene transfer of FVIII – a novel approach for the gene therapy of haemophilia A  
26<sup>th</sup> Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT)  
Wien, Juli 2000

Tonn T, **Herder C**, Lützenkirchen K, Becker S, Grez M, Seifried E:  
Highly efficient FVIII expression by lentivirally transduced cells  
44. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH)  
Freiburg, Februar 2000

**Weitere Publikationen:**

Adler T, Akiyama H, **Herder C**, Kolb H, Burkart V (2002). Heat shock protein 60 elicits abnormal response in macrophages of diabetes-prone non-obese diabetic mice.  
Biochem Biophys Res Commun 294, 592-596

Flohé SB, Brüggemann J, **Herder C**, Goebel C, Kolb H (2002). Enhanced proinflammatory response to endotoxin after priming of macrophages with lead ions.  
J Leukoc Biol 71, 417-424

Goebel C, Flohé SB, Kirchhoff K, **Herder C**, Kolb H (2000). Orally administered lead chloride induces bias of mucosal immunity.  
Cytokine 12, 1414-1418

## Lebenslauf

Name	<b>Christian Herder</b>
Geburtsdatum/-ort	28.12.1972, Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

08/1979 – 07/1983	Grundschule in Düsseldorf
08/1983 – 06/1992	Görres-Gymnasium in Düsseldorf; Allgemeine Hochschulreife

## Zivildienst

07/1992 – 09/1993	Caritasverband für die Stadt Düsseldorf e.V. (Mobiler Sozialer Hilfsdienst)
-------------------	--

## Hochschulausbildung

10/1993 – 09/1995	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Grundstudium der Biologie; Diplom-Vorprüfung
10/1995 – 06/1996	University of Edinburgh (Großbritannien)
08/1996 – 02/1998	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Hauptstudium der Biologie; Diplomprüfungen in Mikrobiologie (Hauptfach), Immunologie und Physikalischer Chemie
03/1998 – 04/1999	Diabetes-Forschungsinstitut an der HHU Düsseldorf: Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Kolb und Dr. C. Goebel („Modulation von Makrophagen-Funktionen durch Schwermetalle“)
04/1999	Studienabschluß: Diplom-Biologe
seit 06/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen in Frankfurt am Main; Promotionsprojekt bei Prof. Dr. E. Seifried und Dr. T. Tonn in Kooperation mit Dr. M. Grez im Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main

## Auszeichnungen

- Stipendium des Cusanuswerks (Bischöfliche Studienförderung) von 04/1995 bis 04/1999
- Stipendien des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) und der Stevenson Foundation in Glasgow für das Studienjahr in Edinburgh

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Groner in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Manuel Grez und im DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Erhard Seifried angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Erhard Seifried möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas, seine fachübergreifende Betreuung, seine wertvollen Anregungen und großzügige finanzielle Unterstützung danken.

Herrn Prof. Bernd Ludwig danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität.

Herrn Dr. Manuel Grez danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme der Betreuung im Georg-Speyer-Haus. Seine fachliche Unterstützung und seine tägliche Diskussionsbereitschaft waren für die Durchführung dieser Arbeit unverzichtbar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Torsten Tonn für die gute fachliche und persönliche Betreuung und Zusammenarbeit. Die Diskussionen auch weit über die Hämophilie hinaus, seine kreativen Ideen und seine konstruktive Kritik habe ich sehr geschätzt!

Herrn Dr. Sven Becker danke ich für die gute Kooperation und für die vielen Gespräche über den Alltag im Labor und das Leben an sich.

Herrn Dr. Robert Oostendorp, Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler und Christiane Mildner-Rihm danke ich für wertvolle „Starthilfe“ und die Überlassung von Zellen und Protokollen bei der Kultur von Endothelprogenitorzellen. Dr. Robert Oostendorp sei zudem gedankt für die Gastfreundlichkeit im Labor im Klinikum rechts der Isar in München.

Herrn Prof. Dr. Thierry VandenDriessche und Frau Prof. Dr. Marinee Chuah danke ich für die vielen praktischen Ratschläge und fachlichen Diskussionen während des einwöchigen Aufenthaltes in ihrem Labor im Zentrum für Transgentechnologie und Gentherapie in Leuven (Belgien).

Frau PD Dr. Michaela Scherr danke ich für die Möglichkeit, eine Woche in ihrem Labor an der Medizinischen Hochschule Hannover zu arbeiten, und für praktische Ratschläge und interessante Gespräche.

Frau Dr. Marie Follo am Zentrum für Klinische Forschung der Universität Freiburg danke ich für ihre Hilfe bei der Sortierung der transduzierten hämatopoetischen Zelllinien.

Frau Dr. Katja Lützenkirchen und Herrn Dr. Stefan Stein danke ich für viele Gespräche, Tips und praktische Hilfe, die im Laboralltag überaus wichtig waren.

Allen Kolleginnen und Kollegen der AG Grez und der anderen AGs des Georg-Speyer-Hauses sei für die gute Zusammenarbeit und die hervorragende Arbeitsatmosphäre herzlich gedankt. Besonders zu Dank verpflichtet bin ich Silke Schüle, Dr. Daniela Hildebrand, Hana Kunkel, Kristin Junker, Till Wenger & Anne Gaußmann für ihre Freundschaft, ihren Humor und für ihre Motivation bei der einen oder anderen Flasche Sekt.

Ganz besonders möchte ich den Leuten danken, die mich während der letzten Jahre unterstützt und manchmal auch ertragen haben: meinen Eltern und meinem Bruder sowie Marion Müller, Manfred Riepe, Birgit Roschy, Karolina Burghardt, Daniel Poso und last but definitely not least meinen TLPs Silke, Kevin & Renilla...

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Frankfurt am Main, den 01.04.2003

.....

Christian Herder