

Entwicklung einer adaptiven Immuntherapie auf Basis
gentechnisch veränderter Spender T-Zellen für
pädiatrische Leukämiepatienten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt am Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main



von
Kristina Christ, geb. Junker
aus Marburg/Lahn

Frankfurt am Main, 2002
(DF1)

Vom Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Dingermann

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Klingebiel

Datum der Disputation: _____

Meinen Eltern

Die Wissenschaft - richtig verstanden - heilt Menschen von ihrem unangebrachten
Stolz, denn sie zeigt ihnen ihre Grenzen (Albert Schweitzer)

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	1
<u>1 EINLEITUNG</u>	1
1.1 KREBSERKRANKUNGEN BEI KINDERN	1
1.2 LEUKÄMIEN IM KINDESALTER	2
1.3 THERAPIE AKUTER LEUKÄMIEN IM KINDESALTER	6
1.3.1 CHEMOTHERAPIE	6
1.3.2 STAMMZELLTRANSPLANTATION	7
1.3.2.1 Die allogene Transplantation	9
1.3.2.2 Die autologe Transplantation	10
1.4 IMMUNOLOGISCHE TRANSPLANTATREAKTIONEN	10
1.4.1 T-LYMPHOZYTEN	10
1.4.2 GRAFT-VERSUS-HOST ERKRANKUNG (GVHD)	12
1.4.3 GRAFT-VERSUS-LEUKÄMIE EFFEKT (GVL)	14
1.5 NEUERE THERAPEUTISCHE ANSÄTZE	15
1.5.1 INFUSION VON DONOR T-LYMPHOZYTEN (ADAPTIVE IMMUNOTHERAPIE)	16
1.6 METHODEN DES GENTRANSFERS	18
1.6.1 VIRALE VEKTORSYSTEME	18
1.6.1.1 Retrovirale Vektoren	19
1.6.1.2 Der retrovirale Lebenszyklus	19
1.6.1.3 Die Entwicklung oncoretroviraler Vektoren	21
1.6.2 T-ZELLEN ALS <i>TARGET</i> FÜR DEN RETROVIRALEN GENTRANSFER	23
1.6.2.1 Δ LNCFR als Selektionsmarker	24
1.6.2.2 Das humane tCD34-Molekül als Selektionsmarker	25
1.7 DIE SUIZIDSTRATEGIE	27
1.7.1 DAS HSV-TK/GCV SYSTEM	29
1.7.2 EINE ALTERNATIVE SUIZIDSTRATEGIE HUMANEN URSPRUNGS	31
1.7.3 DLI MIT HSV-TK EXPRIMIERENDEN T-ZELLEN	33
1.7.4 KLINISCHE STUDIEN MIT HSV-TK EXPRIMIERENDEN T-ZELLEN	34
1.8 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	37
<u>2 MATERIALIEN UND METHODEN</u>	38

2.1 MATERIALIEN	38
2.1.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	38
2.1.2 ZENTRIFUGEN	39
2.1.3 CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN; MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR	39
2.1.4 ENZYME	40
2.1.5 ANTIKÖRPER	41
2.1.5.1 Western Blot	41
2.1.5.2 FACS	41
2.1.5.3 T-Lymphozyten Aktivierung	41
2.1.6 MARKER UND GRÖßENSTANDARDS	42
2.1.7 PRIMER/OLIGONUKLEOTIDE	42
2.1.8 VEKTOREN	42
2.1.8.1 Klonierungsvektoren (lineare Darstellung)	42
2.1.8.2 Eukaryotische Expressionsvektoren	43
2.1.8.3 Retrovirale Vektoren	44
2.1.9 BAKTERIENSTÄMME (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)	44
2.1.10 MEDIEN FÜR DIE BAKTERIENKULTUR	45
2.1.10.1 5fach LB-Flüssigmedium	45
2.1.10.2 LB-Agar	45
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	45
2.2.1 ARBEITEN MIT <i>E. COLI</i> UND PRÄPARATION VON PLASMID- UND GENOMISCHER DNA	45
2.2.1.1 Transformation kompetenter Bakterienstämme	45
2.2.1.2 Plasmid Minipräparation durch alkalische Lyse (Miniprep)	46
2.2.1.3 Plasmid Maxipräparation über Caesiumchlorid-Dichtegradienten Zentrifugation	46
2.2.1.4 Plasmid Maxipräparation über JETstar Genomed-Säulen (Kombination aus modifizierter alkalischer Lyse und Anionen Austausch Harz)	48
2.2.1.5 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten eukaryotischen Zellen mit dem DNeasy Kit (Qiagen)	48
2.2.1.6 Isolierung von mRNA aus kultivierten Zellen (Oligotex, Qiagen)	49
2.2.1.7 Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode	50
2.2.2 ENZYMATISCHE MODIFIKATIONEN VON NUKLEINSÄUREN	50
2.2.2.1 Restriktion von Plasmid-DNA	50
2.2.2.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA	51
2.2.2.3 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden	51
2.2.2.4 Phenol-Chloroform Extraktion zur DNA Aufreinigung	52
2.2.2.5 Ligation von DNA	52
2.3 POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	53

2.3.1	AMPLIFIZIERUNG VON DNA-SEQUENZEN DURCH PCR	53
2.3.2	MUTAGENESE-PCR	54
2.3.3	RT-PCR	55
2.3.4	SEMIQUANTITATIVE PCR	57
2.3.5	HYBRIDISIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN	58
2.4	AGAROSEGELE	58
2.4.1	AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	58
2.4.1.1	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	59
2.4.1.2	Isolierung von DNA Fragmenten kleiner als 400 bp aus Agarosegelen (QIAquick ©Spin Kit, Qiagen)	59
2.4.2	BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION	60
2.5	ARBEITEN MIT PROTEINEN	60
2.5.1	HERSTELLUNG VON LYSATEN ADHÄRENTER ZELLEN ODER SUSPENSIONSZELLEN	60
2.5.2	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	61
2.5.3	WESTERN BLOT	62
2.5.3.1	Anreicherung von Proteinen durch Immunpräzipitation	62
2.5.4	DETEKTION DER PROTEINE	63
2.6	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	63
2.6.1	KULTIVIERUNG HUMANER UND MURINER ZELLINIEN	63
2.6.2	ZELLINIEN	64
2.6.2.1	Adhärente Zelllinien	64
2.6.2.1.1	293T	64
2.6.2.1.2	Phoenix gp	65
2.6.2.1.3	PG13	65
2.6.2.2	Suspensions-Zelllinien	66
2.6.2.2.1	HUT 78	66
2.6.2.2.2	Jurkat	66
2.6.2.2.3	WERI-RB01	66
2.6.3	KULTIVIERUNG VON PRIMÄREN HUMANEN T LYMPHOZYTEN	67
2.6.3.1	Isolierung von humanen primären T-Lymphozyten	67
2.6.3.2	Kultivierung humaner primärer T-Lymphozyten	68
2.6.4	TRANSIENTE KALZIUMPHOSPHAT-TRANSFEKTION VON PHOENIX GP ZELLEN ZUR PRODUKTION VON VIRUSÜBERSTAND	68
2.6.5	TRANSDUKTION HUMANER T-LYMPHOZYTEN	70
2.6.5.1	Transduktion humaner T-Zelllinien	70
2.6.5.2	Transduktion humaner primärer T-Lymphozyten	70
2.6.6	TITERBESTIMMUNG AUF 293T-ZELLEN MITTELS FACS-ANALYSE	71

2.6.7	FACS ANALYSEN	71
2.6.7.1	FACS-Markierung von transfizierten oder transduzierten Zellen	71
2.6.7.2	Annexin Färbung (Bestimmung apoptotischer Zellen)	72
2.6.7.3	PI Färbung (Trennung von lebenden und toten Zellen)	73
2.6.7.4	Zytotoxizitäts-Test (Kinderklinik)	73
2.6.8	IMMUNOMAGNETISCHE SEPARATION TRANSDUZIERTER ZELLEN	73
2.6.9	SENSITIVITÄTS-TESTUNGEN (GCV, AP20187)	75
2.6.9.1	GCV/AP20187 Tests	75
2.6.9.2	MTS Test	76
3	ERGEBNISSE	77
3.1	RETROVIRALE SELEKTIONS/SUIZID-FUSIONSKONSTRUKTE ZUR TRANSDUKTION VON HUMANEN PRIMÄREN T-ZELLEN	77
3.2	KONSTRUKTION DER RETROVIRALEN VEKTOREN	77
3.2.1	ENTWICKLUNG DES VEKTORS AUF BASIS DES tCD34/HSV-TK39 FUSIONSPROTEINS	77
3.2.1.1	Konstruktion eines SFFV-basierten HSV-tk39 exprimierenden Kontroll-Vektors: SXtk39	77
3.2.1.2	Eliminierung von SXtk39-transduzierten Jurkat-Zellen durch GCV-Gabe	78
3.2.1.3	Konstruktion eines retroviralen Vektors mit einem tCD34/tk39 Fusionsgen: SHXtk39	80
3.2.1.4	Funktionalitätsanalyse des SHXtk39 Fusionsvektors.	83
3.2.2	OPTIMIERUNG DES RETROVIRALEN FUSIONSVEKTORS	85
3.2.2.1	Veränderung des retroviralen Vektorgerüsts	85
3.2.2.2	Transduktion, Selektion und Funktionalität des MtCD34tk39w-Vektors in T-Zelllinien.	87
3.2.2.3	Eliminierung der kryptischen Spleiß-Donor (<i>sd</i>) Sequenz des <i>HSV-tk39</i> Gens	91
3.2.3	ENTWICKLUNG DES DED BASIERTEN RETROVIRALEN SUIZID-VEKTORS	95
3.2.3.1	Konstruktion des Fusionsgens ΔLNGFR/Fv Fv/DED in einem retroviralen Vektor	96
3.2.3.2	Analyse der Funktionalität des DED-Suizidproteins in T-Zelllinien	99
3.3	ANALYSEN BEIDER VEKTOREN IN HUMANEN PRIMÄREN T-ZELLEN	101
3.3.1	PROTEINCHEMISCHE ANALYSEN DER EXPRESSION DER FUSIONSPROTEINE NACH TRANSDUKTION UND SELEKTION VON PRIMÄREN HUMANEN T-ZELLEN	103
3.3.1.1	Das tCD34/HSV-tk39 Fusionsprotein	103
3.3.1.2	Das ΔLNGFR/Fv Fv/DED Fusionsprotein	104
3.3.2	UNTERSUCHUNGEN DER SPEZIFISCHEN INDUKTION DES ZELLTODS IN MtCD34TK39MW UND MNFV FvDED TRANSDUZIERTEN UND SELEKTIONIERTEN PRIM ÄREN T-ZELLEN	105

3.3.2.1	Apoptose Induktion durch GCV	106
3.3.2.2	Apoptose-Induktion durch AP20187	107
3.4	VERGLEICHENDE FUNKTIONELLE ANALYSE DER BEIDEN SUIZIDELEMENTE: HSV-TK39/GCV UND DED/AP20187	107
3.4.1	BESTIMMUNG DER ANZAHL DER INTEGRIERTEN PROVIRALEN KOPIEN IN TRANSDUZIERTEN UND SELEKTIONIERTEN PRIMÄREN T-ZELLEN	108
3.4.1.1	Der MtCD34tk39mw Vektor	108
3.4.1.2	Der MNFv FvDED Vektor	110
3.4.2	DIE VERGLEICHENDEN FUNKTIONELLE ANALYSE	112
3.5	MÖGLICHKEIT ZUR OPTIMIERUNG DER SUIZID-AKTIVITÄT	114
3.6	EINFLUSS VERSCHIEDENER VIROSTATIKA AUF HSV-TK39-TRANSDUZIERTE UND NICHT-TRANSDUZIERTE T-ZELLEN	117
3.7	TESTUNG DER ALLOREAKTIVITÄT DER TRANSDUZIERTEN UND SELEKTIONIERTEN PRIMÄREN T-ZELLEN GEGENÜBER LEUKÄMISCHEN BLASTEN	119
3.8	OPTIMIERUNGEN DES MtCD34tk39mw VEKTORS IM HINBLICK AUF EINE KLINISCHE ANWENDUNG	120
3.8.1	ELIMINIERUNG DES WPR-ELEMENTS	120
3.8.2	ANALYSE DER EXPRESSION DES TRANSGENS NACH MtCD34tk39M TRANSDUKTION	121
3.8.3	ANALYSEN DER AKTIVITÄT DES HSV-TK39 PROTEINS NACH ELIMINIERUNG DER WPRE-SEQUENZ	122
4.	<u>DISKUSSION</u>	124
4.1	DIE SUIZID-STRATEGIE ZUR DEPLETION VON SPENDER T-ZELLEN (IN VIVO INFOLGE EINER GVHD-ENTWICKLUNG)	125
4.1.1	DER tCD34/HSV-TK39 RETROVIRALE FUSIONSVEKTOR	125
4.1.1.1	Die korrekte Expression des tCD34-Moleküls im Kontext des Fusionsproteins	126
4.1.1.2	Die GCV-spezifische Eliminierung tCD34/HSV-tk39 exprimierender Zellen	127
4.1.1.3	Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Effizienz des Fusionsvektors	128
4.1.1.4	Die Funktionalität des optimierten tCD34/HSV-tk39-Fusionsvektors in humanen primären T-Zellen	131
4.1.1.5	Potentielle Limitierungen des tCD34/HSV-tk39 Vektors	133
4.1.2	DER ΔLNGFR/Fv Fv/DED RETROVIRALE VEKTOR	135
4.1.2.1	Induktion der Apoptose durch kontrollierte Dimerisierung der DED in transduzierten Zellen	135
4.1.2.2	Einschränkende Faktoren der DED-Apoptose-Induktion	136

4.1.3	DIE KONTROLLIERTE INDUKTION DES ZELLTODS STEHT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT	138
4.1.4	VERÄNDERUNG DER ALLOREAKTIVITÄT VON T-ZELLEN DURCH <i>EX VIVO</i> KULTIVIERUNG UND DEN TRANSDUKTIONS/SELEKTIONSPROZESS	139
4.1.4.1	Auswirkungen von <i>ex vivo</i> Kultivierung und Transduktionsprozess auf die Alloreaktivität von T-Zellen	139
4.1.4.2	Der Transduktionsprozess <i>per se</i> beeinflusst die Alloreaktivität von T-Zellen gegenüber leukämischen Blasten nicht	140
4.1.4.3	Lentivirale Vektoren zur Transduktion von T-Zellen: eine minimale Aktivierung der ruhenden Zellen ist ausreichend	141
4.2	WEITERE MÖGLICHKEITEN ZUR ELIMINIERUNG DES GVHD-RISIKOS IM KONTEXT EINER DLI	142
4.3	RETROVIRAL TRANSDUZIERT T-ZELLEN IM AKTUELLEN ZEITGESCHEHEN	143
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>I</u>
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
7.	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>XVIII</u>
	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>XXIII</u>

1 Einleitung

Der Begriff „Krebs“ ist eine allgemeine Bezeichnung für alle malignen Erkrankungen, die aufgrund der abnormen Vergrößerung von Geweben durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen in der Bildung von sogenannten Neoplasien resultieren. Maligne Erkrankungen sind zum Großteil auf Veränderungen der Gene zurückzuführen (Bishop 1991). Dabei scheint eine recht geringe Anzahl kritischer Veränderungen die Grundlage für die Entwicklung von Krebszellen zu sein (Evan und Vousden 2001). Das zunehmende Verständnis und die Identifizierung der zugrundeliegenden molekularen Veränderungen werden für die Entwicklung neuer Therapien genutzt.

1.1 Krebserkrankungen bei Kindern

Maligne Erkrankungen sind laut aktuellen Statistiken in Deutschland die zweithäufigste Todesursache bei Kindern.

Insgesamt gesehen sind Krebserkrankungen im Kindesalter jedoch eher selten. Jährlich werden in Deutschland etwa 1.800 maligne Neuerkrankungen bei Kindern registriert. Bis zu einem Alter von 15 Jahren liegt die jährliche Inzidenzrate bei durchschnittlich 14 von 100.000 Kindern, wobei im Säuglingsalter ein Erkrankungsgipfel zu verzeichnen ist (ca. 23 von 100.000 Kindern) und bis zum 5ten Lebensjahr eine kontinuierliche Abnahme der Inzidenz erfolgt. Übergreifend betrachtet erkranken Jungen häufiger an Malignomen als Mädchen. Laut Informationen des deutschen Kinderkrebsregisters – ermittelt aus den Jahren 1991-2000 – entfallen 33,8 % der malignen Erkrankungen bei Kindern auf Leukämien, 20 % auf ZNS-Tumore, 12,7 % auf Lymphome, 8,7 % auf Tumore des sympathischen Nervensystems (Neuroblastom), 6,4 % auf Weichteiltumore, 6,2 % auf Nierentumore (Nephroblastom), 4,6 % auf Knochentumore, 3,5 % auf Keimzelltumore und 4,1 % auf sonstige Tumore (Kinderkrebsregister Mainz, Bericht 2000). Dabei bestehen für die einzelnen Malignome unterschiedliche altersspezifische Inzidenzen (Neuroblastome treten typischerweise eher im Säuglings- und Kleinkindalter auf). Die durchschnittliche Überlebensrate der an einem Malignom erkrankten Kinder liegt 3 Jahre nach Diagnosestellung bei 78 % und 10 Jahre später bei 70 %. In Abhängigkeit von der malignen Erkrankung weichen die tatsächlichen Überlebensraten jedoch teilweise beträchtlich von diesen statistisch ermittelten Durchschnittswerten ab (Kinderkrebsregister Mainz, Bericht 2000).

1.2 Leukämien im Kindesalter

Leukämien stellen bei Kindern den größten Anteil der malignen Erkrankungen dar.

Eine leukämische Erkrankung definiert sich durch die abnorme Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen eines leukozytären Zellstamms, die dazu führt, dass die normale Hämatopoese im Knochenmark zurückgedrängt wird und die leukämischen Zellen Blut, Knochenmark und verschiedene Organe infiltrieren. Der Übertritt der leukämischen Zellen in das periphere Blut und die Infiltration anderer Organe tritt zumeist erst dann auf, wenn mehr als 60 % der Knochenmarkszellen leukämische Blasten sind. Nähert sich die Zahl der leukämischen Zellen 10^{12} , so kommt es zur Entwicklung klinischer Symptome.

In Abhängigkeit vom klinischen Verlauf erfolgt eine Unterteilung der Leukämien in chronische und akute Formen, die anhand des hauptsächlich beteiligten Zelltyps, bzw. der jeweiligen Ursprungszelle in lymphatische Leukämien, myeloische Leukämien und zusätzlich noch die sogenannten akuten nicht-lymphatischen Leukämien (ANLL), die alle anderen nicht-lymphatischen Formen einschließt, unterteilt werden (Tab.1). Die Begriffe AML und ANLL werden dabei häufig synonym verwendet.

Akute Leukämien

- akute myeloische Leukämie (AML): M₀-M₇
- akute lymphatische Leukämie (ALL): L₁, L₂, L₃, B-Vorläufer-ALL, B-ALL, T-ALL
- akute nicht-lymphatische Leukämie (ANLL)

Chronische Leukämien

- chronisch myeloische Leukämie (CML)
- chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Andere chronische Leukämien: Haarzell-Leukämie, prolymphozytäre Leukämie, Lymphom/Leukämie Syndrom

Tab. 1: Klassifizierung der Leukämien. M₀-M₇ und L₁-L₃ Unterteilung der Leukämien nach den Kriterien der FAB (*French-American-British*) cooperative group. (nach Hoffbrand 1997).

Betrachtet man die lymphatischen Leukämie-Diagnosen aus dem Blickwinkel der 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit so wird eine stetige Verbesserung der Prognose deutlich (1981-1985: 69 % auf 1996-2000: 82 %). Bei ALL-Patienten verbesserte sich die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 1981-1985 bis zum letzten 5-Jahres Zeitraum von 76 % auf 87 % und das Langzeitüberleben (15 Jahre) von 69 % auf 81 %. Im Falle der AML war eine Verbesserung der 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 38 % auf 58 % zu verzeichnen und in Bezug

auf das Langzeitüberleben wurde eine beachtliche Steigerung von 35 % auf 56 % erzielt.

Weitere morphologische, zytochemische, immunphänotypische, zyto- und molekulargenetische Befunde ermöglichen eine detailliertere Einteilung der Leukämie-Erkrankungen. Die momentane Risikostratifizierung der ALL-Erkrankungen in Standard-Risiko (SR), Mittel-Risiko (MR) und Hoch-Risiko (HR) wird hauptsächlich an der *in vivo* Sensitivität der individuellen Leukämie gegenüber der Prednison-Vorphase und der Induktionstherapie sowie anhand der Molekulargenetik (Nachweis von Chromosomentranslokationen wie z.B. TEL/AML-1, MLL/AF4 und BCR/ABL) vorgenommen. Zusätzlich ermöglicht der molekulargenetische Nachweis minimaler Resterkrankung (MRD) zu definierten, aussagekräftigen Zeitpunkten, die in verschiedenen Studien festgelegt wurden (z. B. an Tag 33 von Protokoll I (Prednison-Protokoll), eine differenzierte Beschreibung des Rezidivrisikos der Patienten (ALL-BFM 2000).

Im Kindesalter überwiegen mit einem Anteil von 80 % deutlich die akuten lymphatischen Leukämien (ALL), gefolgt von den akuten myeloischen Leukämien (AML) mit einem Anteil von ca. 18 %. Chronisch myeloische Leukämien (CML) kommen nur in 2 % der Fälle vor, während chronisch lymphatische Leukämien (CLL) im Kindesalter weitestgehend unbekannt sind. In Deutschland erkranken derzeit ca. 550 Kinder/Jahr an einer ALL. Die Inzidenz der ALL - bei Kindern unter 15 Jahren - liegt bei ca. 3,8 % pro Jahr. Im Mittel beträgt das Erkrankungsalter der ALL 4,7 Jahre mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr. Bei der AML liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 7,9 Jahren, wobei ein geringer Erkrankungsgipfel in den ersten beiden Lebensjahren sowie ein leichter Anstieg der Inzidenz ab dem 13. Lebensjahr zu beobachten ist (Kinderkrebsregister Mainz, 2000).

Leukämische Blasten (Abb.1) sind nicht mehr in der Lage normal zu differenzieren haben aber unbegrenztes Proliferations-Potential. Der Ursprung lymphatischer Leukämien ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf sehr frühe, kaum differenzierte Vorläuferzellen zurückzuführen.

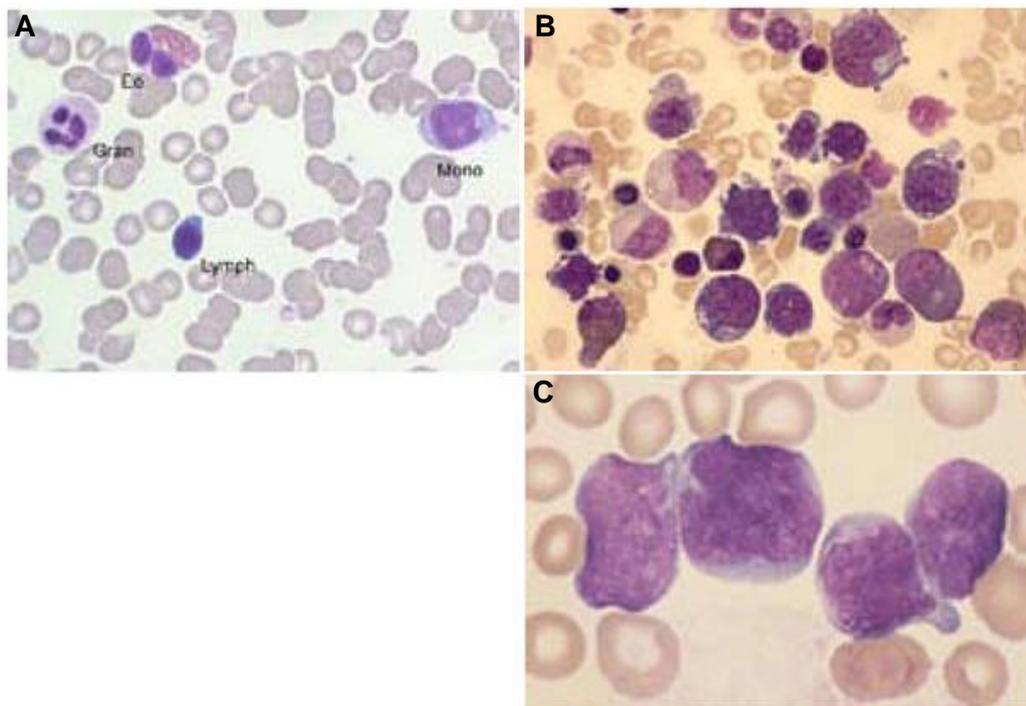


Abb. 1: Mikroskopische Blutbilder. (A) Normales Blutbild. Die kleinen grauen Zellen sind Erythrozyten, die anderen Zelltypen sind Unterformen der Leukozyten: Gran = Granulozyt; Eo = Eosinophil; Mono = Monozyt; Lymph = Lymphozyt. (B) Blutbild bei AML. Vorherrschend sind nicht-ausdifferenzierte weiße Blutkörperchen (violett), die in zu großen Mengen vorhanden sind. (C) Blutbild bei ALL. Neben den Erythrozyten sind Blastenzellen zu erkennen: sehr große, undifferenzierte Zellen (violett) mit viel Kern und wenig Zytoplasma, die im Verhältnis zu den Erythrozyten zu häufig auftreten. (nach <http://www.m-ww.de>)

Zytogenetische Studien leukämischer Zellen haben gezeigt, dass chromosomale Aberrationen in 70-80 % aller Leukämiefälle bei Erwachsenen und Kindern vorkommen (Burmeister und Thiel 2001). Viele erscheinen nicht zufällig und sind z.T. mit bestimmten leukämischen Untergruppen assoziiert. Die chromosomalen Veränderungen sind numerischer und/oder struktureller Art. Numerische Veränderungen können entweder zu einem Verlust genetischer Masse in Form von Deletionen, Monosomien oder nicht-ausgeglichenen Translokationen führen und die daraus resultierenden Erkrankungen haben eine eher schlechte Prognose, die möglicherweise auf den Verlust von Tumorsuppressorgenen zurückzuführen ist (Groce 1987, Rowley 1998). Erkrankungen, die mit einer Zunahme genetischen Materials durch Trisomien/Polysomien assoziiert sind haben häufig deutlich bessere Prognosen. Es gibt verschiedene Mechanismen durch die chromosomale Translokationen zur Entwicklung von leukämischen Zellen führen können. Im Folgenden sind zwei genannt:

- Auftreten einer Bruchstelle in einem Gen (Intron), so dass der Leserahmen beibehalten wird und die Translokation in der Bildung eines chimären Proteins resultiert, das veränderte Funktionen ausübt.

- Auftreten einer Bruchstelle nahe eines zellulären Proto-Oncogens, das durch die Translokation de-reguliert wird, indem es unter die Kontrolle eines starken Promotors gelangt und konstitutiv exprimiert wird (Burmeister und Thiel 2001). Zumeist erfolgen solche Translokationen in lymphoiden Geweben (Rabbitts 1994).

In der folgenden Tabelle sind einige Fusionsgene, die durch Translokationen entstehen, aufgeführt (Tab. 2).

Molekulare Abnormalität	Translokation	Biochemischer Defekt	Assoziierte Charakteristika
AML1-ETO	t(8; 21) (q22;q22)	Transkription	AML, günstige Prognose
BCR-ABL (p210)	t(9;22)(q34,q11)	Signal-Transduktion	Myeloproliferation
Monosomie 7	mon(7)		AML, schlechte Prognose
MYH11/CBF β	inv(16)16		AML, günstige Prognose
MLL-CBP	t(11;16)(q23;p13)	Transkription	Kleinkinder
PML-RAR α	t(15;17)(q22;q21)	Retinsäure Antwort	AML, günstige Prognose
TEL-AML1	t(12;21) kryptisch	Transkription	ALL-Rezidiv, günstige Prognose
BCR-ABL (p185)	t(9;22)(q34;q11)	Signal Transduktion	schlechte Prognose

Tab. 2: Zelluläre Genotypen verschiedener Leukämieformen. Es ist lediglich ein Bruchteil der bekannten an Leukämien beteiligten chromosomalen Veränderungen aufgeführt. Detailliertere Informationen hierzu sind in folgenden Referenzen zu finden (Kersey 1997; Strout 1997; Martinez-Climent 1997).

60 % aller bisher analysierten chromosomalen Abnormalitäten stehen mit leukämischen Erkrankungen in Zusammenhang (Faderl 1998). Bereits 1978 wurde festgestellt, dass anhand dieser zytogenetischen Veränderungen wichtige prognostische Informationen bezüglich der Erkrankung getroffen werden können (Secker-Walker 1978).

Neben Leukämien, die durch Veränderungen auf molekularer Ebene in normalen Zellen entstehen, gibt es allerdings auch noch eine ebenso beträchtliche Anzahl maligner Erkrankungen, die auf sogenannte oncogene Viren zurückzuführen sind (EBV, HHV-8 und HTLV-I), die in den Regionen Europas und Nord-Amerikas allerdings nur eine verschwindend geringe Rolle spielen (Epstein und Achong 1964; Takatsuki 1977; Mikala 1999).

1.3 Therapie akuter Leukämien im Kindesalter

1.3.1 Chemotherapie

Im Rahmen kontrollierter Therapiestudien werden Behandlungen von akuten Leukämien im Kindesalter risikoadaptiert mit geprüften Polychemotherapieelementen durchgeführt. Vorrangiges Ziel dabei ist die komplette Eliminierung der Leukämiezellen sowie das Vermeiden einer Resistenzentwicklung durch frühzeitige Therapieintensivierung. Es existieren spezielle Therapieprotokolle, die sich in den einzusetzenden Zytostatika unterscheiden aber einem einheitlichen Behandlungsschema entsprechen:

- Induktionstherapie mit dem Ziel der kompletten Remission
- Konsolidierungstherapie, bzw. Frühintensivierung, ZNS-Prophylaxe
- Reinduktionstherapie, bzw. Reintensivierung
- Remissions-Erhaltungstherapie als Langzeittherapie

Im Rahmen der ALL-Behandlung analog dem ALL-BFM Protokoll werden die erkrankten Kinder zunächst in drei Risikogruppen (SR, MR und HR, 1.2) unterteilt, wobei die Einteilung anhand definierter Merkmale erfolgt:

- Ansprechen auf Prednison (Therapieantwort an Tag 8)
- Remission an Tag 33 von Protokoll I (Prednison-Protokoll)
- Minimale Resterkrankung (MRD) an Tag 33 von Protokoll I und Tag 1 der Konsolidierungs-phase
- Genetische Risikofaktoren

Weitere Risikomerkmale, wie Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose, Leukozytenzahl bei Diagnose sowie immunologischer Phänotyp der ALL, die in früheren Studien zur Einteilung der Risikogruppen herangezogen wurden, werden in der aktuellen Studie (ALL-BFM 2000) nicht mehr zur Unterteilung eingesetzt.

Bereits zu Beginn der 50er Jahre wurden die ersten Erfolge in der Behandlung von pädiatrischen Krebsformen durch Einsatz von sog. Chemotherapeutika erzielt (Faber 1948). Die Grundidee bestand darin sich Substanzen zunutze zu machen, die antagonistisch zu wichtigen Metaboliten in den Zellen (z.B. Folsäure) agierten. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene andere Substanzgruppen entdeckt (Glucocortikoide) bzw. in der neueren Zeit wurden chemische Agentien entwickelt (Methotrexat, Vincristine), deren Anwendung in der Induktion einer (temporären) Remission resultierten. Zu Beginn wurden Chemotherapien mit einer einzelnen

Substanz durchgeführt, aber eine Kombination verschiedener Zytostatika resultierte in einer deutlich höheren Anzahl an Remissionen (Kersey 1997).

Die bei pädiatrischen Patienten vorwiegend zum Einsatz kommenden chemotherapeutischen Agentien umfassen Zytostatika, Kortikosteroide und Enzympräparate, die zytostatisch wirken, wie z. B. Prednison, Vincristin (Spindelgift), Anthrazykline, wie Daunorubicin (DNR, DNA-bindend), Asparaginase (Asparagin-Entzug), Methotrexat (MTX, Folsäureantagonist, Hemmung der Pyrimidin- oder Purinsynthese), Cyclophosphamid (DNA-Kreuzverbindungen), Cytarabin (ARA-C), Fludarabin (Nukleotidanalogue) sowie 6-Mercaptopurin (MP) und 6-Thioguanin (Purinantagonisten). MTX und MP kommen dabei hauptsächlich im Rahmen der Konsolidierungs- und der abschließenden Erhaltungstherapie zum Einsatz, während die anderen Substanzen vorwiegend in der Induktions- und Reinduktionstherapie zum Einsatz kommen.

1.3.2 Stammzelltransplantation

Im Vergleich zu Ersterkrankungen sind die Heilungsaussichten bei Kindern mit Rezidiven deutlich ungünstiger. Die Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben liegt bei etwa 85 % (ALL-BFM 2000, berücksichtigt sind Patienten, die bis 6/99 in die ALL-BFM 95 Studie aufgenommen wurden). Zu den geprüften Therapiestrategien zählt neben Polychemotherapie und Dauerchemotherapie die Strahlentherapie und die Stammzelltransplantation (SZT). Seit 1983 wurde zunehmend die SZT zur Erhaltung der Remission durchgeführt. Die allo-SZT vermittelt ein besseres Rezidiv-freies Überleben als die Chemo/Radiotherapie alleine, war aber zu Beginn mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden, so dass diese Art der Therapie nur bei Kindern mit besonders ungünstigen Prognosen zum Einsatz kam (Borgmann 1997). In der Regel wurden SZT von HLA-identischen Geschwistern (*matched family donor*, MFD, Tab. 3) bei Patienten mit Knochemarksrezidiv durchgeführt (Dopfer 1991). Seit Beginn der 90er Jahre stand zunehmend die Möglichkeit der SZT von HLA-identischen fremden Spendern (*matched unrelated donor*, MUD, Tab. 3) zur Verfügung, die aufgrund der gegenüber der SZT vom verwandten Spender deutlich erhöhten Mortalität nur bei Patienten mit extrem ungünstiger Prognose eingesetzt wurde. Im Konzept der Studie ALL-REZ BFM 95/96 ist die Indikation für eine allo SZT durch die Risikogruppierung z.T. gut definiert. Aufgrund bekannter prognostischer Faktoren wie Zeitpunkt, Ort und Immunphänotyp des Rezidivs erfolgt eine Unterteilung in die Risikogruppen S1 (späte, isoliert-extramedulläre Rezidive), S2 (frühe und sehr frühe, isoliert-extramedulläre Rezidive; späte und frühe, kombinierte Rezidive sowie späte, isoliert-intramedulläre

non-T-Rezidive), S3 (frühe, isoliert-intramedulläre non-T-Rezidive) und S4 (sehr frühe, isoliert-intramedulläre Rezidive; intra- oder extramedulläre T-ALL-Rezidive; ALL-REZ BFM 95/96). Die Hochrisikogruppen S3 und S4 profitieren von der allo SZT, während diese für die Risikogruppe S1 keine Bedeutung hat.

Auch für ALL-Ersterkrankungen besteht im Falle einer HR-Untergruppe und bei besonders schlechter Prognose (20 %-30 %) eine Indikation zur SZT.

Bei Kindern mit AML in erster Remission ist die SZT international Gegenstand der Diskussion. Neben der SZT von einem passenden nicht-verwandten Spender (*MUD*) werden Kinder mit ALL oder AML ohne passenden Fremdspender oder mit besonders ungünstiger Prognose auch haploident von einem Elternteil (nicht-passender Familienspender (*MMFD*)) transplantiert. In Einzelfällen kommen auch autologe SZT zum Einsatz, z. B. bei Patienten mit isoliertem ZNS-Rezidiv.

Nachdem die Patienten entsprechend konditioniert wurden (Chemo/Radiotherapie) und sämtliche Stammzellen sowie alle aus ihnen differenzierten Zellen, einschließlich der hämatopoetischen, lymphatischen und Histiozyten/Makrophagen-Systeme im Knochenmark eliminiert wurden, kann das „hämatopoetische System“ durch Knochenmarkszellen eines Spenders rekonstituiert werden (Tab. 3).

Allogen	<ul style="list-style-type: none"> - HLA-kompatible Geschwister (<i>matched related</i>) - HLA-kompatible andere Verwandte - HLA-kompatible, nicht-verwandte Freiwillige (<i>matched unrelated</i>) - HLA-nonidentical, haploident verwandt, Eltern (<i>mismatched related</i>)
Syngen	<ul style="list-style-type: none"> - eineiiger Zwilling
Autolog	<ul style="list-style-type: none"> - der Patient selbst

Tab. 3: Potentielle Spendermöglichkeiten für eine SZT. (nach Hoffbrand 1997)

Dem Spender wird das Knochenmark bevorzugt aus dem Beckenkamm entnommen. Seit 1980 werden zunehmend periphere Blut-Stammzellen (PBSC) durch Wachstumsfaktoren (G-CSF) mobilisiert und als alternative Quelle zum Knochenmark für hämatopoetische Zellen für allogene Transplantationen verwendet (Körbling 1996; Fliedner 1998). Die PBSC's werden 4-5 Tage nach Mobilisierung über eine Leukapherese aus dem peripheren Blut gewonnen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass alle Subpopulationen von Vorläuferzellen in mobilisierten PBSC-Produkten vorhanden sind, ebenso wie sämtliche Komponenten, die für das Anwachsen des Transplantats nötig sind (Harada 1996; Glass 1997). Des weiteren enthalten die

peripheren Blut Allo-Transplantate bis zu 2fach höhere Zahlen an CD34+ Zellen, als Knochenmarks-Transplantate (Dreger 1994). Erste Experimente in identischen Zwillingen (syngenes Transplantat) zeigten eine schnellere und anhaltende Rekonstitution der Hämatopoese im Vergleich zu früheren Transplantationen mit Knochenmark (Weaver 1993). Ähnliche Ergebnisse wurden mit allo PBSCT's erzielt (Körbling 1995). Zusätzlich enthalten PBSC-Transplantate ca. zehnmal mehr T-Zellen als Knochenmarks-Transplantate (Dreger 1994). Neben des potentiellen Risikos einer GVHD-Entwicklung durch die Anwesenheit einer hohen Anzahl an Spender-Immunzellen, spielt dieser Aspekt jedoch auch eine wichtige Rolle bezüglich des GVL-Effekts (1.4.3) und der Rekonstitution des Immunsystems. Möglicherweise resultiert eine PBSC-Transplantation nicht nur in einer schnelleren Rekonstitution der Hämatopoese, sondern auch des Immunsystems (Beelen 1997). Nach der Leukapherese folgt in vielen Fällen eine immunomagnetische Selektion der CD34+ Stammzellen (Lang 1999, Handgretinger 2002).

1.3.2.1 Die allogene Transplantation

Um die Wahrscheinlichkeit einer potentiellen Abstoßungsreaktion gegen das allo-Transplantat und eine mögliche GVHD (*graft-versus-host disease*) so gering wie möglich zu halten, sollten die HLA (*human leukocyte antigen*) Klasse I und II Antigene des Empfängers und des Spenders identisch sein. Die HLA-Antigene, die durch eine Serie eng benachbarter Gene auf dem Chromosom 6, den sogenannten *MHC*-Genen (*major histocompatibility complex*) kodiert werden, sind hochgradig polymorphe Moleküle der Zelloberfläche. Die drei Regionen Klasse I-III kodieren für unterschiedliche Antigene:

- Klasse I: HLA-A, -B, -C
- Klasse II: HLA-D Region (*DR*, *DP*, und *DQ* Gene)
- Klasse III: Komplementbestandteile, Tumornekrosefaktoren α und β

Die Antigene der Klasse I werden präferentiell auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert und interagieren mit CD8+ Lymphozyten, während die Klasse II Antigene auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert werden und mit CD4+ Lymphozyten interagieren (Hoffbrand 1997). Die HLA-Antigene werden mit serologischen Methoden (*MLR*, *mixed lymphocyte reaction*) oder mit molekularbiologischen Methoden (*Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus*) identifiziert. $\frac{1}{4}$ der Geschwister sind aufgrund der Vererbung voll HLA-kompatibel zueinander, obwohl durch Überkreuzungen während der Meiose die wirkliche Inzidenz niedriger liegt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein fremder, nicht verwandter Spender kompatibel ist beträgt etwa 1:30.000. Trotz vorangegangener

MLR-Analysen, in denen keine Reaktionen auftraten, kann es zu der Entwicklung einer GVHD kommen, die auf Inkompatibilitäten nicht untersuchter Histokompatibilitätssysteme, wie z. B. dem *minor histocompatibility complex* (mHAg) zurückzuführen ist. Im Rahmen einer allo SZT werden zwischen $2-4 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg Körpergewicht (allogen ident: $2-6 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg KG; haploident: $>10 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg KG) transplantiert.

1.3.2.2 Die autologe Transplantation

Im Falle einer autologen Transplantation werden die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) ebenfalls durch G-CSF Gabe mobilisiert und über eine Leukapherese aus dem Blut isoliert. Die Stammzellen werden entweder über eine immunomagnetische Selektion der CD34+ Zellen oder aber der CD133+ Zellen (Koehl 2002) angereichert. Die CD34-Selektion ist bereits eine gut etablierte Methode, um zum einen die HSZ aufzureinigen und zum anderen die verbliebenen leukämischen Zellen zu eliminieren (Handgretinger 1998). Die CD133-Selektion ermöglicht zusätzlich die Eliminierung CD34+ Tumorzellen. Bei einer autologen oder syngenen Transplantation werden ca. 2×10^6 CD34+ Zellen/kg KG transplantiert.

Nach der Transplantation zeigt der Patient häufig 8-14 Tage eine schwere Panzytopenie. Als erste Zeichen eines erfolgreichen Anwachsens des Transplantats sind Monozyten, dann Neutrophile im Blut nachzuweisen, gefolgt von einer signifikanten Zunahme der Thrombozyten. Natürliche Killerzellen (NK) sind unter den ersten vom Spender stammenden Lymphozyten, die nachzuweisen sind. Allmählich normalisiert sich der Zellgehalt des Knochenmarks, aber die Knochenmarkreserve bleibt für maximal 1 Jahre vermindert. Außerdem besteht für 3-12 Monate eine Abwehrschwäche, da sich das Immunsystem erst sehr langsam rekonstituiert. Der Gehalt an CD4+ Helfer T-Zellen ist sehr niedrig und das CD8+/CD4+ Verhältnis deutlich erhöht.

1.4 Immunologische Transplantatreaktionen

Im Folgenden soll lediglich auf zwei für die zugrunde liegende Arbeit wichtige Aspekte immunologischer Reaktionen in Folge einer Transplantation eingegangen werden, die hauptsächlich auf die Aktivität von Spender T-Zellen zurückzuführen sind.

1.4.1 T-Lymphozyten

Man unterscheidet zwei Formen der spezifischen Immunität:

- die B-Lymphozyten vermittelte „humorale“ Immunität (Antikörperproduktion gegen extrazelluläre Mikroorganismen und deren Toxine)
- die T-Lymphozyten vermittelte zelluläre Immunität (Abwehr gegen intrazelluläre Viren oder Bakterien durch intrazelluläres Abtöten oder Lyse der infizierten Zellen)

T-Zellen werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, die sowohl funktionell als auch phänotypisch verschieden sind. Die T-Helferzellen, auch CD4+ T-Zellen genannt, sind mit für die Koordination der Immunregulation verantwortlich. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Verstärkung der Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinen, die andere Leukozyten aktivieren um letztendlich die Infektion zu bekämpfen. Die zweite Untergruppe sind die sog. zytotoxischen (CTL) oder auch CD8+ T-Lymphozyten. Diese Zellen haben eine wichtige Aufgabe in der direkten Eliminierung von einigen Tumorzellen, viral-infizierten Zellen und manchmal auch in der Eliminierung von Parasiten. Außerdem spielen sie eine Rolle in der Herunter-Regulation der Immunantwort.

Besonders bei der Immunantwort auf Proteinantigene spielen die T-Lymphozyten eine zentrale Rolle. Dazu werden von Proteinantigenen stammende Peptidfragmente an Zelloberflächenproteine gebunden, die von den *MHC*-Genen kodiert werden. Man unterscheidet dort zum einen Peptide, die an Klasse I *MHC*-Moleküle binden und in der Regel von Proteinen stammen, die von der Zelle selbst synthetisiert werden (endogene Antigene). Diese werden dann an der Oberfläche von Antigen (Ag)-präsentierenden Zellen von CD8+ T-Zellen erkannt, die sofort eine Immunreaktion gegen die infizierten Zellen starten. Zum anderen werden Peptide von Proteinen aus der extrazellulären Umgebung (exogene Antigene) von *MHC* Klasse-II Molekülen präsentiert und in Folge von CD4+ Helfer T-Zellen erkannt. Diese Helferzellen werden sowohl für die Induktion der humoralen als auch der zellvermittelten Antwort benötigt. T-Zellen können somit fremde Peptidantigene nur erkennen, wenn sie auf der Zelloberfläche anderer Ag-präsentierender Zellen gebunden vorliegen.

Krebszellen zeigen gegenüber normalen Körperzellen veränderte Eigenschaften und bilden häufig auch andere Proteine (tumoreigene Antigene), die an *MHC*-Komplexe gebunden den T-Zellen präsentiert werden, so dass diese durchaus eine Abwehrreaktion gegen die Tumorpeptide starten könnten. Tumorzellen verfügen jedoch auch über verschiedene Möglichkeiten diesen Abwehrmechanismus des Körpers zu umgehen, indem sie z.B. die Antigene nur ungenügend exprimieren, so dass sie von den Immunzellen nicht erkannt werden.

1.4.2 Graft-versus-host Erkrankung (GVHD)

Eine GVHD entsteht dann, wenn vom Spender stammende immunkompetente T-Zellen genetisch verschiedene Zellen und Gewebe des Empfängers erkennen und reagieren und stellt somit den limitierenden Effekt einer KMT oder PBSCT dar (Ferrera 1991 und 1997). Häufigkeit und Vorkommen variieren in Abhängigkeit von dem Transplantat und Empfänger-spezifischen Faktoren, wie dem Alter, der Prophylaxe u.a. (Murphy und Blazar, 1999).

Trotzdem Spender und Empfänger bei *MUD*-Transplantationen nach Untersuchungen des HLA-Systems kompatibel sind, kann eine Disparität anderer Transplantationsantigene, wie z. B. des mHAg-Systems zu einer Unverträglichkeitsreaktion in Form einer GVHD führen. Es existieren zwei verschiedene Formen der GVHD:

- akute GVHD (aGVHD)
- chronische GVHD (cGVHD)

die sowohl eine unterschiedliche Kinetik, als auch verschiedene Pathologien aufweisen (Ferrera 1997; Parkman 1998).

Die aGVHD tritt innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf und betrifft vornehmlich Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber (Tab 4).

Stadium	Haut	Leber (Bilirubin mmol/l)	Darm (Diarrhoe l/d)
I	Ausschlag < 25 %	20-35	0,5-1,0
II	Ausschlag 25-50 %	35-80	1,0-1,5
III	Erythrodermie	80-150	1,5-2,5
IV	Bullae, Hautablösung	> 150	> 2,5; starke Schmerzen; Ileus

Tab. 4: Klinische Einteilung der aGVHD (Seattle-System). nach Hoffbrand 1997

Der Hautausschlag ist typischerweise im Gesicht, an den Handflächen, Fußsohlen und Ohren nachzuweisen. Die Diagnose wird in der Regel über eine Hautbiopsie gestellt in der anfänglich Einzel-Zellnekrosen in der Basalschicht der Epidermis und vereinzelt Lymphozyteninfiltrationen nachgewiesen werden können. Parallel dazu sind erhöhte Werte bestimmter Leberenzyme, wie Bilirubin oder alkalische Phosphatase nachzuweisen.

Eine cGVHD entwickelt sich zumeist aus einer aGVHD und tritt erst nach 100 Tagen auf. Neben den für die aGVHD beschriebenen Symptomen sind im Falle der cGVHD auch die Gelenke und andere Serosa-Oberflächen, wie Mundschleimhaut und die Tränendrüsen betroffen. Das Immunsystem ist gestört und das Infektionsrisiko deutlich erhöht. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die cGVHD in Kindern mit deutlich

geringerer Wahrscheinlichkeit auftritt als aGVHD oder als bei erwachsenen Patienten (Atkinson 1990; Carlens 1998). Eine ca. 27 %ige Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer cGVHD in Kindern wurde nachgewiesen (Zecca 2002).

Die Entwicklung einer GVHD ist ein Prozess, der sich aus vielen Einzelschritten zusammensetzt. Wie bereits erwähnt spielen die Spender T-Zellen eine zentrale Rolle in der Induktion des Prozesses: die T-Zellen erkennen „fremde“ Allo-Antigene auf den Zelloberflächen der Empfängergewebe oder –Zellen, werden aktiviert (Induktionsphase) und beginnen klonal zu expandieren (Expansionsphase). Als Folge sekretieren sie Zytokine („*cytokine-storm*“, Krenger 1997) und möglicherweise auch Chemokine (z.B. Makrophagen inflammatorisches Protein 1 α , Serody 1999) und rekrutieren dadurch andere immunologisch aktive Zelltypen, wie Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen u.a. (Rekrutierungsphase). Das Zusammenspiel dieser aktivierten Zellen resultiert letztlich in der Pathologie, die mit der GVHD assoziiert ist (Effektor-Phase, Abb. 2).

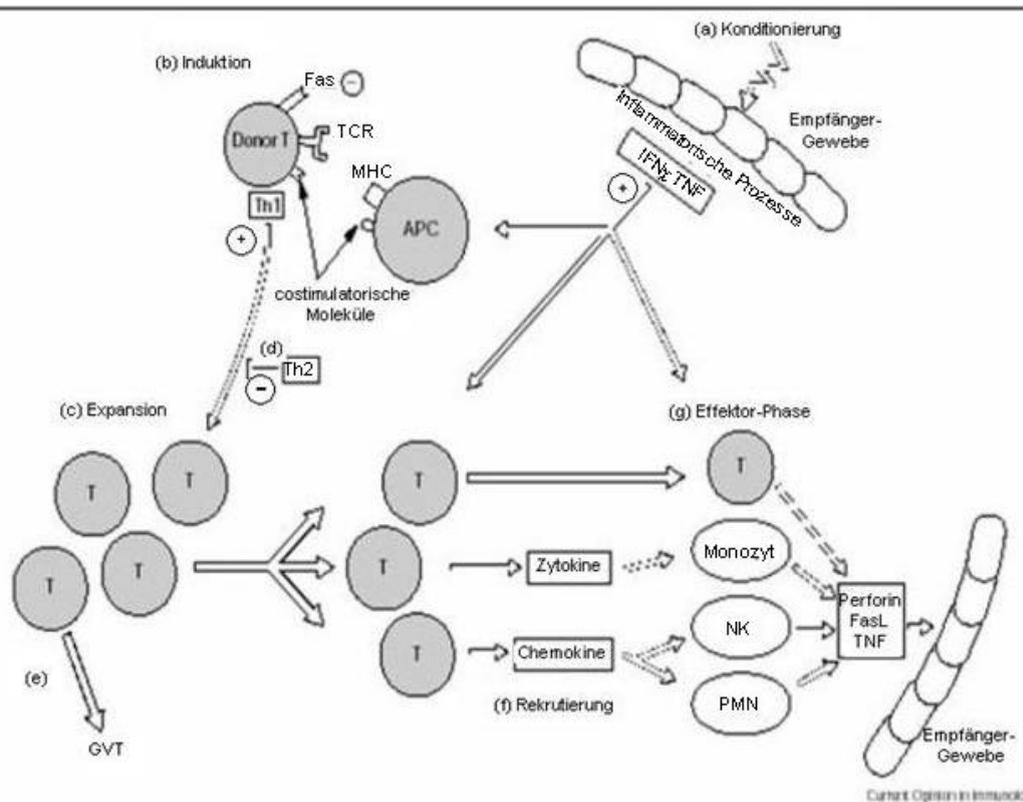


Abb. 2: Verschiedene Phasen in der Entwicklung einer aGVHD. +/- = positiver oder negativer Effekt auf die GVHD; (a) Während der Konditionierung des Empfängers werden Zytokine sekretiert, die jede Phase einer späteren GVHD verstärken können. (b) Während der Induktionsphase werden die Spender T-Zellen sensitiv gegenüber den Empfängerzellen. (c) Während der Th-1 Zytokin gesteuerten Expansionsphase können Th-2 Zytokine (d) die GVHD Entwicklung inhibieren. (e) Die expandierten Spender-Zellen können einen GVT-Effekt vermitteln oder (f) sekretieren Zytokine und Chemokine um andere Zellen zu rekrutieren → Pathologie der GVHD. (g) In der Effektorphase werden alle klassischen Effektormoleküle eingesetzt, die das Empfängergewebe attackieren können (FasL, Perforin und TNF). nach Murphy und Blazar, 1999.

Neben den Zellen selbst, spielen natürlich auch die sekretierten Zytokine eine wichtige Rolle in der GVHD-Entwicklung. Welche Zytokine welche Funktion in der GVHD ausüben wird bislang kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise, dass die Th-1 Zytokine (IL-2 und IFN- γ) kritisch für die Induktion einer GVHD sind, während die Th-2 Zytokine (IL-4 und IL-10) suppressiv wirken (Krenger 1997, Ellison 1998). Allerdings existieren ebenso konträre Daten, die zeigen, dass Th-1 Zytokine auch protektiv wirken können (Murphy 1998). Somit kann man lediglich sagen, dass Zytokine eine komplexe und duale Rolle in der GVHD-Entwicklung übernehmen.

Da mit den T-Zellen neben dem GVHD-Risiko, aber auch der therapeutisch wertvolle graft-versus-Leukämie (GVL) Effekt (1.4.3) verbunden ist, sollte die Behandlung von GVH-Erkrankungen im Idealfall lediglich zu einer Inaktivierung/Eliminierung der GVHD-reaktiven Zellen und einem Erhalt der GVL-reaktiven Zellen führen. Verschiedene Strategien zur Verhinderung einer GVHD kommen zum Einsatz. Eine Möglichkeit besteht in der Transplantation von T-Zell depletierten Stammzellen. Das Transplantat enthält demzufolge keine GVHD auslösenden Immunzellen ist aber mit einem erhöhten Rezidivrisiko und vermehrten Transplantat-Abstoßungsreaktionen verbunden (Vossen 1998). Eine weitere Alternative ist die Verabreichung von immunsuppressiven Substanzen, die die Funktion der T-Zellen hemmen, aber das Risiko einer Sekundärinfektionen erhöhen.

Neuere Methoden, die sich zum Teil auch noch im Entwicklungsstadium befinden, zielen auf eine spezifische Blockade der Induktions- oder Amplifikationsphase einer GVHD-Entwicklung durch Blockierung der TCR-Bindung an Empfänger-MHC Moleküle ab. Peptide, die die MHC-Moleküle erkennen (Blazar 1997) oder solche, die die co-stimulatorischen Signale blockieren (Blazar 1997) kommen zum Einsatz. Systemische Verabreichung von Zytokinen (Dey 1998) zeigten ebenfalls gute Erfolge in der Minimierung der GVHD-Entwicklung.

1.4.3 Graft-versus-Leukämie Effekt (GVL)

Der Therapie-unterstützende GVL-Effekt ist in erster Linie auf die Aktivierung von immunkompetenten Spender T-Zellen und NK-Zellen durch verbliebene leukämische Blasten im Patienten zurückzuführen.

1956 wurde bereits das erste Mal ein graft-versus-tumor (GVT)-Effekt beschrieben (Barnes 1957, bzw. 2001). Man vermutete, dass eine Reaktion des Knochenmarks gegen die Leukämie in der Eliminierung der leukämischen Blasten resultierte. Dieser Effekt wurde „adaptive Immuntherapie“ (1.5.1) genannt (Mathé 1965). Die Bedeutung von T-Zellen für ein Langzeit-Anwachsen des Transplantats und den GVL-Effekt wurde

hauptsächlich durch Patienten bestätigt, die T-Zell depletierte Transplantate erhielten und weniger GVHD-Entwicklungen aber dafür deutlich mehr Transplantatabstoßungen und Rezidive aufwiesen (Storb 1977, Weiden 1979). Der genaue immunologisch zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht geklärt.

1.5 Neuere therapeutische Ansätze

Die Entwicklung verschiedener gentherapeutischer Ansätze ermöglichte eine drastische Veränderung auf dem Gebiet der Krebsbehandlungen, da sie direkten Vorteil aus den neuen Erkenntnissen der molekularen Grundlagen verschiedener Krebsarten ziehen konnten. Eine Krebszell-spezifische Anwendung, die sich die zytogenetischen Veränderungen von Tumorzellen zunutzen macht, ermöglicht eine gezielte Anwendung von zytotoxisch wirkenden Substanzen, die in deutlich geringeren Schädigungen der normalen Zellen resultiert. Die Möglichkeiten variieren von einem direkten spezifischen Tumorangriff (über bestimmte Tumor-assoziierte Antigene), über den Einsatz direkt wirkender antagonistischer Substanzen (Retinsäure, bei RAR α Leukämien), bis hin zum Nutzen von immunologischen Antworten gegenüber Tumorantigenen (Abb. 3).

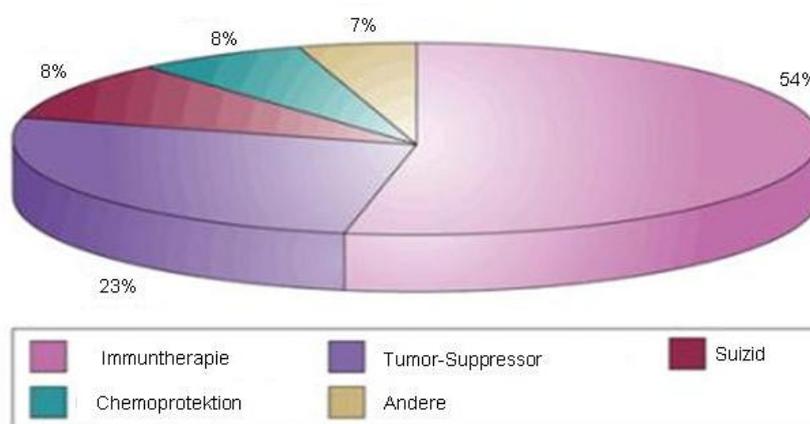


Abb. 3: Krebs-Gentherapie und -Immuntherapie Studien (US Recombinant Advisory Committee). Mehr als die Hälfte der Studien zielen auf eine Verstärkung der Immunreaktion gegenüber Krebs-Antigenen ab. Der nächst kleinere Anteil umfasst Therapien mit der Gabe des Tumorsuppressorgens p53. Suicide: virale Vektoren, die für Enzyme kodieren, die nicht-toxische Vorstufen in toxische Substanzen umwandeln. Chemoprotektion: indirekter Ansatz; Knochenmarkszellen werden mit Viren infiziert, die die Zellen vor den toxischen Wirkungen der Chemotherapie schützen. (nach McCormick 2002)

Die eigentliche Krebs-Gentherapie zielt darauf ab Tumoren/Leukämien zu heilen, indem Nukleinsäuren für das spezifische *targeting* von zellulären Funktionen eingesetzt werden und so das Tumorverhalten und/oder die Host-Tumor Interaktion verändert wird. Antisense Oligonukleotide und Ribozyme können mit mRNA oder genomischer

DNA hybridisieren und somit möglicherweise die Expression von Oncogenen unterdrücken. Therapeutische Nukleinsäuren können aber auch für Proteine, wie Zytokine und co-stimulatorische Oberflächenmoleküle kodieren, die die Antigenität des Tumors verstärken und als Tumor-Vaccine wirken. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Transfer von Tumorsuppressorgenen in die Tumorzellen, um den kanzerogenen Phänotyp zu unterdrücken. Letztlich kann der Einsatz von Nukleinsäuren in Form von sog. Suizidgenen die Tumorzelle "zwingen" sich selbst zu töten (1.7). Diese Formen der neueren Therapien bieten mehrere Vorteile:

- *hohe Spezifität*: eine einzige Basenänderung in der Ziel-DNA des Tumors kann zur Unterscheidung von normalen Zellen ausreichen
- Möglichkeit des Transfers eines Zellgifts oder Suizidgens, *spezifisch* in die Tumorzelle
- *Neue Art der Therapie*: potentielle Möglichkeit Krankheiten zu heilen, bei denen bisherige Therapien nicht anschlagen

Auf RNA-Level werden verschiedene Strategien verfolgt, die den Einsatz von *antisense* Oligonukleotid-Duplex Formierungen oder Ribozymen (Stein 1993; Shore 1993) nutzen. Ein neuer vielversprechender Ansatz könnte die Verwendung von siRNA-Molekülen (*small interfering RNAs*) sein (Fire 1998, Tuschl 1999), die spezifisch die Expression von endogenen und heterologen Genen unterdrücken können (RNAi: *RNA-interference*). Auf Protein-Ebene kommen verschiedene kompetitive Antagonisten zum Einsatz, die bestimmte Proteintypen wie Antigen-Rezeptoren und aktivierte Kinasen inhibieren (Anafi 1993, Renschler 1994).

1.5.1 Infusion von Donor T-Lymphozyten (adaptive Immuntherapie)

Donor-lymphocyte infusions (DLI's) *per se* bestehen aus einer nicht weiter behandelten Blutprobe oder aus durch Leukapherese gewonnenen mononukleären Zellen des Spenders. Als wirksamer Bestandteil werden in erster Linie die T-Zellen (1.4.1) angesehen, da NK-Zellen nur ca. 1,5 % der Leukozyten ausmachen, so dass solche DLI's nicht ausreichend gegen NK-Zell sensible Leukämien wirken. Neuere Ansätze der DLI gehen dahin, die vermutlich aktive Komponente (NK- oder T-Zellen) zu isolieren und vor Infusion weiter aufzubereiten. Augereinigte NK-Zellen werden *ex vivo* mit IL-2 aktiviert und expandiert, um eine ausreichende Menge an Zellen für eine DLI zur Verfügung zu haben.

Sowohl T-Zellen (Antigen-spezifisch) als auch NK-Zellen (reguliert durch das Zwischenspiel von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptor/Liganden Interaktionen) zeigen potente anti-Tumor Aktivitäten in Maus-Modellen. In Spender/Empfänger

Paaren, die einen in GVHD-Richtung gerichteten *mismatch* in den *killer inhibitory receptors* (KIR) zwischen den Spender NK-Zellen und den Empfängerblasten haben, ist die Rezidiv-Rate bei AML-Patienten deutlich reduziert (Ruggeri 2001).

T-Zellen benötigen für ihre zytotoxische Aktivität eine relativ hohe MHC-I Expression auf den Empfängerblasten. Beide T-Zell Untergruppen (1.4.1) zeigen anti-leukämische Effekte im Tiermodell. Da die CD8+ Zellen allerdings fähig sind die Zielzellen direkt zu lysieren, wurde in weiteren Untersuchungen das Augenmerk hauptsächlich auf diese Sub-Population gelegt. Besondere Bedeutung in der T-Zell abhängigen Erkennung der leukämischen Zellen scheinen die mHAg's (wie z. B. HA-1, HA-2, HB-1 und UTY), sowie Leukämie-assoziierte Antigene (z. B. Proteinase-3, WT-1, h-TERT, hdm-2) zu haben (Riddell 2002).

DLI's zeigen nicht in allen leukämischen Erkrankungen einen Remissions-unterstützenden Effekt. Die besten Resultate wurden bisher in CML-Rezidiv Patienten erzielt (60-80 %), während in Fällen von akuten Leukämien lediglich 10-20 % initial antworteten (Carlens 2001). Des weiteren scheint eine späte Infusion von T-Zellen, wenn die Anzeichen von Entzündungen und Gewebe-Verletzungen durch die Konditionierung abgeklungen sind, deutlich bessere Ergebnisse zu liefern, so dass in 50-80 % der Fälle (CML) eine komplette Remission erzielt werden konnte (Kolb 1990; Collins 1997). Die auftretenden GVH-Reaktionen waren deutlich schwächer als bei den frühen DL-Infusionen, traten aber dennoch in 50-60 % der Patienten auf (Collins 1997). Häufig werden DLI's aber auch zur präventiven Behandlung von Patienten mit drohenden Rezidiven eingesetzt, denn es wurde gezeigt, dass ein offenes Rezidiv durch DLI nicht behandelbar ist. Es wurden zwei Patientengruppen identifiziert, bei denen eine DLI-Behandlung die Überlebensrate steigern kann:

- 1- Patienten mit positiver MRD (minimale Resterkrankung) vor Transplantation
- 2- Patienten mit steigendem gemischtem Chimerismus (Zunahme des Empfängeranteils) nach Transplantation.

An 41 ALL-Patienten wurde gezeigt (Bader 2002), dass der MRD-Status vor Transplantation ein prognostisch bedeutender klinischer Parameter ist. Patienten mit einem negativen MRD-Status hatten eine signifikant höhere 5-Jahresüberlebensrate, als Patienten mit einem hohen MRD-Status (78 % vs. 23 %, Bader 1999). Bei der zweiten Patientengruppe wurde nach Transplantation mit Hilfe von *short-tandem* und *variable-tandem-repeat* Analysen der Spender:Empfänger Chimerismus engmaschig untersucht (Bader 1999, Beck 2002, Koehl 2002a). In einer Studie mit 114 Kindern mit ALL, AML und MDS wurde gezeigt (Beck 2002), dass ein Rezidiv dann unausweichlich ist, wenn sich nach Transplantation ein gemischter Chimerismus mit steigendem

autologen Anteil entwickelt. Bei Patienten mit einem solchen Anstieg konnte in 11/24 Fällen durch Immunintervention im Beobachtungszeitraum ein rezidivfreies Überleben erreicht werden, während nur 1/19 Patienten ohne Intervention überlebte. Da die Behandlung mit DLI durch die Entwicklung einer GVHD limitiert ist, wurden bisher eskalierende T-Zell Dosen mit einer niedrigen Anfangs-Dosis ($2,5 \times 10^4$ T-Zellen /kg KG) eingesetzt, um eine potentiell letal verlaufende GVHD zu vermeiden, obwohl prinzipiell letal verlaufende GVHD's auch durch niedrige Dosen T-Zellen ausgelöst werden können. Shiobara *et al.* (2000) zeigten, dass bei Patienten mit ALL und AML ein effektiver GVL-Effekt erst bei einer Anzahl von 1×10^8 Lymphozyten/kg KG nachzuweisen ist. Möglicherweise steht diese Tatsache in Zusammenhang mit den Aspekten, dass auf AML- und ALL-Blasten eine verminderte Antigen-Expression auftritt oder aber eine Veränderung der Adhäsions- oder anderer Moleküle, die für die T-Zellerkennung notwendig sind, vorkommt (Riddell 2002). Eine Verbesserung der adaptiven T-Zelltherapie liegt darin, die Zellen genetisch zu modifizieren, so dass sie selektiv im Falle einer GVHD im Körper des Patienten eliminiert werden können (1.7).

1.6 Methoden des Gentransfers

Für den Gentransfer stehen verschiedene *physikalische* und *virale* Methoden zur Verfügung. Die direkte und effiziente Applikation von nackter Plasmid-DNA in die jeweiligen Zielzellen wurde durch die Entwicklung physikalischer Methoden wie die Elektroporation (Rols 1998) oder die *Gene-Gun* (Yang 1990) ermöglicht. Neben der direkten Injektion der nackten DNA existieren andere Transfersysteme wie kationische Lipide oder Polymersysteme, mit denen die DNA komplexiert wird. In erster Linie waren diese Strategien dadurch limitiert, dass sie nicht effizient in den Zellkern gelangten. Durch Integration von NLS-Sequenzen (*nuclear localization signal*) konnte eine Verbesserung der Transferrate erzielt werden (Subramanian 1999).

1.6.1 Virale Vektorsysteme

Virale Vektorsysteme wurden für einen effizienten Gentransfer entwickelt. Mit Hilfe der Vektoren wird die zu transferierende DNA in Verpackungszellen in nicht replikationskompetente virale Partikel verpackt und gelangt über den viralen Gentransfer in die Zielzelle. Im Folgenden soll hier nur näher auf die retroviralen Vektoren (auf Basis oncoretroviraler Viren) eingegangen werden, neben denen es aber

noch viele andere, wie z. B. adenovirale, Herpes-Virus, Adeno-assoziierte und lentivirale Vektoren (Untergruppe der Retroviren) gibt.

1.6.1.1 Retrovirale Vektoren

Das retroviral vermittelte Gentransfersystem ermöglicht eine stabile Integration des proviralen Genoms in das Genom der Zielzelle und stellt somit die Vererbung auf die Tochtergenerationen sicher. Im Fall von oncoretroviralen Vektoren erfolgt der effiziente Gentransfer ausschließlich in proliferierende Zellen.

Ein potentiell Risiko liegt allerdings in der unspezifischen Integration der Vektor-DNA in das Zielzellgenom, die eine Insertionsmutagenese nach sich ziehen kann. Ein solcher Vorgang könnte z.B. zu der Aktivierung eines Oncogens führen, was wiederum die Entwicklung einer Neoplasie zur Folge haben könnte (Temin 1990; Li 2002).

1.6.1.2 Der retrovirale Lebenszyklus

Retroviren (Abb. 4) zeichnen sich dadurch aus, dass ihr Genom aus zwei identischen einzelsträngigen linearen RNA-Molekülen mit einer Größe von 7-10 kb besteht. Die RNA-Moleküle sind mit einer 7-Methyl-Guanosintriphosphat-Cap am 5´ Ende und einem Polyadenylatschwanz am 3´ Ende ausgestattet. Für die Replikation benötigen die Retroviren verschiedene virale Gene:

- *gag*: kodiert für die Strukturproteine (core proteins)
- *pol*: kodiert für die Enzyme Integrase, Protease, Reverse Transkriptase und RNaseH, die für die Integration und Replikation des retroviralen Genoms in der Zielzelle benötigt werden.
- *env*: kodiert für die Glykoproteine der äußeren Hüllmembran

im Falle der komplexeren Retroviren (wie z. B. HIV) werden jedoch noch weitere akzessorische Gene, wie z. B. *tat*, *rev*, *nef* u.a. benötigt.

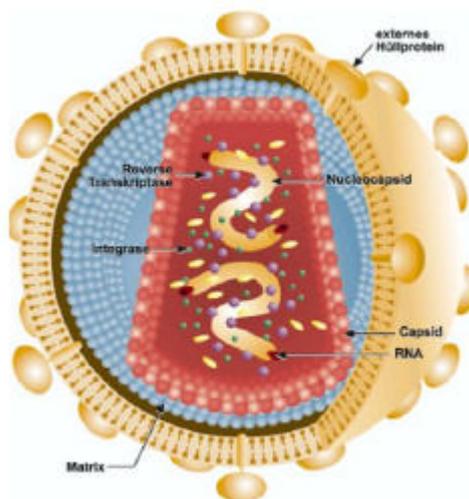


Abb.4 : Struktur eines nativen Retrovirus.

Der kodierende Bereich wird von den LTR's (*long terminal repeat*) flankiert. Diese enthalten Promotor- und Enhancer-Sequenzen, die die virusspezifische Expression regulieren. Man unterteilt sie in folgende Abschnitte:

- **U3:** im retroviralen Genom am 3' Ende lokalisiert, eine Kopie befindet sich nach reverser Transkription (rT) am 5' Ende der Transkriptionsinitiationsstelle
- **U5:** trennt den R-Bereich von der Primerbindungsstelle (PBS) im retroviralen Genom
- **R:** identische repetitive Sequenzen, Initiationsstelle der Transkription
- **PBS:** Primerbindungsstelle (Initiation der Erststrangsynthese)
- **PPT:** Poly-Purintrakt (Initiationsstelle für die Zweitstrangsynthese)

Die Infektion einer Zielzelle startet mit der Bindung der Glykohüllproteine des Virus an spezifische Rezeptoren der Wirtszellmembran. Die Membran verschmilzt mit der Virushülle und das virale Genom wird in das Zytoplasma der Zielzelle abgegeben. Durch rT entsteht eine lineare doppelsträngige DNA, die als Provirus mehr oder weniger zufällig in das Genom der Wirtszelle integriert. Der Präintegrationskomplex der Retroviren, bestehend aus viraler DNA und Integrase, kann erst nach Auflösung der Kernmembran in der Mitose in den Nukleus gelangen während der lentivirale Präintegrationskomplex aktiv unter Energieverbrauch und unter Beteiligung der NLS, die Bestandteil des Matrixproteins, der Integrase und des Vpr-Proteins ist (Klimatcheva 1999) in den Kern eingeschleust wird. Die provirale DNA wird von der Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle in RNA transkribiert, die zum einen zur Synthese virusspezifischer Proteine und zum anderen der Bildung neuer, genomischer RNA dient. Die Verpackung der genomischen RNA erfolgt über die virusspezifischen

Strukturproteine, die das Verpackungssignal ψ erkennen, so dass die infektiösen Virionen durch Knospung aus der Wirtszelle gelangen können (Coffin in Fields 1996, Abb. 5).

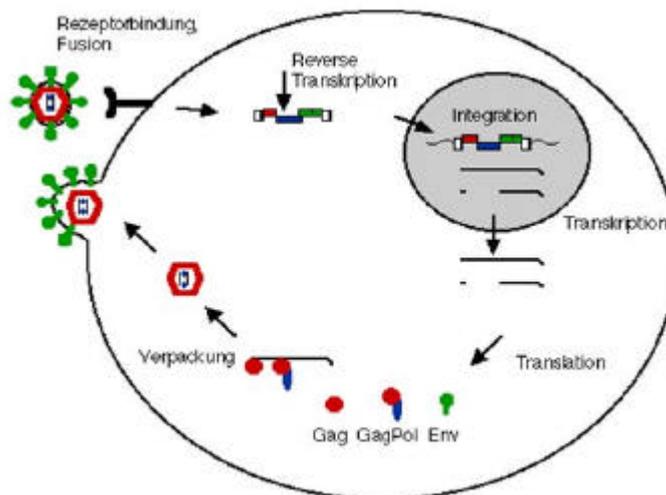


Abb. 5: Infektionszyklus eines Retrovirus. Nach der rT stammen die U3-Regionen in beiden LTR's von der U3-Region der 3'-LTR des Vektors. Beide U5-Regionen stammen aus der ursprünglichen U5-Region der 5' Vektor-LTR (<http://www.uni-wuerzburg.de/virologie/lindemann/praktikum/info.html>).

1.6.1.3 Die Entwicklung oncoretroviraler Vektoren

Um oncoretrovirale Vektoren für therapeutische Zwecke, wie die hier angestrebten Infusionen mit genetisch modifizierten T-Zellen verwenden zu können, dürfen diese nicht länger replikationskompetent sein. Der Großteil der kodierenden Bereiche (*gag*, *pol*, *env*) wurde eliminiert und durch die Sequenz des Zielgens ersetzt. Die retrovirale Transduktion und Integration hängt aber auch von einer Reihe *cis*-aktivierender Elemente ab (Abb. 6), die bei der Entwicklung des Vektors nicht eliminiert werden sollten:

- Promotor und Polyadenylierungssignal
- das Verpackungssignal Psi (ψ) dirigiert die Inkorporation der vektoruellen RNA in das Nukleokapsid
- Signale für die rT, wie PBS, PPT, R-Region (Transfer der DNA-Synthese zwischen den *templates*)

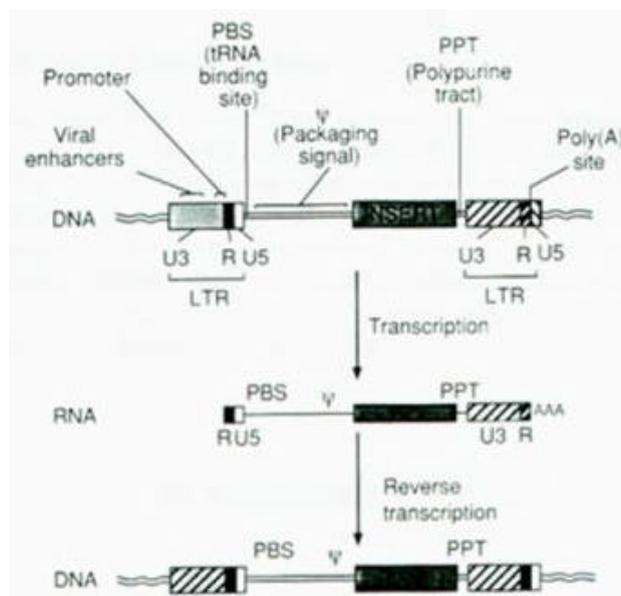


Abb. 6: Cis-wirksame Elemente in retroviralen Vektoren. (nach Coffin in Fields 1996)

Für die Durchführung der Replikation benötigen diese Vektoren Verpackungszellen (oder Helferviren), die die *gag*, *pol* und *env* Gene in *trans* zur Verfügung stellen (Abb. 7). Aufgrund des lysogenen Lebenszyklus der Retroviren produzieren diese Verpackungszellen ständig replikationsinkompetente retrovirale Vektoren ohne zu sterben. In Abhängigkeit der Hüllprotein-kodierenden Sequenz in den Verpackungszellen kann man retrovirale Vektoren mit verschiedenen Wirtsspektren generieren (Pseudotypisierung). Amphotrope Hüllproteine ermöglichen z. B. die Transduktion humaner Zellen. Im Fall von hämatopoetischen Zellen allgemein und T-Zellen im besonderen resultiert eine Pseudotypisierung der retroviralen Vektoren mit dem *gibbon ape leukemia virus* (GALV) Hüllprotein in einer effizienteren Transduktion als mit anderen Hüllproteinen (Movassagh 1998 und 2000).

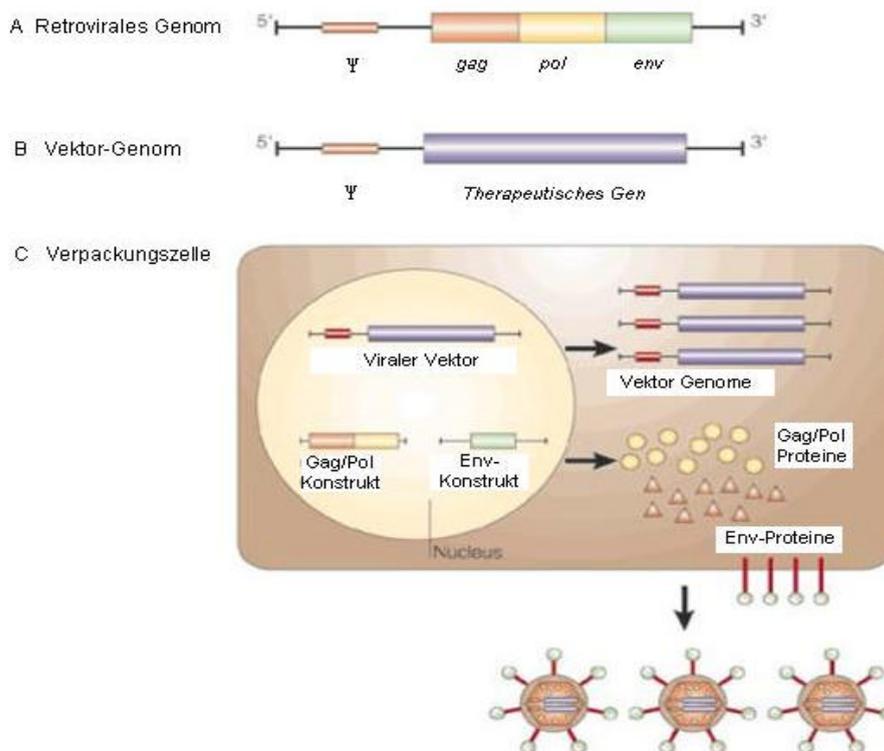


Abb. 7: Trans-wirkende Signale der Verpackungszellen (nach Somia 2000). Die Gene *gag*, *pol* und *env* werden auf dem Genom der Verpackungszelle bereitgestellt. Das Vektor-Genom mit dem „therapeutischen Gen“ wird in die Zellen transfiziert. Das therapeutische Gen wird in RNA transkribiert und kann aufgrund des Verpackungssignals und den in *trans* zur Verfügung gestellten *gag*, *pol* und *env* Proteinen in Virionen verpackt werden.

Die Kontamination mit replikationskompetenten Retroviren (RCR) durch Rekombination z. B. kann nach wie vor problematisch sein, so dass ständig eine Verbesserung der Sicherheit solcher Vektoren angestrebt wird.

1.6.2 T-Zellen als *target* für den retroviralen Gentransfer

T-Zellen sind im Kontext der adaptiven Immuntherapie bzw. genterapeutischer Maßnahmen für Immunerkrankungen (z. B. SCID) ein Ziel für den Gentransfer. Als Gentransfersystem werden hauptsächlich retrovirale Vektoren (1.6.1.1) verwendet, die zur Zeit das effizienteste stabil-transduzierende System für die T-Zell Transduktion darstellen. Der Vorteil der Verwendung dieser Vektoren liegt darin, dass das virale genetische Material in das Genom der Zielzellen stabil integriert. In verschiedenen Ansätzen wurden Protokolle entwickelt, die eine effiziente Transduktion von Zielzellen möglich machten (Moritz 1994; Hanenberg 1996; Pollok 1998; Fehse 1998; Dardalhon 1999). Die Effizienz der Transduktion mit solchen Vektoren ist jedoch abhängig vom Proliferationsstatus der Zielzelle (Miller 1992, Roe 1993). T-Zellen, die nach Isolation

aus dem peripheren Blut nicht aktiviert sind, müssen für die Transduktion (mit oncoretroviralen Vektoren) mit einer Kombination aus Antikörpern und Zytokinen (antiCD28, antiCD3 und hIL-2) prästimuliert werden. Für den eigentlichen Transduktionsprozess wurden verschiedene Optimierungen der Protokolle durchgeführt, indem z. B. Zentrifugationsschritte (Kotani 1994, Bunnell 1995) sowie Moleküle, die eine Co-Lokalisierung des Vektors und der Zielzellen ermöglichen (Moritz 1994, Hanenberg 1996) eingeführt wurden. Die *ex vivo* Kultivierung der T-Zellen für den Gentransfer und die eventuell folgende Selektion sollte so kurz wie möglich gehalten werden, da eine lange *in vitro* Kultivierung einen negativen Einfluss auf die Alloreaktivität, d.h. auf die Funktionalität der T-Zellen haben kann (Sauce 2001). Im Rahmen der Optimierung von T-Zell Transduktionsprotokollen wurden metabolische Selektionsmarker, wie z. B. Resistenzgene (NeoR) gegen Oberflächenmarker ausgetauscht. Die Expression eines Oberflächenproteins ermöglicht eine immunomagnetische Selektion, die im Gegensatz zu der Selektion über einen Resistenzmechanismus mit einer verkürzten *ex vivo* Kultivierung verbunden ist. Weiterhin ermöglichen die Oberflächenmarker eine einfache Überprüfung der Transduktionseffizienz mittels durchflusszytometrischer Analysen (FACS) und können in einer Reduktion des immunogenen Potentials aufgrund ihres zumeist humanen Ursprungs resultieren.

Folgende Anforderungen sollte ein idealer, klinisch applikabler Selektionsmarker erfüllen:

- **Humaner Ursprung**, um Immunreaktionen des Patienten zu vermeiden
- **Expression ausnahmslos** auf den modifizierten Zellen und nicht auf den wt-Zellen, um eine optimale Selektion zu gewährleisten
- **keine Interferenzen** mit physiologischen Funktionen der Zielzellen
- **kompatibel** mit einem GM- gerechten Selektionsprozess

Der zumeist verwendete Selektionsmarker, der einem Großteil der oben genannten Anforderungen entspricht, ist eine zytoplasmatisch trunkierte Version des humanen Oberflächenmarkers Δ LNGFR (*low-affinity-nerve-growth-factor receptor*, Ruggieri 1997).

1.6.2.1 DLNGFR als Selektionsmarker

LNGFR ist ein Transmembran-Glykoprotein, das Mitglieder der Neurotrophin-Familie bindet. Die Neurotrophine sind eine Gruppe strukturell und funktionell verwandter Polypeptide, die neuronales Überleben, -Differenzierung und -Reparatur regulieren (Rodriguez-Tébar 1990 und 1992). Die extrazelluläre Domäne des LNGF-Rezeptors

weist strukturelle Übereinstimmungen mit dem TNF-Rezeptor und den CD40-Rezeptoren auf (Meakin and Shooter 1992). Der intrazelluläre Part hingegen enthält eine *death domain* (Chapman 1995, Feinstein 1995), die auch in verschiedenen anderen Proteinen, wie z. B. p100NF- κ B, DAP-Kinase u. a. zu finden ist (Feinstein 1995). Die funktionelle Bedeutung dieser *death domain* ist jedoch bisher noch in keinem der Proteine geklärt (Liepinsh 1997).

LNGFR wird auf humanen Oligodendrozyten, B-Zellen, KM-Fibroblasten, autonomen und sensorischen Neuronen, Schwann-Zellen, follikulären dendritischen Zellen und mesenchymalen Zellen exprimiert. Die Sequenz setzt sich aus einer kurzen Signalsequenz (25 AS-Reste), einer 225 AS großen extrazellulären Domäne, einer Transmembran-Domäne (23 AS) und einer aus 154 AS-Resten bestehenden intrazellulären Domäne zusammen. Der als Oberflächen/Selektionsmarker verwendete Δ LNGFR-Rezeptor ist eine zytoplasmatisch trunkierte Version des wtLNGFR, in der die intrazelluläre Domäne lediglich noch aus 10 AS-Resten besteht und keine Sequenz mehr für die *death domain* enthält. Δ LNGFR wurde schon in einigen präklinischen und klinischen Studien als Selektionsmarker für transduzierte Zellen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde der Δ LNGFR-Marker im Rahmen eines Fusionsproteins als Selektionsmarker verwendet.

Ein weiteres humanes Oberflächenprotein, das als Selektionsmarker für transduzierte T-Zellen verwendet werden kann ist das zytoplasmatisch trunkierte tCD34-Molekül, das ebenfalls in dieser Arbeit zum Einsatz kam.

1.6.2.2 Das humane tCD34-Molekül als Selektionsmarker

Fehse *et al.* (2000) etablierte mit dem tCD34-Marker eine potentielle Alternative zu den bisher eingesetzten Selektionsmarkern. Es handelt sich dabei um eine natürlich vorkommende Spleiß-Variante des humanen CD34-Antigens. CD34 (Abb. 8) ist ein integrales, monomeres Typ-1 Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 105 bis 120 kD (abhängig vom Glykosylierungs-Polymorphismus der exprimierenden Zelle) und setzt sich aus 373 AS zusammen.

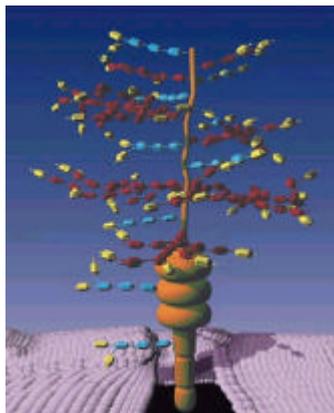


Abb. 8: Schematische, dreidimensionale Darstellung des humanen CD34-Antigens. Die farbigen Seitenketten stellen die vielfältigen Glykosylierungsmöglichkeiten des Moleküls dar. Das Molekül ist über eine hydrophobe Domäne in der Membran verankert. (<http://www1.omi.tulane.edu/images>)

CD34 wird hauptsächlich auf primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Civin 1984, Katz 1985), aber auch auf Endothelzellen (Fina 1990) und embryonalen Fibroblasten (Brown 1991). Die Funktion von CD34 ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Vermutungen zielen darauf ab, dass die CD34-Expression auf endothelialen Zellen möglicherweise eine Rolle in der Leukozyten-Adhäsion und dem „*homing*“-Prozess während inflammatorischer Prozesse spielen könnte; oder im Zusammenhang mit der Expression auf Vorläuferzellen eine Bedeutung in deren Lokalisation und Adhäsion im Knochenmark haben könnte. Das CD34-Molekül kann in drei verschiedene Domänen unterteilt werden: die extrazelluläre Domäne (258 AS-Reste), die hydrophobe Transmembran-Domäne (22 AS-Reste) sowie die zytoplasmatische Domäne (73 AS-Reste).

Die potentielle Funktion des CD34-Moleküls in der Differenzierung und Adhäsion von hämatopoetischen Vorläuferzellen scheint abhängig von der Anwesenheit der Erkennungssequenzen der Phosphokinase-C zu sein; möglicherweise in Kombination mit anderen Zelloberflächen-Molekülen (Fackler 1995, Cheng 1996). Zusätzlich wurden andere Phosphorylierungsstellen für verschiedene Protein-Kinasen in der CD34-Sequenz gefunden, z.B. für Tyrosin-Kinasen, Glykogen Synthase Kinase und Casein Kinase II (Simmons 1992).

Durch einen natürlich vorkommenden, alternativen Spleiß-Vorgang entsteht eine CD34-Variante mit einer verkürzten zytoplasmatischen Domäne (tCD34, Fehse 2000). Diese trunkierte CD34-Version hat anstelle des 73 AS langen zytoplasmatischen Teils nur noch eine 17 AS enthaltende intrazelluläre Domäne, die keine Erkennungssequenzen für die PK-C enthält .

Das tCD34-Molekül ist ein optimaler Selektionsmarker für transduzierte T-Zellen: es ist humanen Ursprungs, wird nicht auf T-Lymphozyten exprimiert, ermöglicht eine GMP gerechte immunomagnetische Selektion (2.6.8) der Zellen und sollte keine physiologischen Interferenzen mit den Zielzellen zeigen, da die zytoplasmatische Domäne auf einen Bruchteil reduziert wurde und die Erkennungssequenzen für die PK-C nicht mehr vorhanden sind.

In einem transgenen Mausmodell wurde gezeigt, dass die Über-Expression des normalen humanen CD34-Proteins die Entwicklung der transduzierten murinen T-Zellen *in vivo* nicht veränderte. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Expression von CD34 *per se* scheinbar keinen modifizierenden Einfluss auf die T-Zell-Funktion hat (Healy 1995). Aussagen über eine Veränderung der tCD34-exprimierenden T-Zellen in einem humanen *setting* kann man aufgrund dieser präklinischen Vorversuche jedoch nicht treffen.

1.7 Die Suizidstrategie

Der ursprüngliche Ansatz der Suizidstrategie lag darin, Suizidgene direkt in Krebszellen zu transferieren und diese durch Applikation eines spezifischen Suizid-Aktivators zu eliminieren (Abb. 9).

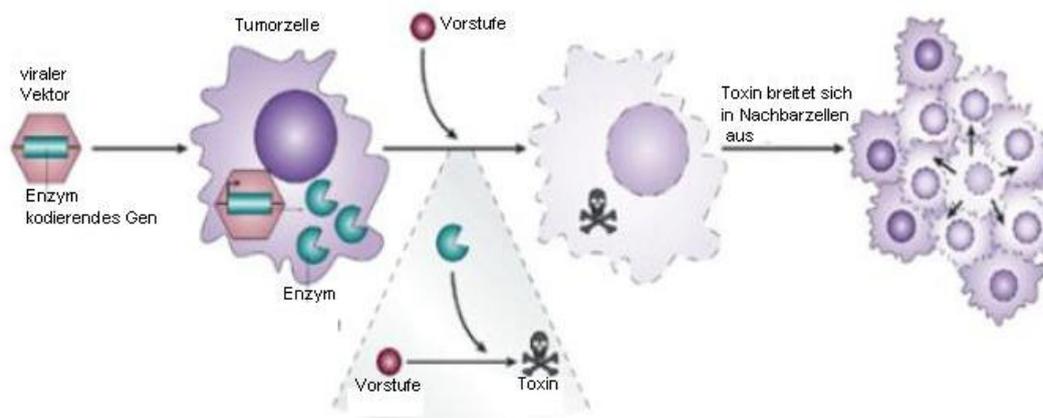


Abb. 9: Suizidgen-Transfer mittels viraler Vektoren in Tumorzellen (nach McCormick 2001). Der virale Vektor mit dem Zielgen, das für ein bestimmtes Enzym kodiert, wird direkt in die Tumorzelle appliziert. Nach Integration in das Genom der Tumorzelle wird das Enzym exprimiert. Eine nicht-toxische Substanz wird systemisch verabreicht und nur in den Tumorzellen, die das spezifische Enzym exprimieren, in ein Toxin umgewandelt, das zum Sterben der Tumorzelle führt. Durch den sog. „bystander-effect“ gelangt das Toxin über Zell-Zell Verbindungen in benachbarte Tumorzellen.

Suizidgene sind Enzym-kodierende Gene, die - einmal exprimiert - in der Zielzelle für die Umwandlung einer harmlosen Vorstufe („*prodrug*“) in ein potentielles Zytotoxin sorgen, das möglicherweise sogar in benachbarte Zellen diffundieren kann (*bystander effect*). Die Spezifität wird in diesem Fall durch direkte lokale Applikation der „*prodrug*“ in den Tumor oder direkte Injektion der Suizidgen-DNA (verpackt in einem Vektor oder „nackt“) erzielt. Diese Gene und auch ihre Produkte kommen in normalen Säugerzellen nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen vor, so dass letztendlich nur solche Zellen, die mit den entsprechenden Genen transfiziert wurden, gegenüber dem toxischen Metaboliten sensitiv sind. Es existieren verschiedene Enzym/„*prodrug*“ Kombinationen (Tab. 5).

Enzym	Vorstufe (nicht-toxisch)	Produkt (toxisch)	Mechanismus
HSV-tk	Ganciclovir	Ganciclovir-Triphosphat	Blockiert DNA-Synthese
Cytosin-Deaminase	5-Fluorozytosin	5-Fluorouracil (5-FU)	Pyrimidin Antagonist: blockiert DNA- und RNA-Synthese
Nitroreduktase	Nitrobenzyl-oxycarbonyl-anthracyclin	Anthracycline	DNA-Kreuzvernetzung
Carboxylesterase	CPT-11	SN38	Topoisomerase-Inhibitor
Cytochrom P450	Cyclophosphamid	<i>Phosphoramid mustard</i>	DNA-alkylierendes Agens: blockiert DNA-Synthese
Purin Nukleosid Phosphorylase	6-Mercaptopurin-DR	6-Mercaptopurin	Purin-Antagonist: blockiert DNA-Synthese

Tab. 5: Enzym/*prodrug* Kombinationen für Suizidgen Therapie (nach McCormick, 2001).

Das am häufigsten verwendete System ist das HSV-tk/GCV (Herpes simplex virus-I Thymidin-Kinase/Ganciclovir) System (Moolten 1986, St Clair 1987), das bereits in einigen klinischen Studien zum Einsatz kam und auch in pädiatrischen Patienten zur Behandlung von Gehirntumoren eingesetzt wurde (Packer 2000). Aber auch die Verwendung der Cytosin-Deaminase bietet eine effiziente Alternative zu der HSV-tk, verbunden mit einem stärkeren *bystander effect*, aber auch mit einem deutlich erhöhten immunogenen Potential.

1.7.1 Das HSV-tk/GCV System

HSV-tk phosphoryliert präferentiell wenig-toxische Nucleosid-Analoga wie GCV (Abb. 10) oder Acyclovir (ACV) zu den entsprechenden Monophosphaten, die im weiteren Zellmetabolismus von endogenen Thymidinkinasen (TK) bis hin zu den entsprechenden Tri-Phosphaten weiter phosphoryliert werden (z. B. GCV-PPP).

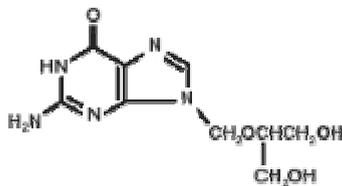


Abb. 10: Chemische Struktur des GCV.

Anstelle der normalen Nucleosidtriphosphate werden die tri-phosphorylierten Nucleosid-Analoga in die DNA eingebaut und führen so zu Strangbrüchen und Synthese-Stop. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt (Abb. 11). Neben dem DNA-Syntheseabbruch induziert HSV-tk/GCV zusätzlich noch die Ansammlung von p53. Dies ist zumindest zum Teil durch mitochondriale Funktionen vermittelt, da die spezifische Inhibierung von mitochondrialer Proteinsynthese durch Chloramphenicol oder der Einsatz des spezifisch mitochondrial wirkenden Inhibitors *bongrekic acid* in einer deutlichen Reduktion der HSV-tk/GCV induzierten p53-Ansammlung resultiert (Beltinger 2000). Die Ansammlung von p53 resultiert wiederum in einem Anstieg der Zelloberflächen-Expression des „*death receptors*“ CD95 (Fas). Möglicherweise ist dieser Aspekt auf eine p53-regulierte Translokation von bereits synthetisiertem CD95 aus dem Golgi-Apparat zur Zelloberfläche zurückzuführen. Dieser Vorgang ist mit einer FasL-unabhängigen Bildung des *death-inducing signaling complex* (DISC) unter Beteiligung des Adapter Moleküls *Fas-associated protein with death domain* (FADD) und der Initiator-Caspase Caspase 8 verknüpft. Im Folgenden werden weitere Caspasen aktiviert, die letztlich in der Aktivierung der Mitochondrien und den morphologischen Zeichen der Apoptose durch Spaltung zytoskelettaler Substrate und somit der Induktion der Apoptose resultieren.

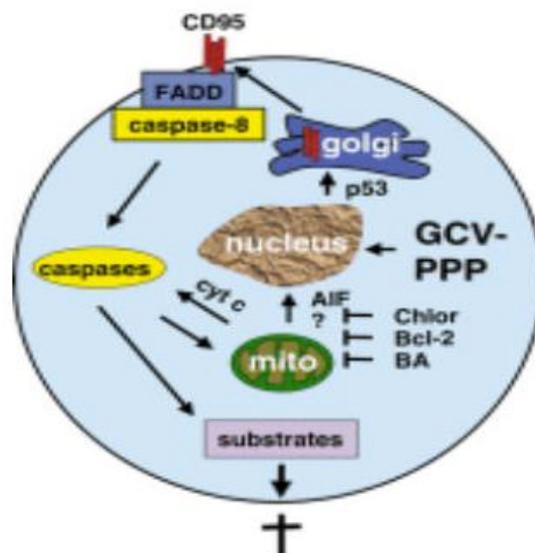


Abb. 11: Molekularer Mechanismus der HSV-TK/GCV induzierten Apoptose (nach Beltinger 2001). mito = Mitochondrien; Chlor (Chloramphenicol), Bcl-2, BA (bongrekic acid) = reduzieren sehr stark die HSV-TK/GCV induzierte p53-Akkumulation.

Im Kontext einer effizienten Behandlung von soliden Tumoren ist eine *in vivo* Gentransfer-Effizienz von 100 % erforderlich damit alle Zellen modifiziert werden. Solche hoch-effizienten Gen-Transfer Methoden stehen jedoch nicht zur Verfügung. Durch den sogenannten „*bystander effect*“, der im Falle des HSV-tk/GCV Systems auf dem Transport des phosphorylierten GCV's durch die Zell-Zell Verbindungen wie *gap-junctions* in benachbarte Zellen beruht, können auch nicht-transfizierte Zellen eliminiert werden. Im Rahmen einer Immuntherapie mit transduzierten T-Zellen spielt der *bystander-effect* keine Rolle, da die Zellen keine direkten Zell-Zell Verbindungen besitzen und eine Verbreitung auf benachbarte Zellen unerwünscht ist, da der Aspekt der Spezifität dadurch drastisch reduziert würde (1.7.3).

Neben dem wt *HSV-tk* Gen wurden eine Reihe von Mutanten analysiert (Black 1996 und 2001), die eine erhöhte Sensitivität gegenüber GCV haben, d. h. geringere Konzentrationen der molekularen Vorstufe reichen aus, um die Apoptose zu induzieren (Black 1996). Eine dieser hypersensitiven GCV-Mutanten, die HSV-SRTK39 Mutante (Black 2001; tk39, W. Qasim, London), die eine gegenüber der wt HSV-tk 294fach verstärkte GCV-Sensitivität besitzt, wurde im Kontext dieser Arbeit verwendet. Gegenüber der wt-Sequenz sind einige Aminosäuren in der Nähe der „*aktiven Zentren*“ des Enzyms in der mutierten HSV-tk39 Form verändert (Abb. 12).

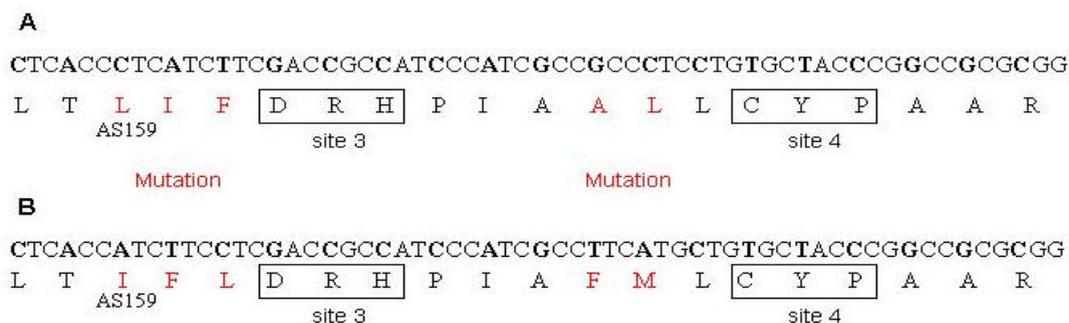


Abb. 12: Vergleich der wt HSV-tk Sequenz und der mutierten HSV-tk39 Sequenz. (A) Die wt-Sequenz enthält zwei „aktive Zentren“, die für die enzymatische Funktion von Bedeutung sind (Rahmen). In unmittelbarer Nähe zu diesen Zentren sind die Aminosäureaustausche in der Sequenz der hypersensitiven Mutante tk39 (B) lokalisiert (rot dargestellt). Alle anderen isolierten Mutanten (Black 1996), die ebenfalls eine veränderte GCV-Sensitivität zeigten, hatten an ähnlichen z.T. sogar identischen Stellen AS-Austausche.

1.7.2 Eine alternative Suizidstrategie humanen Ursprungs

Die zytotoxische Aktivität des HSV-tk/GCV Systems ist auf teilende Zellen beschränkt. Ruhende, nicht aktive Zellen, die im Normalfall auch keine GVHD auslösen werden durch die Anwendung dieses Suizidmechanismus nicht eliminiert. Der virale Ursprung des *HSV-tk* Suizidgens stellt eine weitere potentielle Limitierung dar, die zu Immunreaktionen im Form von Abstoßung der transplantierten Zellen führen könnte (Verzeletti 1998).

Eine interessante Alternative bietet der Einsatz von humanen, am Fas (CD95)-induzierten Apoptose-Signaltransduktionsweg beteiligten Molekülen. Im Gegensatz zu allen anderen bisher verwendeten Suizidmolekülen sind diese Moleküle humanen Ursprungs und minimieren somit das immunogene Risiko. Die Bindung des Fas-Liganden (CD95L) an den Fas-Rezeptor (CD95) führt zu einer Konformationsänderung (Trimerisierung) des Rezeptors. In Folge dessen wird über den intrazytoplasmatischen Teil des Rezeptors, der eine „*death domain*“ (DD) enthält das Adaptermolekül „*Fas associated protein with death domain*“ (FADD) rekrutiert, das ebenfalls C-terminal eine „*death domain*“ hat. N-terminal ist eine „*death effector domain*“ (DED) lokalisiert, die nach Aggregation der DD's die Pro-Caspase 8, über deren DED rekrutiert und einen Komplex bildet (*death inducing signaling complex*, DISC). Auto-proteolytisch wird die Caspase 8 aktiviert (Muzio 1996). Das aktivierte Caspase 8-Dimer wird von dem DISC freigesetzt und kann in Abhängigkeit vom Zelltyp (Typ 1 oder Typ 2) im weiteren Verlauf direkt die Pro-Caspase 3 durch proteolytische Spaltung aktivieren (Typ 1 Zellen: Thymozyten und Fibroblasten), oder aber Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie (Typ 2 Zellen: Hepatozyten) spalten. Bid wiederum translokiert zu den Mitochondrien und induziert dort die Ausschüttung von Cytochrom-C, die in der Aktivierung von Caspase 9 und Apaf 1

(*apoptotic protease activating factor*) resultiert. Der letzte Schritt in den Typ 2 Zellen ist ebenfalls die Aktivierung der Caspase-3. Aktivierte Caspase-3 spaltet verschiedene zelluläre Substrate und führt durch Aktivierung einer spezifischen DNase (CAD, *caspase activated DNase*), die in proliferierenden Zellen komplexiert mit ihrem Inhibitor ICAD (*inhibitor of CAD*) vorliegt, zu morphologischen Veränderungen der Zelle und des Nukleus. Aktivierte Caspase-3 spaltet den Inhibitor ICAD und aktiviert so die DNase, die anschließend die chromosomale DNA fragmentiert (Abb. 13).

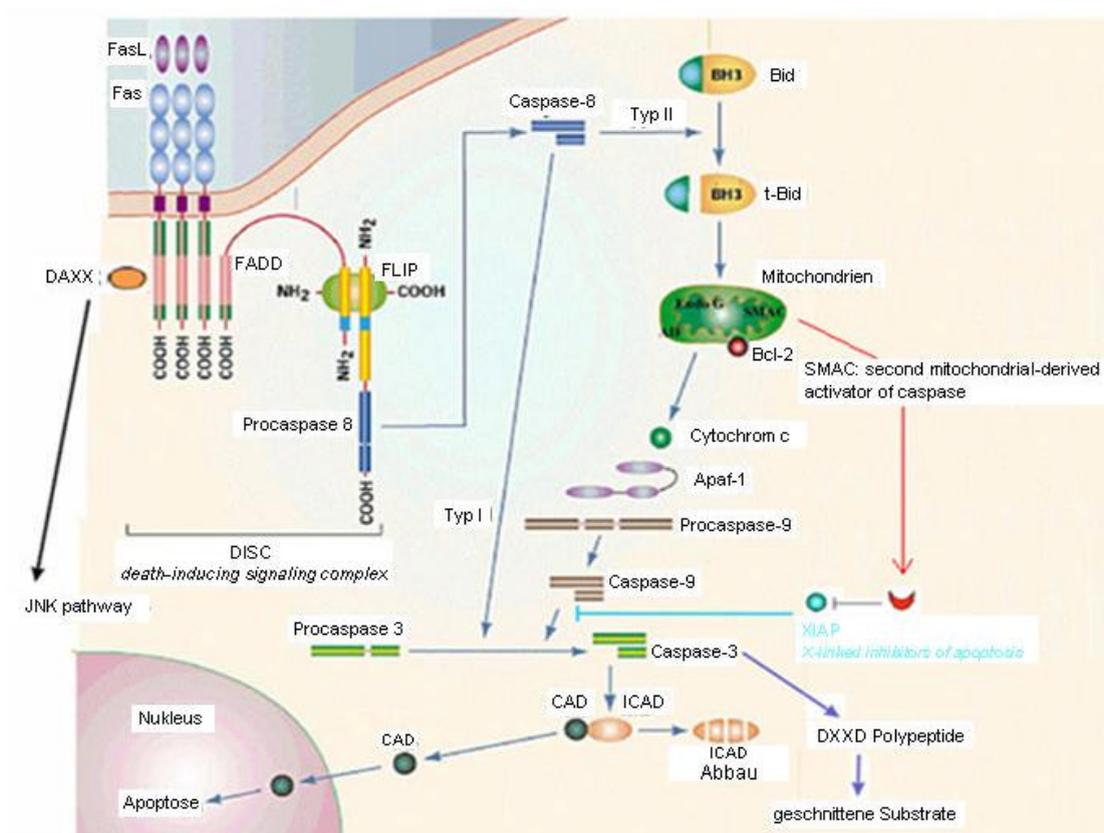


Abb. 13: Fas induzierter Apoptose-Signaltransduktionsweg. Die FasL-FasR Interaktion spielt im Immunsystem eine wichtige Rolle. Ein Verlust der Aktivität dieses Systems führt zu einer Auto-Immun-Erkrankung, was darauf hindeutet, dass dieses System an der Inaktivierung von selbst-reaktiven T-Zellen beteiligt ist. Außerdem ist das Fas-System an der Eliminierung von transformierten und auch Virus-infizierten Zellen beteiligt. Die zytosolisch lokalisierte *death domain* des FasR interagiert nicht nur mit FADD, sondern auch mit anderen Adapter Molekülen, wie FAF und DAX um die proteolytische Kaskade der Caspasen zu aktivieren. Neben Caspase-8 wird auch Caspase-10 zu Beginn aktiviert, die dann wiederum weitere Caspasen aktivieren und letztlich in der DNA Fragmentierung resultieren kann. (<http://www.infobiogen.fr/services>)

Moleküle des endogenen Fas-Signaltransduktionswegs wurden bereits in früheren Studien benutzt um zelluläre Apoptose zu regulieren (Spencer 1996; MacCorkle 1998). Sie wurden so konstruiert, dass sie auf nicht-toxische, membrangängige Liganden, sog. *chemical inducers of dimerization* (CID) reagierten, indem sie mit CID-bindenden

Proteinen sog. FKBP (FK506 binding protein) fusioniert wurden (Spencer 1993). Fan *et al.* (1999) zeigte, dass die Fusion der DED des FADD-Moleküls mit 23 CID-bindenden Proteinen (FKBPs) ausreichte, um durch Gabe des CID Apoptose zu induzieren. FKBP (FK506 binding protein) wird ubiquitär in verschiedensten Zellen exprimiert und liegt als zytoplasmatisches Protein vor. Es ist das intrazelluläre Ziel natürlich vorkommender immunsupprimierender Substanzen wie Rapamycin oder FK506. Um unspezifische Interaktionen mit natürlich vorkommenden Interaktionspartnern zu inhibieren wurden modifizierte FKBP-Moleküle (F36v) entwickelt, die spezifisch von einer synthetischen Komponente, dem Dimerisierer AP20187 erkannt werden (Amara 1997; Clackson 1998), der wiederum nur mit deutlich abgeschwächter Affinität mit den natürlich vorkommenden Molekülen interagieren kann.

1.7.3 DLI mit HSV-tk exprimierenden T-Zellen

Die Anwendung der Suizidstrategie im Kontext einer DLI ermöglicht die selektive Eliminierung der Spender T-Zellen im Fall einer GVHD-Entwicklung. Sie erfordert allerdings einen effizienten *ex vivo* Gentransfer sowie eine langanhaltende Expression des Transgens in den Zielzellen. Um die Entstehung der GVHD zu verhindern bzw. zu hemmen, müssen alle infundierten Spender T-Zellen mit dem entsprechenden Suizidgen transduziert sein, da man aufgrund des fehlenden „*bystander effects*“ nur die tatsächlich transduzierten Zellen abtötet. Neben dem Suizidgen muss also auch ein geeignetes Markergen exprimiert werden, das eine Selektion der modifizierten Zellen ermöglicht (1.6.2), so dass dem Patienten eine homogene Population an transduzierten Zellen injiziert werden kann, wobei eine optimale Dosis im Einzelfall ermittelt werden muss (Abb. 14).

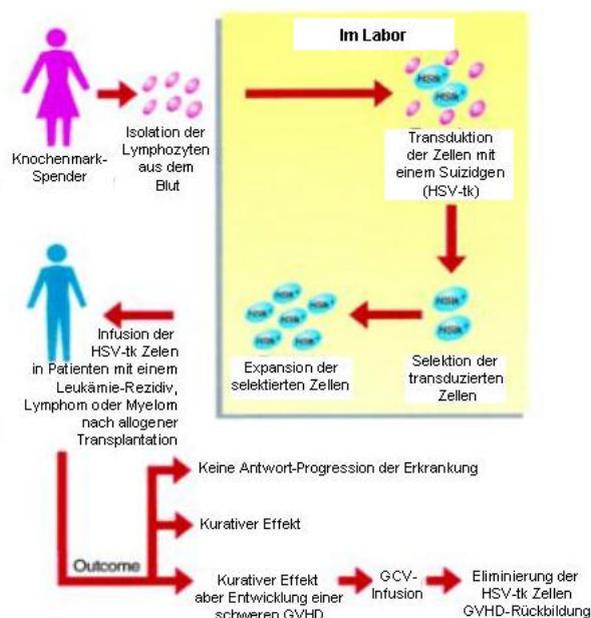


Abb. 14: DLI mit genetisch modifizierten T-Zellen (nach Link 2000). GCV = Ganciclovir; HSV-tk = Herpes simplex Thymidin Kinase; GVHD = graft-versus-host disease.

Während in adulten Patienten schon einige DLI-Studien mit modifizierten T-Zellen durchgeführt wurden (1.7.4) liegen für pädiatrische Patienten noch keine Daten vor. Wohl sind Infusionen von Spender T- oder NK-Zellen zur Unterstützung der Immun-Rekonstitution und zur Behandlung von MRD oder zur Prävention von Rezidiven durchgeführt worden (Bader 1999, Beck 2002), aber über die Anwendung von modifizierten Spender T-Zellen ist bisher noch nichts bekannt. Die Anforderungen an ein Kontrollsystem zur spezifischen Eliminierung der T-Zellen im Fall einer GVHD für pädiatrische Patienten soll eine effiziente Eliminierung der transduzierten Zellen im Falle einer GVHD Entwicklung-ermöglichen.

1.7.4 Klinische Studien mit HSV-tk exprimierenden T-Zellen

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene klinische Studien mit HSV-tk transduzierten T-Zellen in adulten Patienten durchgeführt. Zum einen wurden sie in Form von DLI's zur Prävention und Behandlung von leukämischen Rezidiven nach KMT (Bonini 1997) und als TCD-KMT (T-Zell depletierte Knochenmarkstransplantation) parallele T-Zell Infusion zur Verbesserung des Anwachsens des Transplantats eingesetzt (Tiberghien 2001). Bereits 1997 kamen in Italien in einer ersten klinischen Studie retroviral transduzierte T-Zellen zum Einsatz (Bonini 1997). Die T-Zellen wurden *ex vivo* für 3 Tage mit antiCD3 und hIL-2 prästimuliert und mit einem bicistronischen retroviralen Konstrukt (SFCMM-2), das als Selektionsmarker sowohl eine

zytoplasmatisch deletierte Version des *LNGFR* (dLNGFR, Bordignon 1995a) Gens enthielt als auch ein über einen internen TK-Promotor reguliertes Fusionsgen aus dem Selektionsmarker Neomycin-Resistenz und HSV-tk. Acht Patienten wurden mit eskalierenden Zell-Dosen (10^5 – 10^7 Zellen/kg) mit gentransduzierten T-Zellen behandelt. Nach Infusion konnten die Zellen in allen bis auf einen Patienten im peripheren Blut bis zu 12 Monate nachgewiesen werden. Drei Patienten entwickelten eine GVHD, wovon zwei nach GCV-Behandlung keine klinischen Zeichen der GVHD mehr aufwiesen, während bei dem dritten Patienten scheinbar Resistenzen auftraten, denn trotz GCV-Behandlung waren noch gentransduzierte Zellen nachweisbar. Zwei potentielle Limitierungen des Systems wurden in dieser Studie aufgezeigt:

- spezifische Immunität gegen die transduzierten Zellen (Verzeletti 1998)
- partielle Resistenz gegenüber GCV-vermittelter Eliminierung der transduzierten Zellen.

Eine zweite Studie wurde unter der Leitung von P. Tiberghien (2001) veröffentlicht. Die T-Zellen wurden ebenfalls mit einem bicistronischen retroviralen Vektor (G1Tk1SvNa) transduziert. Die Expression des *HSV-tk*-Gens unterlag der Kontrolle durch die virale LTR, während die Expression des Selektionsmarkers Neomycin durch einen internen SV40-Promotor reguliert wurde. Die gen-modifizierte Zellen (GMC) wurden parallel mit einem allogenen TCD Knochenmarkstransplantat infundiert (Anfangs-Dosis: 2×10^5 Spender CD3+ GMC/kgKG). In einigen Patienten folgten Infusionen von ansteigenden GMC-Dosen (bis zu 2×10^6 Spender CD3+ GMC/kgKG). Kurz nach der Transplantation bestand ein Großteil der zirkulierenden PBMC's (periphere mononukleäre Blut Zellen) aus GMC's, was auf eine initiale *in vivo* Expansion der Zellen hindeutete. Der Anteil der GMC's nahm jedoch rapide ab wofür es momentan noch keine nähere Erklärung gibt; möglicherweise kann ein solcher Effekt auf eine limitierte Überlebensrate oder eine veränderte Funktionalität der Zellen zurückzuführen sein (Tiberghien 2001). Drei der Patienten entwickelten eine aGVHD (schwerer als Grad I) und ein Patient entwickelte eine cGVHD. Die Patienten, die eine aGVHD entwickelten zeigten in Folge der GCV-Behandlung eine rasche Abnahme der GVHD-Anzeichen (innerhalb 24-48 hrs). Desweiteren resultierte die TCD-Transplantation und die zusätzlichen Infusionen der GMC's in der Induktion einer kompletten Remission (CR). Der Patient, der eine chronische GVHD entwickelte zeigte im Vergleich zu den aGVHD Patienten eine deutlich langsamere Abnahme der GVHD-Zeichen in Folge der GCV-Infusionen (6 Tage nach Behandlung). Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine DLI mit HSV-tk exprimierenden T-Zellen zum Zeitpunkt der KMT ohne akute Toxizität und mit GCV-sensitiver GVHD möglich ist. Weitere Studien sind jedoch nötig, um den Effekt einer DLI zur Verminderung des GVHD-Risikos, die

Resistenzbildung gegenüber GCV von HSV-tk exprimierenden Zellen (Garin 2001) sowie die Effizienz neuer oder optimierter Systeme zu analysieren.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

DLI's werden häufig zur präventiven Behandlung von Patienten mit drohenden Rezidiven eingesetzt. Der Remissions-unterstützende Effekt der DLI wurde außerdem bereits bei CML-Erkrankungen deutlich gezeigt, ebenso wie eine DLI-Dosisabhängigkeit im Rahmen der ALL- und AML-Erkrankungen beschrieben wurde. Problematisch gestaltet sich jedoch nach wie vor die mit einer DLI ebenfalls verbundene potentielle Gefahr einer GVHD-Entwicklung. Bisherige Möglichkeiten zur Verhinderung einer GVHD (T-Zell-Depletion, Gabe von Immunsuppressiva) sind mit erheblichen Nebeneffekten (schlechtes Anwachsen der Transplantation, erhöhtes Rezidivrisiko, erhöhte Infektionsgefahr) verbunden. Die Etablierung gentherapeutischer Maßnahmen eröffnete eine neuartige Möglichkeit der kontrollierten GVHD-Entwicklung im Kontext einer Immuntherapie: die gentechnische Veränderung der Spender T-Zellen mit einem Gen (Suizidgen), das durch spezifische Aktivierung die Zelle in die Apoptose treibt.

Ziel dieser Arbeit war es zwei verschiedene retrovirale Selektions/Suizid-Fusionsvektoren für den effizienten und stabilen Gentransfer in primäre humane T-Zellen zu entwickeln, die eine kontrollierte Eliminierung dieser Zellen nach Auftreten einer GVHD ermöglichen. Die retrovirale Basis der Vektoren sollte den effizienten und stabilen Gentransfer in die T-Zellen sicherstellen, das Selektionsmolekül sollte eine sehr gute Aufreinigung der Zellen (wenn möglich analog den GMP-Richtlinien) ermöglichen und das Suizidelement sollte für die effiziente und spezifische Eliminierung der transduzierten Zellen sorgen. Die Entwicklung von zwei Fusionsgenen (tCD34/HSV-tk39 und Δ LNGFR/Fv'Fv/DED) aus Selektions- und Suizidgen sollte die Möglichkeit eröffnen einen Vektor zu entwickeln, der durch den Einsatz von zwei Fusionsproteinen, die sich aus verschiedenen Elementen zusammensetzen, ein additives System darstellt, das zu einer verbesserten Effizienz gegenüber bereits existierenden „Systemen“ hinsichtlich Selektionierung und Eliminierung der Zellen führt. Erste Analysen sollten mit doppelt-transduzierten Zellen durchgeführt werden, um eine mögliche Effizienzverbesserung zu testen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarosegel-Apparatur	Life Technologies
Analysenwaage, R 160 P-D1	Sartorius
Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson
Autoklav	Integra Biosciences
Blotting-Papier	Whatman
Brutschrank, CO ₂ -begast	Heraeus CO ₂ Auto Zero
Dri-Block DB-BD	Techne
Elektrophoresekammern	Life Technologies, BioRad
Epics XL-MCL	Beckmann Coulter
Expositionskassette	Kodak
FACScan	Becton Dickinson
Filmentwicklungseinrichtung	Optimax, MS Laborgeräte
Gel-Fotografier-Einrichtung	BioRad
Gewebeschalen für die Zellkultur	Greiner
Immunomagnetische Säulen	Miltenyi Biotec
Kühlschrank (4° C, -20° C)	Liebherr
Magnettafel	Miltenyi Biotec
Mikroskop mit Fotoaufsatz	Leitz Aristoplan
Mikrowelle	Sharp
PCR-Cycler, Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
PCR-Cycler	BioRad
Petrischalen	Greiner
pH-Meßgerät	Knick Calimatic 761
Pipettenspitzen	Greiner
Pipettierhilfe, elektrisch	Hirschmann
Polypropylen-Röhrchen	Falcon
Power Supplies	Life Technologies, BioRad
Präseparationsfilter (200µm)	Miltenyi Biotec
PVDF-Membran	Roth
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Falcon
Röntgenfilm (Hyperfilm TM -MP)	Amersham Pharmacia Biotech
Schüttelinkubator, Brunswick Scientific G25	Nunc, Cellstar
Speedvac	Bachofer
Spektramax 340	MWG-Biotech
Spektrophotometer	BioRad
Sterilbank, LaminAir, HLB 2448	Heraeus
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	Millipore
Tiefkühltruhe (-80° C)	Revco
Transilluminator	UVP
Vakuumpumpe	Bachofer
Vortexer	Janke & Kunkel
Wasserbad	GFL-Juloba
Zählkammern	Hycor Biomedical Inc.

Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24- und 96 Loch-Platten)	Greiner, Costar
Zellschaber	Costar

2.1.2 Zentrifugen

Zentrifuge	Beckman mit den Rotoren JA-20, JA-10
Tischzentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415 C Heraeus Biofuge 13 Heraeus Labofuge 400 R Heraeus Megafuge 1.0, 1.0 R
Ultrazentrifuge	Beckman L8-80 M mit den Rotoren VTi 50, Vti 60 und Vti 80

2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien; Medien und Zusätze für die Zellkultur

Aceton	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Roth
Acyclovir	Ratiopharm
Agarose	Appligene
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Roth
AP20187	ARIAD Pharmaceuticals
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Brilliant Blue R (Coomassie Blau)	Roth
Bromphenolblau	Merck
Butanol	Roth
Caesiumchlorid	Roth
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
Chloroform	Roth
Chloroquine	Sigma-Aldrich
Cidofovir (Vistide)	Pharmacia
Desoxynucleotide (dNTP's)	Pharmacia
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
Enhanced Chemiluminescence (ECL)	Pierce
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	Seromed
Ganciclovir (Cymeven)	Hoffmann-La Roche
Gelatine	Sigma-Aldrich
Geneticin (G418)	Life Technologies

Glucose	Merck
L-Glutamin	Life Technologies
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Glycogen	Boehringer
Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS)	Sigma-Aldrich
HEPES	Roth
Humanes Serumalbumin (HSA)	DRK-BSD, Niedersachsen
Interleukin 2 (Il-2)	Chiron
Intraglobin	Biotest
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Laemmli-Puffer (Roti-Load)	Roth
LB-Agar (Lennox L Agar)	Life Technologies
LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	Life Technologies
Lysozym	Serva
Magnesiumchlorid	Roth
β -Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Milchpulver	Neuform
Mineralöl	Sigma-Aldrich
NAP-Säule (NAP TM -25 Column)	Pharmacia
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Nonidet P-40	Serva
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Biometra
Phenol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Phosphat gepufferte Salzlösung	PAA
Polybrene	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	BD-Pharmingen
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich
Protein-A/G-Agarose	Santa Cruz Biotechnologies
Protease-Inhibitoren Cocktail (complete TM)	Roche Diagnostics GmbH
Retronectin (CH296)	BioWhittaker-Takara Shuzo Co.
RPMI 1640 Medium	Life Technologies
Salzsäure	Roth
Sucrose	Sigma
TEMED	Roth
Tris	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Serva
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Life Technologies
Tween-20	Sigma-Aldrich

2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
Ampli-Taq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer

Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I)	New England Biolabs
MuLV Reverse Transkriptase	Perkin Elmer
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
RNase A	Sigma-Aldrich
RNasin (RNase-Inhibitor)	Promega
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Western Blot

Annexin V-FITC	BD-Pharmingen
Anti-CD34 (sc9590; Maus, monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology
Anti CD34 (Q BEND-10)	Dianova (BMA)
Anti-LNGFR (C40-1457; Maus, monoklonal)	BD-Pharmingen
Anti FKBP (PA1-026A, Kaninchen)	Dianova
Anti-Maus IgG-Peroxidase	Transduction Laboratories
Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase	Transduction Laboratories

2.1.5.2 FACS

Anti-CD34 (HPCA-1, -2)- PE/FITC/Cychrome	BD-Pharmingen
Anti-CD34 (QBEND-10)-FITC	Biozol
Anti-LNGFR (C40-1457)-PE	BD-Pharmingen
Anti-CD3 (17A2)-PE	BD-Pharmingen
Anti-CD4 (RPA-T4)-Cychrome	BD-Pharmingen
Anti-CD8 (RPA-T8)-PE	BD-Pharmingen
Anti CD133 (CD133-2)-PE	Miltenyi Biotec
FITC (Fluorescein-conjugated AffiniPure Fab Fragment Goat Anti Mouse IgG(H+L))	Dianova

2.1.5.3 T-Lymphozyten Aktivierung

Anti-CD3 (Orthoclone OKT-3)	Janssen-Cilag GmbH
Anti CD28 (Klon 28.2)	BD-Pharmingen

2.1.6 Marker und Größenstandards

BenchMark prestained protein ladder	Life Technologies
Smartladder	Eurogentec

2.1.7 Primer/Oligonukleotide

Für die Klonierung der retroviralen Konstrukte MtCD34tk39mw und MNFV'FVDED wurden verschiedene Primer entworfen, die von der Firma BIOSPRING GmbH synthetisiert wurden. Die einzelsträngigen Primer wurden, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, eingesetzt, um spezifische Zielsequenzen aus der Plasmid-DNA zu amplifizieren.

Um PCR-Produkte auf Basis genomischer DNA analysieren und quantifizieren zu können, wurde des weiteren ein Primerpaar konstruiert, das zu einer Amplifikation eines Teils des konstitutiv in jeder Zelle exprimierten β -Aktins verwendet werden konnte.

β -Actin Primer

ACTfor

5' – ATG ATA TCG CCG CGC TCG TCG TC –3'

ACTrev

5' – TTC TCG CGG TTG GCC TTG GGG TTC AG - 3'

2.1.8 Vektoren

2.1.8.1 Klonierungsvektoren (lineare Darstellung)

pBluescript KS	Stratagene
pCR [®] 2.1-TOPO	Invitrogen [™] Life Technologies
pNF2hmpl	A. Blau, Seattle, USA

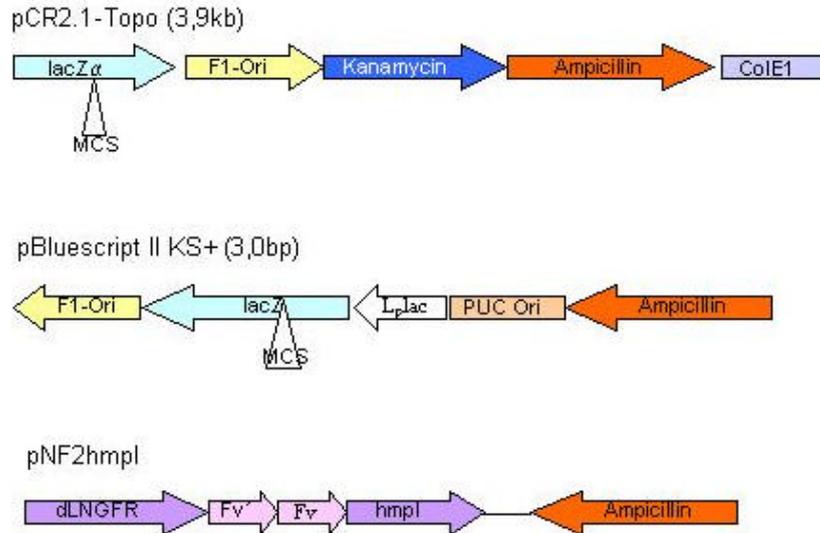


Abb. 15: Klonierungsvektoren. Für Zwischenklonierungsschritte. Beide Vektoren trugen ein Ampicillin-Resistenzgen, das die Selektion der positiven Klone ermöglichte. lacZ α = α Untereinheit des lacZ Gens, Kanamycin = Kanamycin Resistenzgen, Ampicillin = Ampicillin Resistenzgen, f1 ori = Origin of replication I, MCS = multiple cloning site, P lac = lac Promotor, M13 = M13 Primer binding site, T7 = T7 Primer binding site; dLNGFR = zytoplasmatisch trunkierte Version des *low-affinity-nerve-growth-factor receptor*, F36v' und F36v = FKBP-Dimerisierungsdomänen; hmpl = *human-myeloproliferative-leukemia*.

2.1.8.2 Eukaryotische Expressionsvektoren

pcDNA3.1V5/His/B und C

Invitrogen™ Life Technologies

pcDNA3.1V5/His/B-FADDED

GSH, Frankfurt

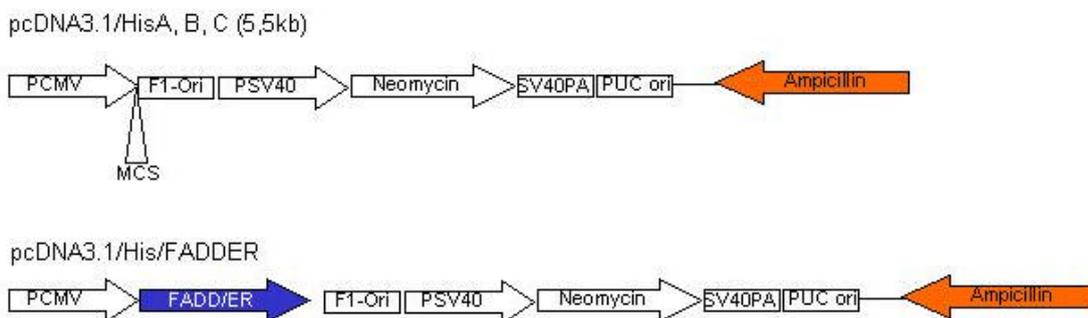


Abb. 16: Eukaryotische Expressionsvektoren. Der Vektor pcDNA3.1/HisB oder C wurde für Klonierungszwecke und Expressionsanalysen in eukaryotischen Zellen verwendet. P_{CMV} = CMV-Promotor; T7 = T7-Promotor; MCS = "multiple cloning site"; polyA = Polyadenylierungssignal; SV40 ori = "simian virus 40 replication origin"; SV40 poly A = "simian virus 40"-Polyadenylierungssignal; Neomycin (neo) = Neomycin-Resistenzgen; Amp = Ampicillin-Resistenzgen; der Vektor pcDNA3.1/HisB-FADDER enthielt die volle-länge Sequenz des humanen FADD-Proteins: FADD = humanes *Fas-associated-protein with death domain*; ER = muriner Östrogenrezeptor.

2.1.8.3 Retrovirale Vektoren

Die Vektoren, die als Ausgangsvektoren für die Konstruktion der therapeutisch relevanten retroviralen Vektoren dienen sind im Folgenden in Form von Plasmidkarten dargestellt:

SX	Stefan Stein, Frankfurt
SHX	Christopher Baum, Hannover
SXtCD34	GSH, Frankfurt
M(Nhe)	GSH, Frankfurt

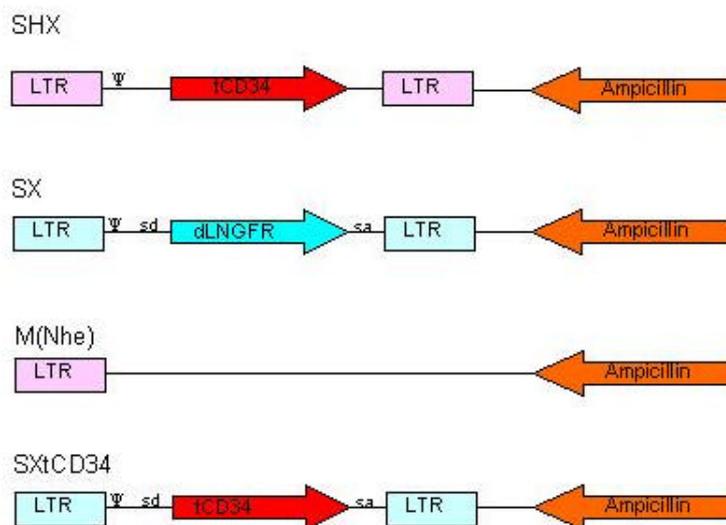


Abb. 17: Retrovirale Ausgangsvektoren. **SHX:** die 3'-LTR ("long terminal repeat") stammte aus dem „*murine proliferating sarcoma virus*“, während die 5'-LTR aus dem „*spleen focus forming virus*“ stammte. tCD34 = zytoplasmatisch trunkiertes humanes CD34-Gen, Amp = Ampicillin-Resistenzgen. (Baum 1995 und Fehse 2000), ΔLNGFR = trunkierter *low affinity nerve growth factor receptor* (Ruggieri 1997). **SX:** sowohl die 3', als auch die 5'-LTR stammten aus dem SFF-Virus. **M(Nhe):** 5'MPSV-LTR = LTR des *murine proliferative sarkoma virus*; AmpR = Ampicillin-Resistenz; **SXtCD34:** 5'SFFV-LTR = LTR des *spleen focus forming virus*; tCD34 = zytoplasmatisch trunkierte Version des humanen CD34-Moleküls.

2.1.9 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

One Shot™ (TOP 10F')

Invitrogen

Genotyp: F'*{lacI^f TN10(Tet^R)}*mcrA ? (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ?80*lacZ*?M15 ?*lacX74*
deoR recA1 araD139? (ara-leu)7697 gaU galK rpsL endA1 nupG

Stbl2™

Life Technologies

Genotyp: F *mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 gyrA96 thi supE44 relA1 λ'*
Δ(lac-proAB)

XL1-Blue

Stratagene

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac^fΔM15 Tn10 (Tet^R)*]

DH5α:

Stratagene

Genotyp: F ϕ 80d/*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)* U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1*

2.1.10 Medien für die Bakterienkultur

2.1.10.1 5fach LB-Flüssigmedium

Zur Herstellung von 5fach LB-Flüssigmedium wurden 100 g LB Broth Base pro Liter dH₂O eingewogen und autoklaviert. Vor Gebrauch wurden 100 ml 5fach LB-Medium mit autoklaviertem dH₂O auf 500 ml aufgefüllt und je nach Bedarf das gewünschte Antibiotikum zugesetzt. Das 1fach Medium mit Antibiotika-Zusatz konnte bis zu 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.1.10.2 LB-Agar

Zur Herstellung von LB-Agar wurden 32 g LB-Agar pro Liter dH₂O eingewogen und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde der Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und auf 10 cm Petrischalen verteilt (ca. 15 ml/Schale). Nachdem der Agar gelatinisiert war, konnten die Platten für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Arbeiten mit *E. coli* und Präparation von Plasmid- und genomischer DNA

2.2.1.1 Transformation kompetenter Bakterienstämme

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von DNA in kompetente Bakterien: 50 µl tiefgefrorene (-80 °C) CaCl₂-kompetente Bakterien wurden auf Eis

aufgetaut. Die entsprechende DNA-Menge (z. B. 1/10 vol Ligationsansatz oder 1 ng–10 ng Plasmid-DNA für eine Retransformation) wurde vorsichtig mit den Zellen gemischt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen kurzen Hitzeschock von 42 °C für 45 sec wurden die Zellen für die DNA-Aufnahme permeabel gemacht. Unmittelbar danach wurden sie nochmals für 2 min auf Eis gekühlt, bevor sie auf LB-Agar Platten (mit dem jeweiligen Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert wurden. In der Regel hatten die hier verwendeten Plasmide eine kodierende Sequenz für das *Ampicillin-Resistenz-Gen*, so dass eine Selektion der positiven Transformanden möglich war. Nach 24 Stunden wurden die Kolonien zur Expansion von der Platte gepickt und in 3 ml LB-Flüssigmedium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) unter Schütteln (37 °C, 175 rpm) über Nacht kultiviert.

2.2.1.2 Plasmid Minipräparation durch alkalische Lyse (Miniprep)

Diese Methode wurde zur Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA (5 µg– 10 µg) aus einer 3 ml Übernachtskultur (ü/N) durchgeführt. Je 2 ml Übernachtskultur wurden in Eppendorf-Gefäßen für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Bakterienzellen wurden in 300 µl TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; RNaseA) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Lysispuffer (200 mM NaOH; 1 % [w/v] SDS) wurden die Zellen durch vorsichtiges Invertieren lysiert. 300 µl 3 M KAc, pH 4,8 wurden zur Neutralisierung der Proben zugefügt, gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm, um die ausgefallenen Proteine, Membranbestandteile und chromosomale DNA zu sedimentieren. Die niedermolekulare Plasmid-DNA im Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe von 0,6 vol 100 %igem Isopropanol gefällt. Die Proben wurden für 20 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert, um die gefällte DNA zu pelletieren. Nach zweimaligem Waschen der Plasmid-DNA mit 70 % [v/v] Ethanol und Trocknen, wurde die DNA in 25 µl TE (10 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA) oder dH₂O resuspendiert.

2.2.1.3 Plasmid Maxipräparation über Caesiumchlorid-Dichtegradienten Zentrifugation

Um besonders reine Plasmid-DNA für Arbeiten in der Zellkultur zu gewinnen, wurde eine Maxipräparation über eine zweifache Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. 5ml Übertag (ü/T) Kultur transformierter Bakterien wurden zu 500 ml LB^{Amp}-Medium gegeben und ü/N bei 37 °C im Schüttler (175 rpm) inkubiert. Die

Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert (Rotor JA-10, Beckman-Zentrifuge), der Überstand verworfen und die Bakterienzellen in 10 ml gekühltem Sucrose-Puffer (25 % [w/v] Sucrose; 25 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert. Die Probe wurde in ein 30 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die Bakterienlyse durch Zugabe von 2,5 ml Lysozymbilösung (10 mg/ml Lysozym; 25 mM Tris-HCl, pH 8) und 5minütige Inkubation bei 4°C eingeleitet. Anschließend wurden 1,3 ml 0,25 M EDTA, pH 8 zugegeben und die Probe für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 10 ml gekühltem Triton-Lysis-Mix (0,3 % [v/v] Triton X-100; 187 mM EDTA; 15 mM Tris-HCl, pH 8) und anschließender 10minütiger Inkubation im 45 °C-Wasserbad. Das viskose Gemisch wurde 30 min bei 4 °C und 20.000 rpm zentrifugiert (Rotor JA-20, Beckman-Zentrifuge), um Zelltrümmer und chromosomale DNA zu sedimentieren. Unmittelbar nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen zur Volumenbestimmung überführt. Pro ml Überstand wurde 1 g CsCl eingewogen und bis zum vollständigen Lösen des Caesiumchlorids in einem 40 °C-Wasserbad inkubiert. Es folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 20 °C und 3.200 rpm (Heraeus-Megafuge 1.0 R), um die gefällten Proteine abzutrennen. Der Überstand wurde in ein VTi50-Röhrchen, in das 50 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) vorgelegt waren, überführt, mit CsCl-Lösung (1 g CsCl/ml TE) aufgefüllt und das Röhrchen verschlossen. Die Probe wurde für mindestens 18 h bei 20 °C, 50.000 rpm und ohne Bremse in der Beckman-Ultrazentrifuge (Rotor VTi 50) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren aufgrund der Ethidiumbromid-Einlagerung zwei rosafarbene Banden sichtbar: die untere Bande enthielt Plasmid-DNA, während die obere Bande genomische DNA sowie nach Strangbrüchen linearisierte Plasmid-DNA enthielt. Eine weitere Bande, die als vertikaler Streifen am Innenrand des Röhrchens sichtbar war, enthielt RNA. Die untere Plasmid-Bande wurde abgezogen und in ein VTi80-Röhrchen überführt. Die zweite Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte ü/N bei 20 °C, 20.000 rpm und ohne Bremse im Rotor VTi 80. Die DNA-Bande wurde erneut abgezogen und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Das Ethidiumbromid wurde durch mehrmaliges Waschen mit TE-gesättigtem n-Butanol extrahiert und die DNA über einen NAP-25-Säulen-Lauf entsalzt. Zur DNA-Fällung wurden 1/10 vol. 3 M NaAc, pH 7, sowie 7/10 vol. Isopropanol hinzugegeben und 20 min bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert (Heraeus-Megafuge 1.0 R). Anschließend wurde das DNA-Pellet noch dreimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 500 µl TE aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde mit einem Spektrometer (BioRad) bestimmt.

2.2.1.4 Plasmid Maxipräparation über JETstar Genomed-Säulen (Kombination aus modifizierter alkalischer Lyse und Anionen Austausch Harz)

300 ml LB^{Amp} Medium wurden mit 3ml ü/T-Kultur angeimpft und ü/N bei 37 °C und 175 rpm inkubiert. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (5000 rpm; 4°C; 10 min, JA20-Rotor, Beckman Zentrifuge) pelletiert und in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 mg/ml RNase) resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) und Inkubation bei RT für 5 min wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 10 ml Puffer 3 (3,1 M Kalzium Acetat; pH 5,5) neutralisiert, 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (15.000 rpm; 18 °C; JA10, Beckman Zentrifuge), um die gefällten Proteine, Membranbestandteile und genomische DNA zu entfernen. Parallel dazu wurden die Säulen (Anionen-Austauscher) mit 30 ml Puffer 4 (600 mM NaCl; 100 mM Natrium Azetat; 0,15% Triton X-100, pH 5) äquilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand auf die äquilibrierten Säulen gegeben und einmal mit 60 ml Puffer 5 (800 mM NaCl; 100 mM Natrium Azetat; pH 5) gewaschen. Durch Zugabe von 15 ml Puffer 6 (1,25 M NaCl; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5) wurde die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA eluiert. Mit 0,6 vol. 100 %igem Isopropanol wurde die eluierte DNA gefällt, 40 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und anschließend noch zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen (4.000 rpm; 4°C; 10 min). Nachdem die DNA bei RT getrocknet war, wurde sie in 400 µl dH₂O gelöst. Die DNA Gehaltsbestimmung erfolgte an einem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.2.1.5 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten eukaryotischen Zellen mit dem DNeasy Kit (Qiagen)

Die Isolation der gesamten zellulären DNA basierte auf einer Silikagel-Membran Technologie. Die Puffer waren so konzipiert, dass nach einer direkten Zell-Lyse die DNA an die DNeasy Membran gebunden und nach mehrmaligen Waschschrinen von dieser wieder durch Änderung des pH-Werts eluiert wurde.

Maximal 5×10^6 Suspensions-Zellen wurden pelletiert (1500 rpm; 5min; 4°C) und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde im Anschluss daran in 200 µl PBS resuspendiert und für 2 min bei RT in Anwesenheit von 2 mg/ml Rnase A inkubiert. Im Folgenden wurden 20 µl Proteinkinase K (zur Lyse) und 200 µl Puffer AL zugegeben, gut gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Durch die Zugabe und das Mischen von 200 µl Ethanol (96 %- 100 %) wurde die genomische DNA gefällt und der gesamte Ansatz wurde auf eine DNeasy Säule gegeben. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation

bei RT und 8000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und die an die Säule gebundene DNA mit 500 µl Waschpuffer (AW1) in einem weiteren Zentrifugationsschritt gewaschen. Die gebundene DNA wurde ein zweites Mal mit 500 µl Waschpuffer (AW2) bei 13.000 rpm für 3 min RT gewaschen. Anschließend wurde die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA 2x mit je 100 µl Elutionspuffer (AE) bei 8.000 rpm für jeweils 1 min eluiert. Der DNA Gehalt wurde im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.1.6 Isolierung von mRNA aus kultivierten Zellen (Oligotex, Qiagen)

Die meisten eukaryotischen mRNAs sind polyadenyliert und enthalten aus ca. 20-250 Adenosin-Nukleotiden bestehende Sequenzen an ihren Enden. Im Gegensatz zu rRNAs und tRNAs, die bis zu 95 % des zellulären RNA-Gehalts ausmachen, stellen die mRNAs einen eher geringen Anteil mit 1%-5 % dar, abhängig von dem jeweiligen Expressionsstatus der Zellen. Poly-A⁺ mRNAs können über eine Hybridisierung des polyA-Anteils mit einem dT-Oligomer, das an eine Festphasenmatrix gekoppelt ist, aufgereinigt werden. Die Hybridisierungsreaktion erfordert hohe Salzkonzentrationen, so dass die Hybride durch Verringerung der Ionenstärke geschwächt werden und die mRNA somit wieder eluiert werden kann.

1×10^6 – 2×10^7 Zellen wurden für 5 min zentrifugiert (300 x g; 4 °C). Danach wurden durch Zugabe des entsprechenden Volumens (abhängig von der eingesetzten Zellzahl) Puffer OL1 (enthält β ME) die Zellmembran sowie die Membranen der Organellen zerstört, um sämtliche RNA herauszulösen. Der Ansatz wurde gut gemischt und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch eine Spritze mit einer Nadel (0,9 mm im Durchmesser) homogenisiert. Dadurch wurde die Viskosität der Probe reduziert, wobei die hoch-molekulare genomische DNA sowie andere hoch-molekulare Komponenten geschert wurden. Durch Zugabe des entsprechenden Volumens (abhängig von der Ausgangszellzahl) von Puffer ODB und anschließende Zentrifugation (3 min; 13.000 rpm; RT) wurden Proteine und andere Zellbestandteile eliminiert und optimale Konditionen für die Hybridisierung der Oligotex Suspension mit der poly-A mRNA hergestellt. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, mit der entsprechenden Menge an Oligotex Suspension gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (5 min; 13.000 rpm; RT) wurde der mRNA Hybrid-Komplex pelletiert und im Anschluss in einem ersten Schritt mit 100 µl Puffer OL1 resuspendiert. Zusätzlich wurden noch 400 µl Puffer ODB hinzugegeben, gemischt und zuerst für 3min bei 70 °C und anschließend für weitere 10 min bei RT inkubiert, um die mRNA Ausbeute zu erhöhen. Der mRNA Hybrid-Komplex wurde nochmals zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm; RT) und in dem

entsprechenden Volumen Puffer OW1 resuspendiert. Diese Suspension wurde auf eine Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Während zweier weiterer Zentrifugationsschritte mit Puffer OW2 wurden unerwünschte Zellbestandteile eliminiert. Durch Zugabe von 50 µl 70 °C warmen OEB-Puffers wurde die mRNA durch einen Zentrifugationsschritt (1 min; 13.000 rpm; RT) von der Säule eluiert. Es bestand die Möglichkeit die Effizienz der RNA-Isolierung zu erhöhen, indem ein zweiter Elutionsschritt angeschlossen wurde.

2.2.1.7 Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode

Ein Aliquot der gewünschten Bakterien wurde mit einer sterilen Impföse auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. 5ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und ü/N bei 37 °C und 175 rpm inkubiert. Mit 1ml der ü/N Kultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 175 rpm inkubiert, bis die Bakterienkultur eine OD_{595nm} von 0,4 bis 0,6 erreichte. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt. Alle nachfolgenden Schritte fanden ebenfalls auf Eis bzw. unter Kühlung und mit vorgekühlten Lösungen und Arbeitsmaterialien (Pipetten, Zentrifugenbecher) statt. Die Bakterien wurden zentrifugiert (2.500 rpm; 10 min; 4 °C), und das Pellet in 150 ml TFB I-Puffer (15 % [v/v] Glycerin; 10 mM Kalziumchlorid; 30 mM Kaliumacetat, pH 5,8; 100 mM Rubidiumchlorid; 50 mM Manganchlorid) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde nochmals zentrifugiert (2.500 rpm; 10 min; 4 °C), das Pellet in 20 ml TFB II-Puffer (15 % [v/v] Glycerin; 10 mM MOPS, pH 7; 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂) aufgenommen und die Bakterien sofort à 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Restriktion von Plasmid-DNA

Bei den für den Verdau von Plasmid-DNA verwendeten Enzymen handelte es sich um Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die innerhalb spezifischer Basensequenzen Phosphodiester-Bindungen im doppelsträngigen DNA-Molekül spalten. Dabei entstanden entweder glatte Enden („blunt ends“) oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden („sticky ends“).

Für einen Restriktionsansatz zu analytischen Zwecken wurden 0,5 µg – 1 µg Plasmid-DNA mit etwa 5fachem Enzymüberschuss (5 U Enzym/µg DNA) im vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer während 1 – 2 stündiger Inkubation bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur eingesetzt. Im Falle von Doppelrestriktionen mit Enzymen, die im selben Reaktionspuffer schnitten, wurden beide Enzyme gleichzeitig in den Restriktionsansatz gegeben. Benötigten die Enzyme jedoch unterschiedliche Reaktionspuffer, so wurde die DNA sequentiell verdaut und zwischen den einzelnen Restriktionsansätzen mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.2.4) aufgereinigt. Zur Kontrolle wurden die Restriktionsansätze auf Agarosegelen (1 %) aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt (2.4).

Ein präparativer Restriktionsansatz unterschied sich lediglich durch die eingesetzten DNA Mengen (5 µg – 20 µg).

2.2.2.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Auf diese Weise wurde die Möglichkeit der Rezirkulation des durch Restriktionsverdaus linearisierten Vektors (ohne Insert) reduziert. Das Enzym Alkalische Phosphatase (*Calf intestinal*, CIP) katalysiert den Abbau von 5'Phosphat-Resten, die für eine Ligation benötigt werden und verhindert somit die Selbstligation des Vektors.

Diese Reaktion wurde direkt im Anschluss an eine Restriktion durchgeführt. Zu dem Restriktionsansatz wurde die entsprechende Menge an CIP-Puffer (10 fach) sowie 1 µl CIP (0,5 U/µg Vektor) gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend über eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.2.4) oder Gelextraktion (2.4.1.1) aufgereinigt.

2.2.2.3 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden

DNA-Enden mit 5'-Überhängen wurden nach Bedarf mit Hilfe des Klenow-Fragments (große Untereinheit der DNA-Polymerase I von *E. coli*) zu glatten Enden aufgefüllt. Das Enzym war in jeglichen Puffern der NEB (New England Biolabs)-Enzyme aktiv. Dem Ansatz der zuvor geschnittenen DNA wurden lediglich noch dNTP's (33 µM Endkonzentration) und Klenow-Enzym (1 U/µg DNA) zugefügt und für 15 min bei 25 °C inkubiert.

Zur Glättung von 3'-überhängenden Enden konnte ebenfalls das Klenow-Fragment verwendet werden, denn dieses verfügte neben seiner Polymeraseaktivität auch über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. In diesem Fall wurden die überhängenden Enden nicht aufgefüllt sondern abgebaut, so dass ein 2 – 4 Nucleotide kürzeres Fragment entstand. Die Reaktion wurde analog der Auffüllreaktion durchgeführt. Das Enzym wurde durch

Zugabe von EDTA (10 mM Endkonzentration) und 20-minütige Inkubation bei 75 °C inaktiviert.

2.2.2.4 Phenol-Chloroform Extraktion zur DNA Aufreinigung

Zur Aufreinigung der DNA nach Restriktionen oder anderen enzymatischen Behandlungen, auf die keine Gelextraktions-Aufreinigung (Qiaex, Qiagen, Hilden, 2.4.1.1) erfolgte, wurde die DNA mit Hilfe der Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt. Der DNA-Ansatz wurde auf ein Volumen von 200 µl mit dH₂O aufgefüllt, mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemischs (25/24/1) versetzt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert (3 min; 13.000 rpm; RT). Die obere, wässrige, DNA enthaltende Phase, wurde abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. In einem nächsten Schritt wurde der verbliebene Phenolanteil eliminiert, indem das gleiche Volumen (200 µl) Chloroform hinzugegeben, gemischt und zur Phasentrennung wieder zentrifugiert wurde. Die obere, wässrige Phase, die die DNA enthielt, wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 1/10 vol. 3M NaAc, pH 7, sowie 2 vol. Ethanol (100 %) gemischt, um die DNA zu fällen. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm wurde die pelletierte DNA zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen TE (10 mM Tris, pH 8; 10mM EDTA) aufgenommen.

2.2.2.5 Ligation von DNA

Bei einer Ligation werden zwei DNA-Enden miteinander verknüpft. Die Reaktion wird durch DNA-Ligasen katalysiert, wobei Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe gebildet werden.

Ein Standard-Ligationsansatz setzte sich aus 10 ng – 50 ng Vektor-DNA, 3–10fachem molaren Überschuss an Insert-DNA, Ligasepuffer und 400 U T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 10 µl – 20 µl zusammen.

Die einzusetzende Insertmenge bei vorgegebener Vektormenge wurde entweder nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \cdot \text{Insertgröße [kb]}}{\text{Vektorgöße [kb]}} \cdot \text{molare Ratio Insert / Vektor}$$

oder über Quantifizierungs-Agarosegele (2.4.2) bestimmt.

Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16 °C. Um die Effizienz des Vektorverbaus und somit die Fähigkeit zur Selbstligation zu überprüfen wurde in dem nachfolgenden Transformationsansatz (2.2.1.1) eine Ligationskontrolle ohne Insert mitgeführt.

2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglichte die *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Fragmente und wurde in dieser Arbeit zur Einführung von Schnittstellen in DNA-Fragmente, zur Vervielfältigung von zu klonierenden DNA-Fragmenten und zur Vorbereitung der Sequenzierung genomischer DNA eingesetzt. Die Reaktionen wurden in „Thermocyclern“ der Firmen Perkin Elmer oder BioRad durchgeführt.

2.3.1 Amplifizierung von DNA-Sequenzen durch PCR

Um eine spezifische Sequenz für einen weiteren Klonierungsschritt mit bestimmten Restriktionsschnittstellen zu amplifizieren, wurde ein Standard PCR-Protokoll durchgeführt, dessen Zyklusprofil und Zusammensetzung im Folgenden beschrieben ist. In Abhängigkeit von den verwendeten Primern variierte die Annealingtemperatur zwischen 57 °C und maximal 62 °C. Ebenso spielte die Größe des zu amplifizierenden Fragments eine Rolle, durch die die Länge des Denaturierungs-, des Annealings- und des Elongationsprozesses beeinflusst wurde. Je größer das Fragment, umso länger die einzelnen Zeitabschnitte. Die genaueren Angaben dazu sind in den jeweiligen Ergebnisteilen zu finden.

Eine Reaktion lief in drei Phasen ab, die zum Teil in mehrfachen (20 – 35) Zyklen wiederholt wurden. Im ersten Schritt wurde der DNA-Doppelstrang („*template*“) durch Erhitzen (94 °C) **denaturiert**, so dass im zweiten Schritt die strangspezifischen Primer an die einzelsträngig vorliegende DNA **hybridisieren** konnten („*annealing*“). Im letzten Schritt erfolgte das durch die Polymerase katalysierte **Auffüllen** („*elongation*“) der Stränge mit dNTPs um einen Doppelstrang zu generieren. PCR-Ansätze von Fragmenten, die für weitere Klonierungsschritte oder für weiterführende Sequenzierungsreaktionen verwendet wurden, wurden mit der Pfu-Turbo (Stratagene) Polymerase durchgeführt, die über eine sog. „*proof-reading*“ Funktion verfügte und eine geringere Mutationsfrequenz aufwies als die Ampli-Tag Polymerase (Perkin Elmer), die für Kontroll-PCRs verwendet wurde.

In der folgenden Tabelle (Tab. 6) ist das Standard-Protokoll mit der Zusammensetzung der einzelnen Reaktionskomponenten aufgeführt.

PCR-Ansatz:	PCR-Programm A:
10-100 ng Plasmid-DNA	5 min – 94 °C
1,5 mM MgCl ₂	
6 % DMSO	1 min – 94 °C
25 µM Vorwärts-Primer	1 min – 60 °C
25 µM Rückwärts-Primer	2 min – 72 °C
0,2 mM dNTPs	} 28 Zyklen
5 µl 10fach PCR-Puffer	
2,5 U <i>Pfu Turbo</i> -Polymerase	10 min – 72 °C
ad 50 µl dH₂O	

Tab. 6: Standard PCR-Protokoll.

Die PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen und das gewünschte Produkt aus dem Gel isoliert. Danach wurde es mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut, durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung aufgereinigt, um für eine Ligation mit dem entsprechend verdauten Vektor eingesetzt zu werden.

2.3.2 Mutagenese-PCR

Die HSV-TK Sequenz enthält ein kryptisches „Spleiß-System“, bestehend aus „Spleiß-Donor“ (CAGG/GTGA) und „Spleiß-Akzeptor“ (CCAG/GCCG), das zu möglichen Resistenzbildungen in den transduzierten Zellen führen kann (3.2.2.3). Um den „Spleiß-Mechanismus“ zu inaktivieren wurden 3 Basen in der „Spleiß-Donor“ Sequenz durch spezifische Punktmutagenese mutiert. Dazu wurde der „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Für die Reaktion wurden zwei komplementäre Oligonukleotid-Primer entworfen (Tab. 16), die die gewünschten Mutationen enthielten. Die PCR wurde mit der *Pfu Turbo*-DNA-Polymerase nach folgendem Protokoll durchgeführt (Tab. 7):

PCR-Ansatz Mu1:	PCR-Programm Mu1:
1 µl Template-DNA [5; 10; 20 oder 50 ng/µl]	30 sec – 94 °C
1,25 µl Vorwärts-Primer [100 ng/µl]	} 20 Zyklen
1,25 µl Rückwärts-Primer [100 ng/µl]	
5 µl 10fach Reaktionspuffer	
7,5 µl dNTP-Mix [5 mM]	
1 µl <i>Pfu Turbo</i> -Polymerase [2,5 U/µl]	14 min – 68 °C
ad 50 µl dH₂O	14 min – 68 °C

Tab. 7: Protokoll der Mutagenese PCR.

Unmittelbar nach der PCR-Reaktion wurde der komplette Ansatz einem *DpnI*-Verdau unterzogen. Dieses Enzym schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, nicht aber unmethylierte. Demzufolge sollte die als *template* eingesetzte Plasmid-DNA, die aus einem Bakterienstamm mit *dam*-Methylierungssystem präpariert wurde, durch *DpnI* geschnitten werden. Die während der PCR-Reaktion neu synthetisierte DNA war dagegen nicht methyliert und sollte daher auch nicht geschnitten werden, so dass eine Selektion der neu-synthetisierten DNA stattfinden konnte. Nach der *DpnI*-Reaktion wurde 1/10 des Ansatzes in 50 µl kompetente XL-1-Blue Bakterien transformiert, die mit Hilfe ihres Reparatursystems die "genickte" DNA wieder zu einem Plasmid ligierten, so dass Ampicillin-resistente Kolonien wachsen konnten. Die daraus präparierte DNA wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierungsreaktion auf die gewünschte Mutation hin analysiert.

2.3.3 RT-PCR

Um die Sequenz des CD133-Oberflächenmarkers in einen Expressionsvektor zu klonieren, wurde eine RT-PCR von isolierter CD133 mRNA (aus WERI-RB01 Zellen) nach folgendem Protokoll (GeneAmp-Kit, Perkin-Elmer) durchgeführt (Tab. 98).

Master-mix	PCR-Programm A:
5 mM MgCl ₂	10 min RT
2 µl 10xPCR Puffer	
1 mM dGTP	15 min 42 °C
1 mM dCTP	5 min 99 °C
1 mM dATP	5 min 5 °C
1 mM dTTP	} 1 Zyklus
1 U/µl Rnase Inhibitor	
2,5 U/µl MuLV Reverse Transkriptase	
2,5 µM Oligo d(T) ₁₆	
<u>3 µl mRNA Probe</u>	
20 µl Gesamtansatz	

Tab. 8: Protokoll der RT-PCR. Umschreiben der mRNA in c-DNA.

Auf diese Weise wurde die mRNA Sequenz in cDNA-Sequenz umgeschrieben, die im Folgenden in einer normalen PCR-Reaktion als „*template*“ eingesetzt wurde (Tab. 9).

Master-Mix RT:	PCR-Protokoll:
2 mM MgCl ₂	5 min 95 °C
8 µl 10xPCR Puffer	
65 µl dH ₂ O	1,5 min 95 °C
<u>1 µl Pfu-Polymerase</u>	1,5 min 61 °C
78 µl Gesamtvolumen/ RT Reaktion (20 µl)	3 min 72 °C
	} 35 Zyklen
Zugabe von 0,1 µg/µl Primer	
	10 min 72 °C

Tab. 9: PCR-Reaktion in Folge einer RT-PCR.

Über die Primer wurden endständige Schnittstellen eingeführt, so dass die cDNA Sequenz des CD133-Moleküls nach Verdau für die weitere Klonierungen in einen Expressionsvektor eingesetzt werden konnte.

2.3.4 Semiquantitative PCR

Um in vergleichenden Tests semiquantitative Aussagen über die eingebaute Kopienzahl der transduzierten Vektor-DNA treffen zu können, wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe der Plasmid-DNA auf genomischer wt DNA diente als Quantifizierungsstandard. Die Plasmid-DNA wurde auf verschiedene Anzahlen von Kopien/Zelle verdünnt (exakte Berechnung siehe Ergebnisteil), wobei die höchste Anzahl bei 9 Kopien/Zelle lag und um den Quotient 3 auf bis zu 0,1 Kopien/Zelle verdünnt wurde. Folgende Formeln dienten zur exakten Berechnung der Verdünnungsreihe:

$$1 \mu\text{g von } 1000 \text{ bp} = 1,52 \text{ pmol} = 9,1 \times 10^{11} \text{ Kopien}$$

$$1,52 \text{ pmol} / \text{bp Plasmid} \times 1000 \text{ bp} = n \text{ pmol für } 1 \mu\text{g Plasmid-DNA}$$

$$n \text{ pmol Plasmid (1 } \mu\text{g)} \times 9,1 \times 10^{11} \text{ Kopien} / 1,52 \text{ pmol} = n \text{ Kopien Plasmid (1 } \mu\text{g)}$$

$$1 \mu\text{g genomische DNA} = 150.000 \text{ Zellen}$$

$$150.000 \text{ Kopien} = 1 \text{ Plasmid-Kopie/Zelle}$$

Die Primer für diese Art der PCR wurden so gewählt, dass ein Produkt amplifiziert wurde, das in der Größenordnung zwischen 100 bp und 400 bp lag. Die einzelnen Plasmidverdünnungen wurden auf jeweils 1 μg genomischer wt DNA eingesetzt, um eventuelle unspezifische Bindungen der Primer auf dem großen Genom zu detektieren (Tab. 10).

<u>Master-Mix semi1:</u>	<u>PCR-Protokollsemi1:</u>	
0,3 pmol forward Primer	5 min 94 °C	
0,3 pmol reverse Primer	} 27x	
1 mM dNTP's		1 min 94 °C
5 μl 10x Taq-Puffer		1 min 59 °C
3,5 mM MgCl ₂	2 min 72 °C	
<u>1 U Taq Polymerase</u>		
50 μl Gesamtansatz	10 min 72 °C	
	∞ 4 °C	

Tab. 10: Semiquantitative PCR zur Analyse der integrierten proviralen Kopienzahlen.

Die Ansätze wurden anschließend auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe der Software des Quantity One Systems (BioRad) quantifiziert. Durch die Standardkurve der Plasmid-Verdünnungen konnten Aussagen über die Kopienzahl der integrierten Vektoren in die transduzierten Zellen getroffen werden.

2.3.5 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in dH₂O mit einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst. Zur Hybridisierung wurden je 8 µg der beiden komplementären Oligonukleotide in einem 20 µl-Reaktionsansatz mit 2 µl 10 x Annealing-Puffer (0,5 M NaCl; 0,2 M Tris, pH 7,4) und 2 µl dH₂O gemischt und in einem mit Wasser gefüllten Becherglas 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Hybridisierung erfolgte während des Abkühlens des Reaktionsansatzes von 95 °C auf RT. Da die Oligos bereits mit überhängenden Enden konstruiert waren, mussten keine weiteren Restriktionsverdauungen angeschlossen werden.

2.4 Agarosegele

2.4.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle enthalten ein Zucker-Phosphat-Rückgrat, das ihnen eine negative Ladung verleiht. Sie wandern daher in der Gelelektrophorese zur Anode; je größer die Moleküle sind, um so langsamer wandern sie. Zur Auftrennung von großen Fragmenten wählte man deshalb ein Gel mit niedrigerer Agarosekonzentration als zur Auftrennung von kleineren Fragmenten. Je nach zu erwartender Fragmentgröße wurden 0,7 bis 2%ige Gele verwendet. Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 7,8; 5 mM EDTA) in der Mikrowelle erhitzt, bis es vollständig gelöst war. Nach Abkühlung wurde die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, auf einen Gelträger gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm wieder entfernt. Um das Absinken der Proben in die Geltaschen zu erleichtern, wurden diese vor dem Auftragen mit der entsprechenden Menge an 5fach-Auftragspuffer (20 % [w/v] Ficoll 400; 100 mM EDTA; 0,025 % [w/v] Xylencyanol und 0,025 % [w/v] Bromphenolblau) gemischt und anschließend bei einer Spannung von 100 V bei einem Elektrodenabstand von 10 cm aufgetrennt. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen

wurde ein Größenstandard (Smartladder) mit auf das Gel aufgetragen. Aufgrund der Einlagerung des Ethidiumbromids fluoresziert die DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) rot-orangefarbig. Die DNA-Fragmente konnten deshalb auf einem Transilluminator angesehen und bei Bedarf fotografiert werden.

2.4.1.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen für Klonierzwecke wurde der Kit „Qiaex® II“ der Firma Qiagen verwendet. Nach dem Schneiden durch das jeweilige Restriktionsenzym oder eines PCR-Ansatzes und der Auftrennung über ein Agarosegel wurde die Bande, die das gewünschte DNA-Fragment enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Kits basiert auf der Verwendung eines Silica-Materials, an das DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze bindet. Nach zwei Waschstufen konnte die DNA durch Lösungen mit geringeren Salzkonzentrationen (z. B. TE oder H₂O mit einem pH Wert von ca. 8) wieder von den Silica-Partikeln eluiert und weiterverwendet werden.

2.4.1.2 Isolierung von DNA Fragmenten kleiner als 400 bp aus Agarosegelen (QIAquick \hat{a} Spin Kit, Qiagen)

Dieses System kombinierte die bewährte Säulenzentrifugations-Technologie mit den selektiven Bindungsmöglichkeiten einer speziell entworfenen Silikagel Membran. Die Puffer wurden so konzipiert, dass sie eine effiziente Rückgewinnung der DNA und die Eliminierung von Kontaminanten ermöglichten. Die Adsorption der DNA an die Silikagel Oberfläche passiert lediglich in Gegenwart von hohen Konzentrationen chaotroper Salze, die die Struktur von Wasser modifizieren. Somit ist die DNA-Adsorption pH-abhängig: am effizientesten im Bereich $\leq 7,5$ und wird deutlich reduziert durch Erhöhen des pH Werts. Das Protokoll ist ähnlich dem Qiaex Protokoll. Die Gelbande wurde isoliert, gewogen, mit dem 3fachen Volumen an Puffer QG gemischt und für 10 min bei 50 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol wurde die Rückgewinnung von Fragmenten < 500 bp deutlich erhöht. Dieser Ansatz wurde auf eine Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um die DNA an die Säulenmatrix zu binden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 μ l Puffer QG gewaschen, um die möglicherweise verbliebenen Agarosereste zu entfernen. Im Anschluss wurde die Säule nochmals mit 750 μ l Puffer PE gewaschen, zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule nochmals zentrifugiert, um alles restliche

Ethanol des Waschpuffers zu entfernen. Nachdem die Säule auf ein frisches Reaktionsgefäß platziert wurde, konnte die DNA durch Zugabe von 30 µl Elutionspuffer EB (10 mM Tris, pH 8,5), einer folgenden Inkubation von 1 min bei RT und anschließender Zentrifugation (13.000 rpm; RT) eluiert werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über ein Quantifizierungs-Agarosegel.

2.4.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer. Gemessen wurde außerdem das Verhältnis von OD_{260nm} zu OD_{280nm} , um eine Aussage über eventuelle Proteinkontaminationen in der DNA-Lösung treffen zu können. Bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Für die Konzentrationsbestimmung kleinerer Mengen DNA wurde ein Vergleich mit einem Mengenstandard auf einem Agarosegel durchgeführt, bei dem die Nachweisgrenze bei ca. 5 ng DNA pro Bande lag. Dazu wurde ein kleiner Anteil (1 µl) der Plasmid-DNA oder des zu klonierenden Fragmentes zusammen mit einem bestimmten Volumen an DNA bekannter Konzentration (z. B. Smartladder) auf ein Agarosegel aufgetragen. Über einen Vergleich der Fluoreszenz-Intensität der verschiedenen Banden unter UV-Licht konnte die DNA-Konzentration abgeschätzt werden.

2.5 Arbeiten mit Proteinen

Um die Proteinexpression in transfizierten oder auch transduzierten Zellen zu überprüfen wurden Lysate der entsprechenden Zellen hergestellt.

2.5.1 Herstellung von Lysaten adhärenter Zellen oder Suspensionszellen

Zur Herstellung von Lysaten adhärenter Zellpopulationen, wie z.B. Phoenix gp Zellen, wurden die Zellen von einer konfluent bewachsenen 10 cm-Gewebekulturschale (ca. 1×10^7 Zellen) 48 h nach Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten mit Hilfe eines Zellschabers isoliert und in 5 ml gekühltem PBS aufgenommen. Suspensionszellen hingegen wurden durch Zentrifugation (1.500 rpm; 5 min; 4 °C) nach Transduktion oder MACS-Separation pelletiert (ca. 1×10^7 Zellen).

Anschließend wurden die Zellen zum Waschen in 5 ml gekühltem (4 °C) PBS resuspendiert, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1.500 rpm;

5 min; 4°C). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 500 µl Triton-Lyse-Mix-Puffer (1 % Triton; 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 2 mM EDTA) mit Protease Inhibitoren (0,5 mM PMSF und Protease-Inhibitoren Cocktail [complete™: ½ Tablette/5ml Puffer]) resuspendiert. Während einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen lysiert. Nach Zentrifugation (13.000 rpm; 5 min, 4 °C) wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen, in ein frisches Eppendorfgefäß aliquotiert und bei –80 °C tiefgefroren oder direkt zur weiteren Verwendung (Coimmunpräzipitation 2.5.3.1 oder Western Blot 2.5.3) eingesetzt.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die meisten Proteine binden SDS in einem konstanten Gewichtsverhältnis. Pro gebundenem SDS-Molekül werden jeweils zwei negative Ladungen zur Gesamtladung beigetragen, so dass es zu einem Ausgleich von Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen und einer negativen Nettoladung kommt. Deshalb wandern mit SDS komplexierte Moleküle bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts (MW) zur Anode.

In dieser Arbeit wurde zur Auftrennung von Proteinen das Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Die dabei verwendeten Gele setzten sich aus einem Trenngel (Tris-Glycin-Puffer, pH 8,8; 5 – 20 % Acrylamid) und einem überschichteten Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer, pH 6,8; 3 – 4 % Acrylamid) zusammen. Die Acrylamid-Prozentigkeit des Trenngels richtete sich nach den Molekulargewichten der aufzutrennenden Proteine:

MW < 30 kDa ➔ 15 % Acrylamid

MW 30 – 50 kDa ➔ 12 % Acrylamid

MW 50 – 100 kDa ➔ 10 % Acrylamid

MW > 100 kDa ➔ 8 % Acrylamid

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde das Isopropanol vollständig entfernt, das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und mit einem Probenauftragskamm versehen. Nachdem auch dieses polymerisiert war, wurde das Gel in eine Gelkammer eingebaut und diese mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % [w/v] SDS) aufgefüllt. Die Proteine wurden zur Denaturierung mit der entsprechenden Menge an Auftragspuffer (Laemmli Puffer, 4 x Roti Load, Roth) gemischt und für 3 min bei 95 °C gekocht, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 100 V, die nach dem Eintritt der Proteine in das

Trenngel auf 130 V erhöht wurde. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Größenstandard (BenchMark prestained protein ladder, Gibco) mitgeführt.

2.5.3 Western Blot

Mit Hilfe der Western Blot-Methode wurden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran übertragen und dort immobilisiert. Dazu wurde das Gel nach erfolgter Auftrennung der Proteine luftblasenfrei auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran aufgelegt, die zuvor kurz mit Methanol (100 %) aktiviert worden war. Gel und Membran wurden beiderseits mit je zwei Lagen Whatman-Papier versehen, die vorher in Transferpuffer (25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 20 % [v/v] Methanol) getränkt wurden. In dieser Anordnung wurden sie in eine Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad) eingebaut, die mit gekühltem Transferpuffer gefüllt wurde. Da die Proteine negativ geladen waren (2.5.1) handelte es sich hierbei um einen gerichteten Transfer auf die PVDF-Membran zur Anode. Der Transfer der Proteine auf die Membran fand bei 150 mA für 1,5 h statt. Die Blot-Kammer wurde während des Transfers gekühlt (auf Eis).

2.5.3.1 Anreicherung von Proteinen durch Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation ermöglichte eine spezifische Anreicherung des im Western Blot zu detektierenden Proteins. Proteine, die nicht in besonders hohem Maße exprimiert wurden, konnten auf diese Weise angereichert werden, so dass die Detektion im Western Blot erleichtert wurde.

Auch für Immunpräzipitationen wurden die Zellen, wie unter 2.5.1 beschrieben, lysiert. Nach der Lyse wurde der proteinhaltige Überstand mit 1 µg Primärantikörper (z.B. anti-LNGFR)/200 µl Lysat gemischt und 1 h bei 4 °C präzipitiert. Um die gebildeten Immunkomplexe abzufangen, wurden 40 µl Protein-A/G-Agarose hinzugefügt und der Reaktionsansatz eine weitere Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Die Immunkomplexe wurden fünfmal mit PBS (weniger stringent) oder Triton-Lyse-Mix Puffer (stringenter) gewaschen, bevor die präzipitierten Proteine durch 3minütiges Aufkochen in Auftragspuffer (4 x Roti Load, Roth) von der Protein-A/G-Agarose eluiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Im Anschluss daran wurde ein Western Blot und eine immunologische Detektion mit einem Sekundär-Antikörper, der gegen eine andere Domäne des präzipitierten Proteins gerichtet war (z.B. anti FKBP) durchgeführt (2.5.4).

2.5.4 Detektion der Proteine

Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst zum Absättigen unspezifischer Bindungen für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C in Blockierlösung (PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20 + 5 % (w/v) Magermilchpulver) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper nach Angaben des Herstellers. Der anti-CD34-Antikörper (sc9590) wurde in Blockierlösung (1% Magermilchpulver) auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt, während der anti LNGFR Antikörper (C40-1457) und der anti FKBP Antikörper (PA1-026A) auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt wurden. In diesen Antikörperkonzentrationen inkubierte die Membran ü/N bei 4 °C oder aber für 5 hrs ü/T bei RT. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde die Membran gründlich mit PBST (PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen (3 – 5 mal je 15 min bei RT). Anschließend wurde sie 30 – 45 min in dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. (Bei Verwendung des anti-CD34-Antikörpers wurde als Sekundär-Antikörper ein anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat verwendet, bei anti LNGFR , bzw. anti FKBP als Primärantikörper eine anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase als Sekundär-Antikörper.) Beide sekundären Antikörper wurden unmittelbar vor Gebrauch 1 : 10.000 in Blockierlösung (1 % Magermilchpulver) verdünnt. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran erneut gründlich in PBST gewaschen, und im Anschluss konnten die gebildeten Immunkomplexe durch Zugabe einer ECL-Lösung (Pierce) detektiert werden. Durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase kam es zu einer Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols, wodurch Chemilumineszenz erzeugt wurde. In einer Expositionskassette wurde auf die Membran ein photosensitiver Film gelegt, auf dem nach der Entwicklung die detektierten Proteine als schwarze Banden erkennbar waren.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Kultivierung humaner und muriner Zelllinien

Die adhärenenten Zelllinien (293T, Phoenix gp und PG13) wurden in DMEM mit 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS (Δ FCS) kultiviert. Die Suspensions Zelllinien (Jurkat, Weri-RB01 und HUT 78) wurden in RPMI 1640; ebenfalls mit 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin und 10 % Δ FCS supplementiert, kultiviert. Alle Zelllinien und Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Passagieren der adhärenenten Zellen wurde zunächst das Medium komplett entfernt, die Zellen einmal mit

vorgewärmtem (37 °C) PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsinlösung (0,05 % Trypsin; 0,55 mM EDTA, 137 mM NaCl in PBS) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden solange bei 37 °C mit Trypsin inkubiert, bis sie sich durch leichtes Klopfen gegen die Flasche vom Boden ablösten. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Δ FCS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen gezählt und in einer geeigneten Zelldichte (abhängig von der Zellart) wieder in frischem Medium ausgesät. Die Anzahl der lebenden Zellen einer Probe wurde wie unter 2.6.9 beschrieben, bestimmt.

Suspensionszellen wurden zum Passagieren in ein 15 ml Röhrchen überführt und durch einen Zentrifugationsschritt (5 min, 1.500 rpm, 4°C) pelletiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss in frischem Medium resuspendiert, die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen wurden in einer geeigneten Dichte in einem neuen Kulturgefäß ausgesät.

Von jeder Zelllinie wurden außerdem Reserven in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Aliquots à 1 ml mit ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen wurden in dem jeweiligen Medium mit 20 % Δ FCS und 10 % DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und sofort bei -80 °C eingefroren. Nach 24 hrs wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank umgelagert, wo sie für mehrere Jahre aufbewahrt werden. Das Auftauen der Kryokonserven erfolgte zügig im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit dem entsprechenden Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen und danach in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel und je nach Wachstum wurden sie nach ein bis zwei Tagen zum ersten Mal passagiert.

2.6.2 Zelllinien

2.6.2.1 Adhärenzte Zelllinien

2.6.2.1.1 293T

Hierbei handelte es sich um eine humane Nierenzelllinie, die aus primärem, embryonalem Nierengewebe etabliert wurde. Die Zellen waren mit dem Adenovirus E1A-Genprodukt transformiert und exprimierten das SV40 "large T" Antigen, das die episomale Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung und entsprechendem Promotor ermöglichte. Zusätzlich trugen sie ein Neomycin Resistenzgen, dessen Genprodukt die Selektion der *large T* Gen tragenden Zellen

ermöglichte (Co-Selektion). Die Zellen wuchsen adhärent als Monolayer und wurden in DMEM mit 10 % Δ FCS kultiviert. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug ca. 20 bis 24 hrs, und die konfluente Kultur sollte alle drei bis vier Tage 1 : 5 bis 1 : 10 passagiert werden [Graham 1977].

2.6.2.1.2 Phoenix gp

Diese Zelllinie basiert auf der bereits unter 2.6.2.1.1 beschriebenen 293T-Zelllinie. Diese Zellen exprimierten im Vergleich zu den 293T-Zellen zusätzlich noch die viralen Proteine gag-pol, deren Expression durch die Analyse des ko-exprimierten murinen CD8 Oberflächenmarkers überprüft werden konnte, da es sich hierbei um ein *gag-pol-IRES:CD8-alpha* Konstrukt handelte. Zusätzlich wurde zu den *gag-pol* Genen der Selektionsmarker Hygromycin integriert, so dass eine Selektion (200 μ g/ml Hygromycin B, Boehringer Mannheim) auf gag-pol-exprimierende Zellen vorgenommen werden konnte. Diese Zelllinie ermöglichte die Produktion von pseudotypisierten retroviralen Vektoren mit verschiedenen Envelops, wie z.B. das *gibbon ape leukemia virus* Envelop (GALV) oder das *vesicular stomatitis virus* G Protein (VSV-G).

Die Kultivierung dieser Zellen verlief analog der Kultivierung der 293T Zellen (Kinsella 1996).

2.6.2.1.3 PG13

Diese Verpackungs-Zellen basierten auf der NIH 3T3 Zelllinie, einer murinen Fibroblasten Zelllinie. Diese Zellen exprimierten das GALV-Envelop und die gag-pol Proteine des *moloney murine leukemia* Virus (MLV). Das MLV gag-pol Expressionskonstrukt wurde mit dem *HSV-TK* Gen als Selektionsmarker co-transfiziert, um eine Positiv-Selektion der transfizierten Zellen zu ermöglichen. Nach Selektion wurden die gag-pol-exprimierenden Zellen nochmals co-transfiziert mit dem GALV-env Expressionsplasmid und einer Mutante des Methotrexat-resistenten Dihydrofolat Reduktase Gens (*dhfr**). Der selektionierte Klon PG13 produzierte Virusüberstand mit dem höchsten Titer (Miller 1991).

PG13 sind adhärent wachsende Zellen, die in DMEM mit 10 % FCS kultiviert wurden. Die Zellen haben eine recht kurze Verdopplungszeit von 12 hrs, so dass die konfluente Kultur alle 2-3 Tage 1:10 bis 1:20 passagiert werden sollte.

Virusüberstand wurde von konfluent bewachsenen Zellkulturgefäßen nach 24 hrs gesammelt.

2.6.2.2 Suspensions-Zelllinien

2.6.2.2.1 HUT 78

Hierbei handelte es sich um eine CD3⁺/CD4⁺ kutane T-Zell Lymphoma Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines Patienten mit Sezary-Syndrom isoliert wurde. Die Zellen zeigten die Eigenschaften einer reifen T-Zelle mit Helfer/Induktor Aktivität. Die Zellen wuchsen in Suspension in RPMI1640-Medium mit 10 % Δ FCS und wurden alle 2 – 3 Tage im Verhältnis 1 : 5 oder 1 : 10 passagiert. Die Zelldichte sollte 1×10^6 Zellen/ml nicht überschreiten (Gootenberg 1981).

2.6.2.2.2 Jurkat

Diese humane T-Zell Leukämie-Zelllinie wurde aus dem Blut eines 14jährigen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) etabliert. Ähnlich der Kasumi-1-Zellen handelte es sich auch bei dieser Suspensionszelllinie um runde Zellen, die einzeln oder in kleinen Clustern wuchsen. Sie wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % Δ FCS kultiviert. Ihre Verdopplungszeit betrug zwischen 25 – 35 hrs. Sie wurden alle 2 – 3 Tage 1 : 3 bis 1 : 5 passagiert und ihre maximale Zelldichte in Kultur lag bei etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml [Schneider 1977].

2.6.2.2.3 WERI-RB01

Hierbei handelte es sich um eine Zelllinie, die aus einem humanen Retinoblastom gewonnen wurde. Die Zellen wurden in RPMI1640 mit 10% Δ FCS kultiviert und zeigten ein typisches „Cluster“-Wachstum. Die maximale Zelldichte sollte $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml nicht überschreiten, so dass die Zellen, die eine Verdopplungszeit von ca. 49 hrs hatten, einmal in der Woche zwischen 1 : 3 und 1 : 5 passagiert wurden. (McFall 1977) Diese Zellen wurden in Kultur genommen, da sie das humane CD133-Antigen konstitutiv exprimierten, so dass über eine reverse Transkription die mRNA dieses Markers in cDNA überschrieben werden konnte, um so für weitere Klonierungszwecke verwendet zu werden.

2.6.3 Kultivierung von primären humanen T Lymphozyten

Die primären T-Lymphozyten wurden aus sog. „BUFFY-COATS“ (Leukozyten angereichert, Erythrozyten abgereichert) des BSD-Hessen gewonnen. Die „Buffy Coats“ enthielten jeweils ca. 500 ml Volumen eines gesunden Spenders.

2.6.3.1 Isolierung von humanen primären T-Lymphozyten

CD3+ Zellen wurden immunomagnetisch aus Buffy Coats isoliert unter Verwendung des vollautomatischen CliniMacs Systems (Miltenyi Biotec, Abb. 18). Nach 2maligem Waschen der Zellen (PBS + 0,5 % HSA, 2mM EDTA), um die Thrombozyten-Anzahl zu reduzieren, wurde im Anschluss das Zellpellet resuspendiert (100 ml PBS + 0,5 % HSA, 2mM EDTA). Es folgte eine 5minütige Inkubation der Zellen mit 5 ml Intraglobin (50 ng/ml, Biotest) bei 4 °C (Blockierung unspezifischer Bindungen). Die CD3+ Zellen wurden anschließend mit 0,5 – 2 ml Antikörper Beads pro 4×10^7 CD3+ Zellen (CD3+ Isolationskit, Miltenyi Biotec) für 30 min bei 4°C markiert. Nicht gebundene Beads wurden in 2 Waschschritten (PBS + 0,5 % HSA, 1.100 x g, 15 min) eliminiert. Die markierten Zellen wurden über eine magnetische Säule (CliniMacs) angereichert. Zur Elution der an die Säule gebundenen positiven Zellen wurde das magnetische Feld abgeschaltet und die Zellen mit PBS + 0,5 % HSA eluiert. Der Anteil an CD3+ Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.



Abb. 18: CliniMacs der Firma Miltenyi Biotec. Dieses vollautomatische Selektionssystem erlaubt eine den GMP-Richtlinien (Reinstraumbedingungen) entsprechende Aufreinigung der Zellen in einem geschlossenen System. Die magnetische Zellseparation kann mit diesem System im großen Maßstab für die direkte klinische Anwendung, z.B. bei der Transplantation von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt werden.

2.6.3.2 Kultivierung humaner primärer T-Lymphozyten

Die frisch isolierten CD3⁺ Zellen wurden direkt in Kultur genommen. Im Vergleich zu T-Zelllinien, die Faktor-unabhängig proliferierten, mussten primäre T-Lymphozyten spezifisch aktiviert (anti CD3) und stimuliert (hIL-2) werden. 1×10^6 Zellen wurden in 24 Napf-Platten in 1 ml RPMI 1640 supplementiert mit 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin und 10 % Δ FCS resuspendiert und zusätzlich mit max. 1.000 U/ml hIL-2 (Chiron), 20 ng/ml Okt-3 (anti CD3, Janssen-Cilag) sowie z.T. noch mit 1 μ g/ml anti CD28 Co-Stimulus versetzt. Auf diese Weise wurden die Zellen für 3 Tage prä-stimuliert, bevor sie mit den retroviralen Vektoren transduziert wurden. Zur weiteren Expansion der Zellen nach Transduktion oder MACS-Separation wurde das Medium lediglich mit 500-1.000 U/ml hIL-2 supplementiert.

2.6.4 Transiente Kalziumphosphat-Transfektion von Phoenix gp Zellen zur Produktion von Virusüberstand

Zur Herstellung viraler Partikel wurden Phoenix gp-Zellen verwendet, die mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode transfiziert wurden. Bei dieser Technik wurde die DNA als Kalziumphosphat-Präzipitat von den Zellen über Endozytose aufgenommen. Damit die Zellen die Vektor-DNA in Form von retroviralen Partikeln verpacken konnten, mussten sämtliche Proteine, die für die Verpackung notwendig waren, in Form von kodierenden Genen zur Verfügung gestellt werden. Neben den bereits im Genom integrierten MLV *gag-pol* Sequenzen (2.6.2.1.2) wurden die Zellen zusätzlich zu der Vektor-DNA noch mit einem Verpackungskonstrukt (M57, M. v. Laer, Frankfurt), das ebenfalls die MLV *gag-pol* Sequenzen enthielt und einem Pseudotypisierungskonstrukt (GALV, J. Stitz, Frankfurt) transfiziert (Abb. 19).

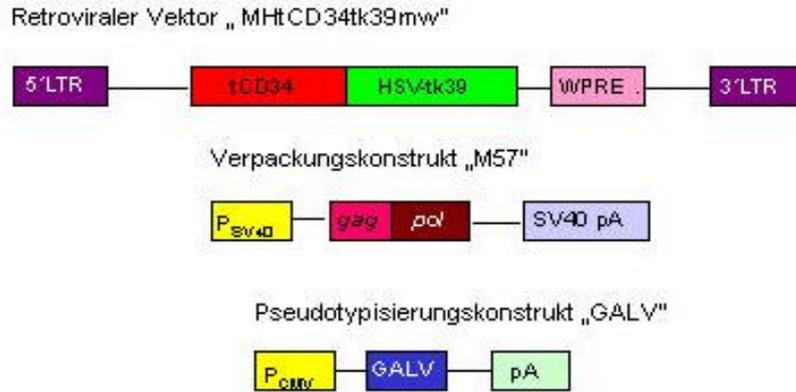


Abb. 19: Schematische Darstellung der Transfektionskomponenten. Als Beispiel für den Zielvektor wurde hier das retrovirale Vektorkonstrukt MtCD34tk39mw dargestellt. Zusammen mit diesem Plasmid wurden noch weitere Plasmide, kodierend für das envelop GALV, und die gag-pol Proteine co-transfiziert. LTR = long terminal repeats; P_{CMV} = CMV-Promotor; P_{SV40} = SV40-Promotor; pA = Polyadenylierungssignal; tCD34 = "zytoplasmatisch trunkiertes CD34"; HSV-tk39 = Herpes Simplex Virus I Thymidin Kinase Mutante 39; GALV = Gibbon-Ape-Leukämie-Virus envelop.

24 hrs vor der Transfektion wurden 5×10^6 Phoenix gp -Zellen einer niedrigen Passage (Passage 8 bis 17) in 8ml DMEM auf einer gelatinisierten 10 cm-Zellkulturschale ausgesät. 10 min vor der Transfektion wurde das Medium gegen 4 ml frisches, Chloroquine-haltiges (25 μ M) DMEM ausgetauscht und bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Präzipitat vorbereitet. Dazu wurde in einem 14 ml-Falcon-Röhrchen ein 500 μ l-Ansatz bestehend aus DNA-Mix (20 μ g retroviraler Vektor, 3 μ g Verpackungskonstrukt M57 und 7 μ g Pseudotypisierungskonstrukt GALV, Abb. 19), 250 mM CaCl₂ und dH₂O hergestellt. Zu diesem Ansatz wurden 500 μ l 2 x HBS (100 mM HEPES; 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,12) langsam hinzugegeben und gleichzeitig durch Ausblasen einer 2ml-Pipette ca. 1min aufgeschäumt. Das Präzipitat wurde vorsichtig tropfenweise auf den vorbereiteten Zellen verteilt. Nach 8stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Präzipitat-haltige Medium gewechselt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 5ml frischem Medium aufgefüllt. 24 hrs später wurde das DMEM gegen 5ml RPMI-1640 ausgetauscht, um darin den Virusüberstand zu sammeln. Weitere 24 hrs später wurde der Virusüberstand geerntet und durch einen 0,22 μ m-Filter filtriert, um Zellen, Fragmente und andere nicht erwünschte Partikel zu entfernen. Anschließend wurde der Virusüberstand entweder direkt zur Transduktion von Zielzellen eingesetzt oder bei -80 °C bis zu einer späteren Verwendung eingefroren.

2.6.5 Transduktion humaner T-Lymphozyten

2.6.5.1 Transduktion humaner T-Zelllinien

Die Transduktion von HUT 78 oder Jurkat-Zellen wurde in Gegenwart von Protaminsulfat (4 µg/ml) durchgeführt. Für die Transduktion wurden pro Ansatz 5×10^5 Zellen pelletiert (5 min, 1.500 rpm, 4 °C) und in 1 ml Virusüberstand resuspendiert. Die entsprechende Menge an Protaminsulfat wurde dazu gemischt und der Ansatz für 6 hrs bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde ein halber Medienwechsel durchgeführt, indem 0,5 ml Virusüberstand vorsichtig abgenommen wurden und durch frisches RPMI-1640 Medium ersetzt wurden. Die Transduktion wurde an dem darauffolgenden Tag wiederholt. Nach der letzten Transduktionsrunde wurden die Zellen verschiedener gleicher Ansätze gesammelt, zentrifugiert (1.500 rpm, 4 °C, 5 min) und einmal mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 1×10^6 Zellen/ml in frischem RPMI1640 Medium resuspendiert und in einer 6Napf-Platte ausgesät. 72 hrs nach der letzten Transduktion wurde die Transduktionseffizienz anhand der Oberflächenmarker-Expression mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*; FACS) bestimmt.

2.6.5.2 Transduktion humaner primärer T-Lymphozyten

Die Transduktion humaner primärer T-Zellen wurde auf Retronektin-beschichteten (Fibronectin CH-296, BioWhittaker) Platten (Falcon, Katalog-Nr. 1147) durchgeführt. Die Platten wurden mit 50 µg/ml Retronektin beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten mit 2 % BSA für 30 min bei RT blockiert, 2 x mit HBSS (Hanks balanced salt solution: NaCl 8 g/l; KCl 0,4 g/l; Glucose 1 g/l; KH_2PO_4 60 mg/l; Na_2HPO_4 47,5 mg/l; Phenolrot 17 mg/l; Sigma Aldrich) gewaschen und letztlich noch 1 x mit PBS gewaschen. 1×10^6 primäre T-Zellen wurden in 1 ml Virusüberstand supplementiert mit 1.000 U/ml hIL-2 resuspendiert und auf die Retronektin beschichteten Platten ausgesät. Die Transduktion erfolgte während eines Zentrifugationsschrittes (2.500 rpm, 32 °C und 90 min) und anschließender Inkubation bei 37 °C für 2,5 hrs im Brutschrank. 0,5 ml Virusüberstand wurden vorsichtig abgenommen und durch 0,5 ml frischen Virusüberstand mit 1.000 U/ml hIL-2 ersetzt. Der Transduktionsprozess wurde nochmals wiederholt und am folgenden Tag ebenfalls noch einmal durchgeführt. Im Anschluss an die letzte Transduktion wurden die Zellen gesammelt und zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in frischem Medium mit 500-1.000 U/ml hIL-2 resuspendiert und im Brutschrank expandiert. 72 hrs nach der letzten

Transduktion wurde die Effizienz anhand der Expression des Oberflächenmarkers im FACS bestimmt.

2.6.6 Titerbestimmung auf 293T-Zellen mittels FACS-Analyse

Da die verwendeten retroviralen Vektoren ein Transgen bestehend aus einem Fusionsprotein mit einem Oberflächenmarker enthielten, konnten sowohl Transfektions- als auch Transduktionseffizienz anhand der Oberflächenmarker-Expression durch FACS-Analyse ermittelt werden. Um eine Aussage über die Infektiösität des Virusüberstandes treffen zu können, wurde dieser auf 293T-Zellen getitert. 24 hrs vor Transduktion wurden je 5×10^4 293T-Zellen pro Vertiefung einer 24 Napf-Platte ausgesät. Der zu titrierende Virusüberstand wurde in Doppelbestimmung in Zehnerschritten seriell bis zu einer Verdünnung von 10^{-2} verdünnt, mit Polybrene (4 $\mu\text{g/ml}$) versetzt und jeweils 1 ml auf die Zellen gegeben. 24 hrs nach Transduktion wurde der Virusüberstand gegen frisches DMEM ausgetauscht und für weitere 48 hrs inkubiert. 72 hrs nach Transduktion wurden die Zellen für die FACS-Messung eingesetzt (2.6.7) und die Infektiösität berechnet (2.6.7.1)

2.6.7 FACS Analysen

2.6.7.1 FACS-Markierung von transfizierten oder transduzierten Zellen

Zur Kontrolle der Expression des Oberflächenmarkers wurden die Zellen im FACS analysiert. Adhärente Zellen wurden trypsinisiert und anschließend in 3 ml FACS-Puffer (1 % [v/v] Δ FACS; 0,1 % [w/v] Natriumazid in PBS) in einer Zellzahl zwischen 1×10^5 bis 5×10^5 aufgenommen. Suspensionszellen wurden gezählt, die entsprechende Menge an Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min; 1.500 rpm; 4°C) und anschließend in 3 ml FACS-Puffer resuspendiert.

Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min; 1.500 rpm; 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 μl –2 μl des jeweiligen direkt-gekoppelten Antikörpers (PE, FITC oder Cy-chrome gekoppelt) gemischt und für 20 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss nochmals mit 3ml FACS-Puffer gewaschen, dekantiert und in 200 μl FACS-Fixierlösung (1 % [v/v] Formaldehyd in PBS) unter Vortexen resuspendiert. Der Anteil Oberflächenmarker-exprimierender Zellen wurde im FACScan (Becton Dickinson, Software CellQuest) analysiert. Im Falle einer Virustitration wurde der Titer folgendermaßen berechnet:

$$\text{Titer [TU/ml]} = \frac{\text{Anteil transduzierter Zellen [\%]}}{100 \%} \times \text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{1}{\text{Vol. Virus (ml)}}$$

Die "Zellzahl" bezieht sich auf die Zahl der Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe des Virusüberstandes, der "Verdünnungsfaktor" auf den Virusüberstand. Der Titer wird in "Transducing Units per ml" [TU/ml] angegeben.

Ausgehend von dem Virustiter konnte man die MOI (*multiplicity of infection*) einer Transduktion ebenfalls bestimmen; wie viele infektiöse Partikel pro Zelle:

$$[\text{TU/ml}] / N [\text{Zellzahl}] = \text{MOI}$$

2.6.7.2 Annexin Färbung (Bestimmung apoptotischer Zellen)

Apoptose ist durch verschiedene morphologische Veränderungen der Zelle charakterisiert, wie z. B. Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran, Kondensation des Zytoplasmas und Nukleus, sowie internukleosomale Spaltung der DNA. Der Verlust der Plasmamembran ist eines der frühesten Ereignisse im apoptotischen Signaltransduktionsweg, währenddessen das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran translokiert wird. PS wird somit der externen zellulären Umgebung präsentiert. Annexin-V, ein 35-36 kDa Ca^{2+} abhängiges Phospholipid Bindeprotein, hat eine hohe Affinität für PS und bindet an exponiertes PS. Zusätzlich war Annexin-V in diesem Kontext mit dem Fluorchrom FITC (Annexin V-FITC) markiert, so dass die Bindung an apoptotische Zellen im FACS sichtbar wurde.

Die Zellen wurden 2 x mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 x Bindungspuffer (0,01 M HEPES/NaOH (pH 7,4); 0,14 M NaCl; 2,5 mM CaCl_2) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. 100 μl dieser Suspension wurden in ein neues 5 ml Röhrchen überführt (1×10^5 Zellen) und mit 5 μl Annexin V-FITC vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 400 μl 1 x Bindungspuffer aufgefüllt und innerhalb der nächsten Stunde durchflusszytometrisch analysiert.

2.6.7.3 PI Färbung (Trennung von lebenden und toten Zellen)

Propidium Iodid (PI) ist ein Farbstoff, der die Trennung von lebenden und toten Zellen ermöglicht. Lebende Zellen mit intakter Membran schließen PI aus, während tote und spät-apoptotische Zellen PI-permeabel sind.

1×10^5 Zellen wurden wie unter 2.6.7.1 beschrieben mit einem spezifischen FITC-gekoppelten Antikörper markiert. Anstelle der Fixierung wurden die Zellen eine zweites Mal mit FACS Puffer gewaschen, in 200 μ l Puffer resuspendiert, mit 0,5 μ l (50 μ g/ml) PI gemischt und bei 4 °C im Dunkeln maximal 2 hrs aufbewahrt, oder direkt durchflusszytometrische analysiert.

2.6.7.4 Zytotoxizitäts-Test (Kinderklinik)

Zur Analyse der Alloreaktivität transduzierter Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen, wurden beide Populationen mit allogenen Knochenmark-Proben, die mehr als 90 % leukämische Blasten enthielten, gemischt und für 24 – 48 hrs in verschiedenen Effektor : Zielzell (E : T) Verhältnissen inkubiert. Der Level an zytotoxischer Aktivität wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Zellen wurden mit PE, bzw. FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern, die bestimmte Zielzell-Epitope erkennen (CD10, CD19, CD33, CD34, Coulter Immunotech, Marseille, France) und zusätzlich mit PI markiert. Ein interner Standard diente der Bestimmung der absoluten Zellzahl. Die Proben wurden an einem vier-Farben Epics XL-MCL Gerät (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) analysiert. Zytotoxische Aktivität wurde definiert als die Abnahme der Zellzahl in der Population der lebenden Zielzellen.

2.6.8 Immunomagnetische Separation transduzierter Zellen

Die transduzierten Zellen wurden über das Verfahren der immunomagnetischen Separation (*magnetic activated cell sorting*, MiniMACS, Abb. 20) zu homogenen Populationen angereichert. Das Prinzip dieser Separation basiert auf der Isolation von spezifischen Oberflächenmarker exprimierenden Zellen durch magnetische Beads, die wiederum mit den spezifischen Antikörpern gekoppelt sind. Auf diese Weise konnten die Beads spezifisch an die Zellen binden und ermöglichten somit eine Separation im magnetischen Feld von markierten und unmarkierten Zellen.

Es gab verschiedene Möglichkeiten der Selektion: eine positive Selektion führte zur Anreicherung der markierten Zellen, während eine negative Selektion auf der Markierung aller unerwünschten Zellen, die dann im magnetischen Feld zurückgehalten wurden, basiert, eine sog. Depletion.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich positiv-Selektionen verwendet. Die transduzierten Zellen wurden 72 hrs nach Transduktion hinsichtlich der Expression des Oberflächenmarkers im FACS analysiert. 5-7 Tage nach der letzten Transduktion (Expansion der Zellen) wurden diese Zellen für die MACS-Separation vorbereitet. Maximal 1×10^8 Zellen (Gesamtzellzahl) wurden 2 x mit PBS und 1 x mit MACS-Puffer (0,5 % HSA; 2mM EDTA; PBS) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde entweder der erste Antikörper (im Falle von nicht direkt markierten Beads), oder gleich die Antikörper markierten Beads zugegeben, gemischt und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Währenddessen wurden die magnetischen Säulen in einem magnetischen Feld installiert und 2 x mit jeweils 1 ml MACS-Puffer äquilibriert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 5 ml MACS-Puffer gewaschen und entweder mit den Sekundärantikörper gekoppelten Beads gemischt und für weitere 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert oder in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert und direkt über einen Präseparationsfilter (30 µm) auf die Säule gegeben. Die beladene Säule wurde 4 x mit je 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Zur Elution der positiven Zellen wurde die Säule aus dem magnetischen Feld genommen und die Zellen durch zweimalige Zugabe von je 1 ml MACS-Puffer eluiert. Durch einen Zentrifugationsschritt (1.500 rpm, 5 min, 4 °C) wurden die eluierten Zellen pelletiert, in Medium resuspendiert, gezählt, nochmals zentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen an Medium aufgenommen und bei 37 °C und 5% CO₂ expandiert. Ein kleines Aliquot wurde für eine weitere FACS-Markierung entnommen, um die Effizienz der Aufreinigung zu überprüfen.

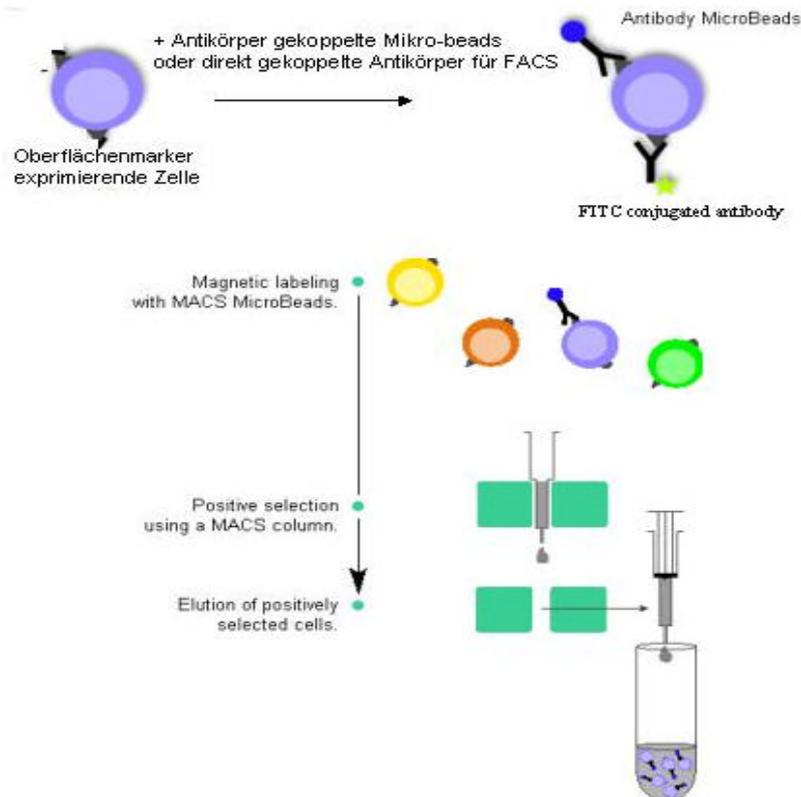


Abb.20: Schematische Darstellung der immunomagnetischen Separation mit Hilfe von MiniMacs Säulen (MS+ Säulen). Beispiel einer Positiv-Selektion markierter Zellen (<http://www.miltenyibiotec.com>).

2.6.9 Sensitivitäts-Testungen (GCV, AP20187)

Die transduzierten Zellen wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber bestimmten Substanzen (GCV oder AP20187) untersucht.

2.6.9.1 GCV/AP20187 Tests

5×10^5 primäre transduzierte, bzw. selektionierte Zellen /ml Medium wurden in 24 Napf Platten ausgesät und zum Zeitpunkt T_0 mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz gemischt. Täglich wurde ein kompletter Medienwechsel durchgeführt und ebenfalls die erneute Zugabe der verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz. Am Tag 5 (T_E) wurden die Zellen bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber der jeweiligen Substanz durchflusszytometrisch oder kolorimetrisch (2.6.9.2) analysiert.

2.6.9.2 MTS Test

Um die Anzahl der überlebenden Zellen nach einem Sensitivitätstest zu bestimmen wurden verschiedene Methoden verwendet. Neben FACS-Markierungen mit bestimmten Farbstoffen, die apoptotische (Annexin V-FITC, 2.6.7.2), bzw. tote Zellen (PI, 2.6.7.3) anfärbten, sowie der TrypanBlau-Färbung wurde noch eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Lebendzellzahl verwendet: CellTiter96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Dieses System enthielt eine MTS Tetrazolium Komponente (Owen's Reagenz), die durch lebende Zellen zu einem löslichen Formazan Produkt bioreduziert wurde. Diese Umwandlung wird vorwiegend in metabolisch aktiven Zellen durch NADPH oder NADH, das durch Dehydrogenase-Enzyme produziert wird, ermöglicht. Das farbige Formazan Produkt konnte bei einer Wellenlänge von 490 nm detektiert werden.

100 µl Zellsuspension wurden in eine entsprechende Vertiefung einer 96 Napf-Platte pipettiert und mit 20 µl des MTS-Reagenz gemischt. Dieser Ansatz wurde für 2 hrs – 4 hrs im Dunkeln bei 37 °C inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 490 nm im Spektramax analysiert. Der prozentuale Anteil lebender Zellen wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{OD}_{490} \text{ behandelte Probe} \times 100 / \text{OD}_{490} \text{ nicht-behandelte Kontrolle}$$

3 Ergebnisse

3.1 Retrovirale Selektions/Suizid-Fusionskonstrukte zur Transduktion von humanen primären T-Zellen

Die beiden retroviralen Gentransfervektoren, die zur *ex vivo* Modifikation von T-Lymphozyten für eine adaptive Immuntherapie in dieser Arbeit entwickelt wurden, enthielten jeweils ein chimäres Protein, das sich aus einem Selektionsmarker und einem Suizidgen zusammensetzte. Die Konstruktion solcher Fusionsproteine erlaubt später die Kombination von zwei unterschiedlichen Selektions/Suizid-Elementen in einem Vektor und bietet damit die Möglichkeit einen effizienten Vektor im Hinblick auf die Selektion der transduzierten Zellen sowie im Hinblick auf die spezifische Eliminierung dieser Zellen zu generieren.

3.2 Konstruktion der retroviralen Vektoren

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten retroviralen Vektoren wurden speziell für die genetische Modifikation von T-Zellen konstruiert. Im Folgenden werden die einzelnen Entwicklungsschritte der Vektoren, sowie die Testung ihrer Funktionalität in Bezug auf eine effiziente Selektion über den Oberflächenmarker und die zuverlässige Eliminierung der Suizidgen-exprimierenden Zellen beschrieben. Dieser Teil lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen:

1. Konstruktion und Funktionalitäts-Analysen des Vektors auf Basis des *HSV-tk39* Gens (3.2.1-3.2.2)
2. Konstruktion und Funktionalitäts-Analysen des Vektors auf Basis des DED-Moleküls (3.2.3)

3.2.1 Entwicklung des Vektors auf Basis des tCD34/HSV-tk39 Fusionsproteins

Der erste retrovirale Selektions/Suizid-Fusionsvektor wurde auf Basis einer GCV-hypersensitiven Mutante des HSV-tk Proteins (1.7.1) und der zytoplasmatisch trunkierten Version des humanen CD34 Oberflächenmoleküls (1.6.2.2) konstruiert.

3.2.1.1 Konstruktion eines SFFV-basierten HSV-tk39 exprimierenden Kontroll-Vektors: SXtk39

Zu Beginn wurde ein Kontrollvektor entwickelt, der die Prüfung der Funktionalität der HSV-tk39-Mutante in Bezug auf GCV-spezifische Eliminierung von transduzierten Zellen

ermöglichte. Als retrovirales System wurde der SX-Vektor (Abb. 17; S.Stein, Frankfurt) verwendet, der als Expressions-kontrollierendes Element die LTR des SFF-Virus (*spleen-focus-forming virus*) enthielt. Zusätzlich enthielt die Sequenz des SX-Vektors einen funktionalen Spleißmechanismus, bestehend aus *spleiß-donor* (*sd*) und *spleiß akzeptor* (*sa*), so dass die Expression von zwei Transgenen als bicistronisches Konstrukt möglich war. Als Selektionsmarker enthielt der Vektor 3' der *sa*-Sequenz die Sequenz des zytoplasmatisch trunkierten LNGF-Rezeptors (Δ LNGFR). Die HSV-tk39 Sequenz wurde 3' der *sd*- und 5' der *sa*-Sequenz integriert.

Der SX-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *HincII* und *BglII* linearisiert, während parallel die HSV-tk39 Sequenz über Restriktion mit den gleichen Enzymen aus dem Plasmid pET23dHSV-TK39 (W.Qasim, London; Abb. 15) isoliert wurde. Beide Sequenzen wurden miteinander ligiert, so dass der retrovirale SXtk39 Vektor entstand (Abb. 21).

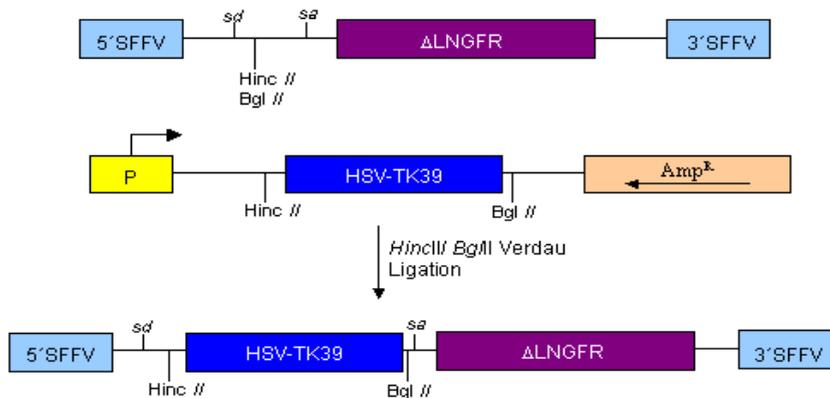


Abb. 21: Konstruktion des retroviralen SXtk39 Vektors. Die Restriktionen wurden mit zwei verschiedenen Enzymen durchgeführt, so dass eine gerichtete Klonierung der HSV-tk39 Sequenz gewährleistet war.

3.2.1.2 Eliminierung von SXtk39-transduzierten Jurkat-Zellen durch GCV-Gabe

Für funktionelle Analysen der retroviralen Vektoren wurden grundsätzlich T-Zelllinien verwendet, deren Kultivierung und Transduktion einfacher und schneller durchzuführen war, als die mit Zytokin-Gabe verbundene Kultivierung der primären T-Zellen.

In ersten Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Expression des *HSV-tk39* Gens in selektierten T-Zell Populationen eine spezifische GCV-Sensitivität vermittelte.

1×10^5 Zellen der T-Zelllinie Jurkat (2.6.2.2.2) wurden mit einem GALV (*gibbon ape leukemia virus*) Envelop pseudotypisiertem, retroviralem Überstand des SXtk39-Vektors, der von einer transient transfizierten Phoenix gp (2.6.2.1.2) Verpackungszelllinie produziert wurde, in zwei Runden transduziert. Drei Tage nach der letzten Transduktionsrunde wurde die Population nach durchflusszytometrischer Analyse (FACS) immunomagnetisch (2.6.8) über den Δ LNGFR Oberflächenmarker selektiert und nochmals mittels FACS analysiert (Abb. 22).

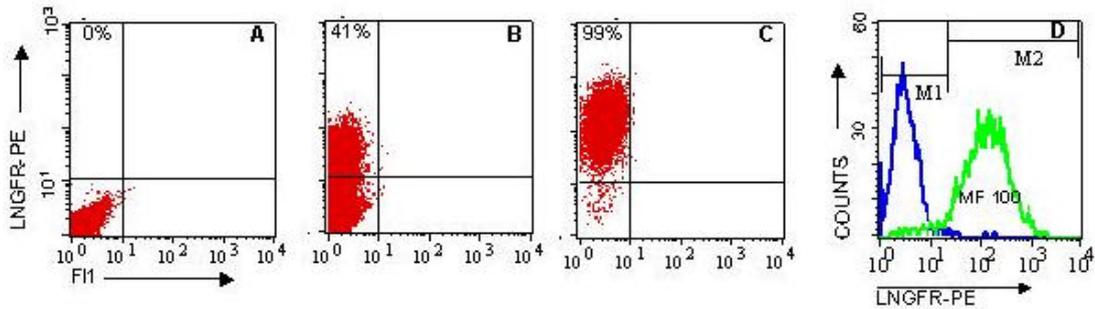


Abb. 22: FACS Analyse der DLNGFR-Expression SXtk39-transduzierter Jurkat-Zellen. Nach Transduktion (B) und Separation (C) wurden die Zellen mit einem PE-gekoppelten monoklonalen Antikörper (mAK) gegen LNGFR markiert und im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen (A) durchflusszytometrisch analysiert. (D) Histogramm Analyse: der blaue Peak repräsentiert die nicht-transduzierte Kontrollpopulation. Der grüne Peak stellt die Verschiebung der Fluoreszenz durch die Δ LNGFR-Expression dar. Die mittlere Fluoreszenz (MF) ist ein Maß für die mittlere Expressionsstärke.

Durch die immunomagnetische Separation konnte die nach Transduktion zu 41 % Δ LNGFR exprimierende Population zu einer 99% Δ LNGFR positiven Population angereichert werden.

Um die HSV-tk39 vermittelte GCV-Sensitivität zu überprüfen wurden die Zellen der aufgereinigten Population in einem *in vitro* Funktionalitäts-Testsystem im Vergleich zu nicht-HSV-tk39 exprimierenden Kontrollzellen analysiert.

Es wurden 1×10^5 Zellen / ml Medium in 24-Napfplatten ausgesät und mit verschiedenen GCV-Konzentrationen (0; 0,1; 1; 10; 100 μ M) für 4 Tage inkubiert. Jeden Tag wurde ein kompletter Medienwechsel durchgeführt. Am fünften Tag wurden die Zellzahlen der einzelnen Ansätze über TrypanBlau-Färbung miteinander verglichen (Abb. 23).

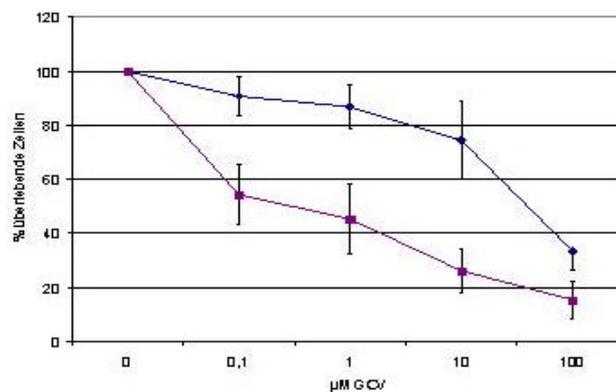


Abb. 23: Induktion des spezifischen Zelltods in SXtk39 transduzierten und selektionierten Jurkat-Zellen durch GCV. Ein Vergleich der GCV-Sensitivität von nicht-transduzierten wt-Zellen (-) und SXtk39 transduzierten und selektionierten Zellen (+). Der GCV-Effekt auf die Zellzahl wurde als Verhältnis dargestellt

$$(\text{Zellzahl} + \text{GCV} : \text{Zellzahl} - \text{GCV}) \times 100.$$

Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung.

Im Vergleich zu nicht-transduzierten wt-Zellen zeigten die HSV-tk39 exprimierenden Zellen bereits in Bereichen geringer GCV-Konzentrationen (0,1 μ M-10 μ M) eine deutliche Reduktion der Zellzahl. Die Behandlung mit 0,1 μ M GCV resultierte in einer Reduktion der Zellzahl auf ca. 50 %, während die Zellzahl der wt-Kontrollzellen durch die Behandlung mit GCV-Konzentrationen im Bereich von 0,1 μ M und 10 μ M keine Veränderung aufwies. Der Einsatz höherer GCV-Konzentrationen bis zu 10 μ M (eine Konzentration, die bei klinischer Anwendung von GCV im Plasma des Patienten erreicht werden kann) führte zu einer Reduktion der Zellzahl um 80 % in der HSV-tk39 exprimierenden Population. Eine GCV-Konzentration von 100 μ M resultierte jedoch in einem nicht HSV-tk39 spezifischen Effekt, so dass auch die Zellzahl der nicht-transduzierten wt-Zellen deutlich reduziert wurde (bis zu 70 %). In einem klinischen Ansatz, bzw. *in vivo* ist die Anwendung einer solch hohen Konzentration nicht möglich und auch nicht erwünscht (aufgrund der zu erwartenden myelosuppressiven Nebenwirkungen; gängige GCV-Therapiekonzentrationen für die Behandlung von viralen Infektionen liegen im Bereich von max. 19,5 mg/kg (7,6 mM) und 2,5 mg/kg (0,97 mM) im adulten Patienten (Cytovene Produkt Information, 1998), so dass diesem unspezifischen Effekt keine weitere Bedeutung beigemessen wurde.

3.2.1.3 Konstruktion eines retroviralen Vektors mit einem tCD34/tk39 Fusionsgen: SHXtk39

Nachdem gezeigt wurde, dass das HSV-tk39 Protein im Rahmen eines retroviralen Vektors funktional war, wurde in einem ersten Schritt ein Fusionsgen aus *tCD34* und *HSV-tk39* in einem SFFV-basierenden retroviralen Vektor konstruiert, um die Funktion der Einzelproteine im Kontext eines Fusionsproteins zu überprüfen. Als Ausgangsvektor wurde der SHX-Vektor (C. Baum, B. Fehse; Hannover; Abb. 17) verwendet. Über eine PCR (Tab. 11A) wurde ein 3' terminales 171 bp großes tCD34-Fragment amplifiziert, das im Anschluss an die Reaktion mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I, deren Erkennungssequenzen über die Primer (Tab. 12; Primer 1 und 2) an die Enden des Fragments eingefügt wurden, verdaut wurde. In einem nächsten Schritt wurde die cDNA-Sequenz der HSV-tk39 (1121 bp) aus dem Ausgangsvektor pET23dHSV-TK39 (W. Qasim, London, Abb. 15) ebenfalls über eine PCR amplifiziert (Tab. 11B) und mit den Restriktionsenzymen *Sal*I und *Hind*III (Tab. 12; Primer 3 und 4) verdaut.

PCR-Programm:		PCR-Programm:	
5 min – 94 °C		5 min – 94 °C	
1 min – 94 °C	} 28 Zyklen	1 min – 94 °C	} 28 Zyklen
1 min – 60 °C		1 min – 57 °C	
2 min – 72 °C		2 min – 72 °C	
10 min – 72 °C		10 min – 72 °C	
∞ - 4 °C		∞ - 4 °C	

Tabelle 11: PCR-Bedingungen. (A) partielle tCD34-Amplifikation, **(B)** HSV-tk39 Amplifikation.

	Bezeichnung	Sequenz (5´-3´)	Nukleotid-Länge	Schnittstelle
1	ForCD34bam	TGA AA AGC TGG GGA TCC TAG ATT TC	26mer	<i>Bam</i> HI
2	CD34revhind	GCG CGC CCC CAA GCT TGG GAC GAC GCG TCG ACC GGG TTC CAG CTC CAG CCT TTC TCC TG	59mer	<i>Hind</i> III, <i>Sal</i> I
3	Tksalfor1	GCG CGC ACG CGT CGA CGT CTG CTA GCC ATG GCT TCG TAC CC	41mer	<i>Sal</i> I
4	revHSVtkhind	CCC AAG CTT GGG GTT TCA GTT AGC TCC CCC ATC*	33mer	<i>Hind</i> III

Tabelle 12: Primer für die partielle tCD34/HSV-tk39 Fusionierung. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme, die mit den Primern eingefügt wurden, um eine im Leserahmen erfolgende Klonierung zu ermöglichen, sind *farbig* und **fett** hervorgehoben. **ATG** = Methionin, erste AS des HSV-tk39; **GGG** = Prolin, letzte AS des tCD34; **TCA** = Stopcodon (*).

Als Sub-Klonierungsvektor wurde der PCR2.1 Vektor (Abb. 15) verwendet. Dieser Vektor wurde mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut und mit den verdauten PCR-Produkten ligiert, so dass ein partielles *tCD34/HSV-tk39* Fusionsgen (ca. 1310 bp) entstand (Abb. 24)..

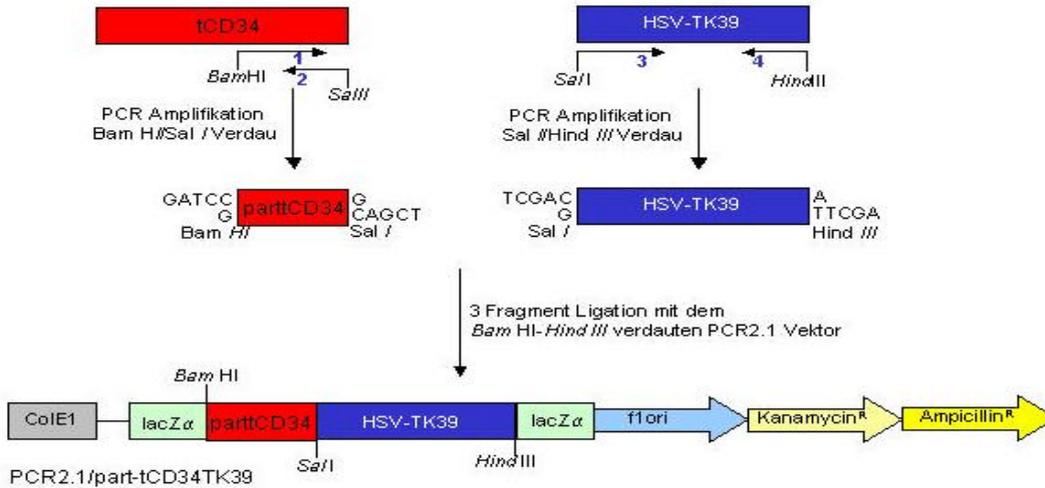


Abb. 24: Konstruktion des parttCD34/HSV-tk39 Zwischen-Konstrukts. Die Primer sind in Tab. 12 aufgeführt.

Im nächsten Schritt wurde in dem retroviralen Vektor SHX das komplette *tCD34/HSV-tk39* Fusionsgen mit einer Länge von ca. 2087 bp generiert. Durch die Restriktion des SHX-Vektors, der die *tCD34*-Sequenz enthielt, mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III wurde das oben beschriebene partielle 170 bp große 3' Fragment der *tCD34*-Sequenz eliminiert und der Vektor linearisiert. Um das partielle Fusionsgen zu isolieren wurde das Zwischenkonstrukt *part-tCD34tk39* mit den gleichen Enzymen verdaut und mit dem linearisierten SHX-Vektor ligiert. Auf diese Weise entstand ein retrovirales *tCD34/HSV-tk39* Fusionsgen (Abb. 25).

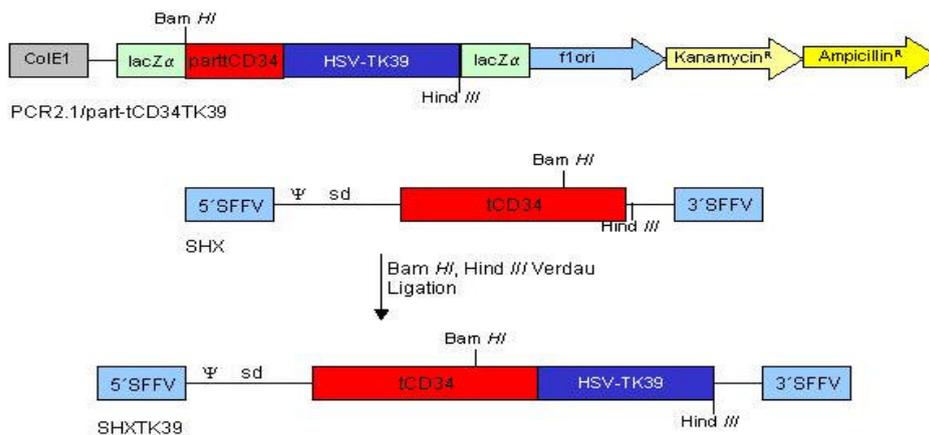


Abb. 25: Konstruktion des retroviralen SHXtk39-Vektors. *sd* = spleiß-donor; SFFV = *spleen focus forming virus* LTR; Ψ = Verpackungssignal.

Durch Sequenzierungsreaktionen wurde sichergestellt, dass keine Veränderungen im Leserahmen aufgetreten waren.

3.2.1.4 Funktionalitätsanalyse des SHXtk39 Fusionsvektors.

Mögliche Veränderungen der Expression und Funktionalität der beiden Einzelproteine im Kontext eines Fusionsproteins wurden im Folgenden untersucht. Jurkat-Zellen wurden mit dem SHXtk39-Fusionsvektor transduziert und in Bezug auf tCD34-Expression und Selektion sowie HSV-tk39 vermittelte GCV-Sensitivität analysiert. Zunächst wurden 1×10^5 Jurkat-Zellen mit 1 ml SHXtk39 GALV-pseudotypisiertem Virusüberstand von transient transfizierten Phoenix gp Verpackungszellen transduziert (2.6.2.1.2) und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 26A).

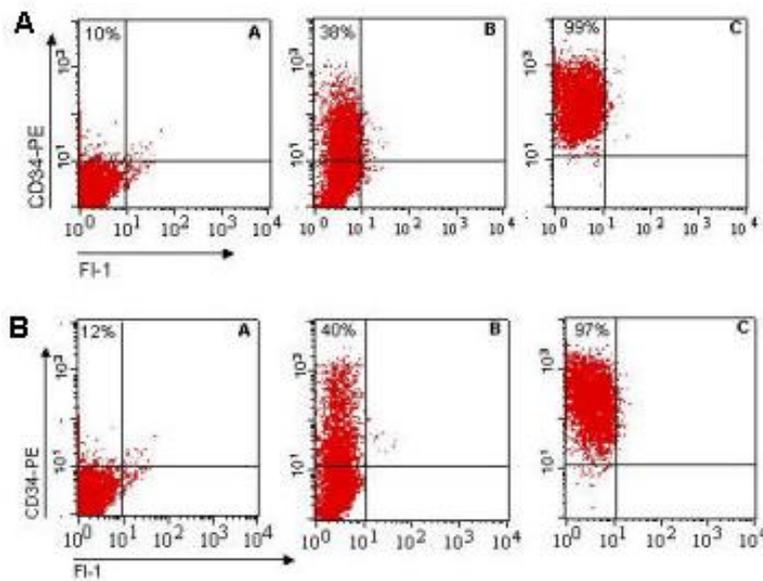


Abb. 26: FACS-Analysen der transduzierten und selektierten SHXtk39 Jurkat-Populationen. (A) (A) Kontroll-Population; (B) SHXtk39-transduzierte Population; (C) SHXtk39 transduzierte und selektierte Population. Die mittlere Fluoreszenz (MF) betrug ca. 220. **(B)** Kontrollpopulationen, die mit dem retroviralen Vektor SHX (exprimiert tCD34 als Einzelprotein) transduziert (B) und selektiert (C) wurden. (A) nicht-transduzierte Kontrollzellen, die zu 12 % CD34-Hintergrund zeigten

Als Maß für die relative Transduktionseffizienz wurde in dieser und allen folgenden Analysen der prozentuale Anteil der tCD34-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen angegeben. 38 % der Population exprimierten tCD34 an ihrer Oberfläche und sollten, da es sich um ein Fusionsprotein handelte, in gleichem Maße das HSV-tk39 Protein exprimieren. Durch immunomagnetische Selektion (MiniMacs-System, 2.6.8) wurde diese Population auf tCD34-exprimierende Zellen selektiert und anschließend im FACS analysiert (Abb. 26A).

Die Kontroll-Transduktion (40 % transduzierte Zellen) und Selektion (97 % positive Zellen) von Jurkat-Zellen mit dem retroviralen Ausgangsvektor SHX (Abb. 26B), der für das *tCD34* Gen kodierte, zeigte, dass die Fusion des Selektions- und Suizidgens keine negative Auswirkung auf den Transduktions- und Selektionsprozess hatte.

Um die Expression und Funktionalität des C-terminalen HSV-tk39 Proteins zu überprüfen, wurden die transduzierten und selektierten Zellen in einem *in vitro* Testsystem (2.6.9.1) analysiert. Nach Behandlung mit verschiedenen GCV-Konzentrationen (0,1 μM -100 μM) wurden die selektierten Zellen durch Färbung mit TrypanBlau hinsichtlich der Veränderung der Zellzahl im Vergleich zu GCV-behandelten wt-Kontrollzellen analysiert (Abb. 27).

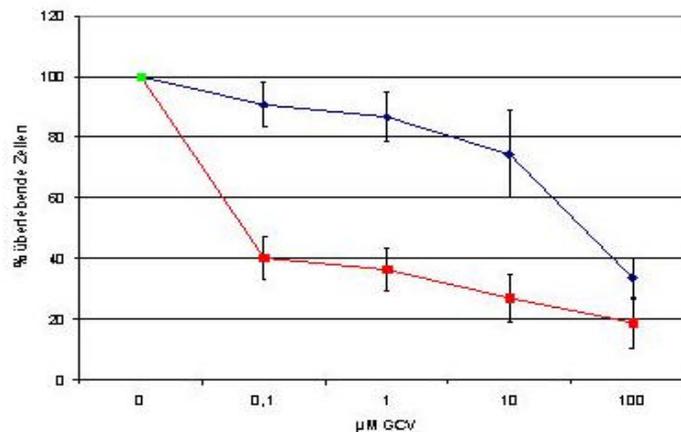


Abb. 27: Induktion der GCV-spezifischen Eliminierung von SHXtk39-exprimierenden Jurkat Zellen. (-) SHXtk39 transduzierte und selektierte Population; (-) nicht-transduzierte Kontrollpopulation. Die Werte wurden aus mindestens 3 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung gemittelt.

Die transduzierten und selektierten Zellen zeigten im Gegensatz zu den Kontrollzellen einen spezifischen GCV-Effekt. Bei einer Konzentration von 0,1 μM GCV wurden bereits bis zu 60 % der Zellen eliminiert, während die Kontrollzellen keine deutliche Änderung der Zellzahl zeigten. Die Behandlung der transduzierten und selektionierten Zellen mit höheren Konzentrationen GCV (bis zu 10 μM) führte zu einer verstärkten Reduktion der Zellzahl auf 80 %.

In Relation zu den Kontrolltestungen des tCD34 Proteins (Abb. 26B) und des HSV-tk39 Proteins (Abb. 23), zeigten die ersten Ergebnisse mit dem Fusionsprotein, dass weder die Expression, noch die Funktionalität der Einzelproteine durch die Fusion beeinträchtigt wurden. In den Bereichen der niedrigeren GCV-Konzentrationen (0,1-1 μM) zeigten die Zellen, die mit dem Fusionsvektor transduzierten waren eine höhere GCV-Sensitivität, die in einer stärkeren Reduktion der Zellzahl resultierte (Abb. 27), als die Zellen, die mit dem SXtk39-Kontrollvektor transduziert waren (Abb. 23). (Die geringere Effizienz des GCV-induzierten Zelltods durch den SXtk39-Kontrollvektor wurde nicht weiter analysiert, da für die Fortführung der Arbeit nur retrovirale Fusionsvektoren eingesetzt wurden.)

Vergleiche der Aktivitäten der wt HSV-tk zeigten, dass die Sensitivität der HSV-tk39 Mutante gegenüber GCV-Behandlung deutlich erhöht war. Im Konzentrationsbereich von 10 μM GCV führte die Expression der wt-HSV-tk (PGMO3T/N) lediglich zu einer Reduktion der Zellzahl um 40 % (4.1.1.2)

3.2.2 Optimierung des retroviralen Fusionsvektors

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass beide Komponenten des retroviralen SHXtk39-Vektors in Form eines Fusionsproteins funktional in den Zielzellen exprimiert wurden. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung in primären T-Zellen wurden, wie im Folgenden beschrieben, eine Reihe von Optimierungen durchgeführt, um ein verbessertes Vektorsystem, sowohl in Bezug auf die Transduktion und Selektion von primären T-Zellen, als auch hinsichtlich der Eliminierung der transduzierten Zellen im Falle einer GVHD, zu entwickeln. Vor allem die effiziente Expression des Transgens sowie die Langzeitexpression in den Zielzellen sollte optimiert werden.

3.2.2.1 Veränderung des retroviralen Vektorgerüsts

Um eine optimale Langzeitexpression des Transgens in primären T-Zellen zu erreichen wurden verschiedene Elemente des SHXtk39-Vektors ausgetauscht. Zur Verbesserung der Expression des Transgens wurden zum einen anstelle der SFFV-LTR die MPSV-LTR (4.1.1.3) eingesetzt und zum anderen wurde 3´ der Transgensequenz die WPRE-Sequenz (4.1.1.3) integriert. Das WPRE wurde über PCR (Tab. 13) aus dem Vektor pCGW (R. Zuffrey, Genf) amplifiziert.

PCR-Programm:	
5 min – 94 °C	
1 min - 94 °C	} 28 Zyklen
1 min - 59 °C	
2 min - 72 °C	
10 min – 72 °C	
∞ - 4 °C	

Tab. 13: PCR-Bedingungen für die Amplifikation des WPR-Elements.

Der 5´ Primer fügte eine endständige *HindIII* Erkennungssequenz ein. Der 3´Primer enthielt zwei Restriktionssequenzen für *ClaI* und endständig ebenfalls für *HindIII* (Tab. 14). Im Anschluss an die PCR wurde das ca. 600 bp große Produkt mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut, um überhängende Enden für die weitere Klonierung zu generieren.

	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Nukleotid- länge	Schnittstelle
5	WPREfor1	CCC AAG CTT CAA TCA ACC TCT GGA TTA C	28mer	<i>HindIII</i>
6	WPRErev	CCC AAG CTT ATC GAT GGC CCA AAG GGA GAT CCG ACT	36mer	<i>HindIII, ClaI</i>

Tab. 14: Primer der WPRE-Amplifikation.

Der retrovirale SXtCD34 Vektor (GSH, Frankfurt, Abb. 17), wurde mit dem Enzym *HindIII* linearisiert und mit dem WPRE-Fragment ligiert (SXtCD34w). Zur Analyse der korrekten Integration wurden Sequenzierungsreaktionen durchgeführt. In einem nächsten Schritt wurde der Austausch der LTR vorbereitet. Mit dem Restriktionsenzym *NheI* wurde der SXtCD34w Vektor verdaut, so dass ein ca. 2640 bp großes Fragment, bestehend aus der 5' SFFV-LTR, dem *tCD34* Gen und dem WPRE isoliert wurde. Parallel wurde ein weiterer Vektor M(Nhe) (GSH, Frankfurt, Abb. 17), der eine MPSV-LTR enthielt, mit dem gleichen Enzym linearisiert. Beide Fragmente wurden miteinander ligiert, so dass bei korrekter Integration ein Vektor mit einem **5'SFFV-LTR/tCD34/WPRE-Fragment** und einer 3'MPSV-LTR, die nach reverser Transkription (RT) die Expressions-kontrollierende LTR wurde (1.6.1.2), entstand (MxtCD34w). In einem letzten Schritt erfolgte der Austausch des 3' LTR-Bereichs (SFFV) des Fusionsvektors SHXtCD34tk39. Nach der Linearisierung mit dem Enzym *XhoI* erfolgte eine Klenow-vermittelte Enzymreaktion, um die überhängenden Enden des Verdau aufzufüllen und somit ein „glattes“ doppelsträngiges DNA-Ende für eine „blunt-end“ Ligation zu generieren. In einem zweiten Verdau wurde der linearisierte und Klenow-behandelte Vektor mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut, so dass ein ca. 600 bp großes Fragment, das nicht-kodierende Sequenzbereiche und die 3' SFFV-LTR beinhaltete, eliminiert wurde. Parallel wurde der MxtCD34w Vektor mit dem Enzym *AseI* linearisiert und ebenfalls durch eine Klenow-Reaktion in glatte doppelsträngige DNA-Enden umgewandelt. Im Anschluss erfolgte ein *HindIII* Verdau, wodurch ein 1250 bp großes Fragment mit der WPRE-Sequenz und der 3'MPSV-LTR isoliert und mit dem linearisierten SHXtk39 Vektor ligiert wurde (MtCD34tk39w, Abb. 28).

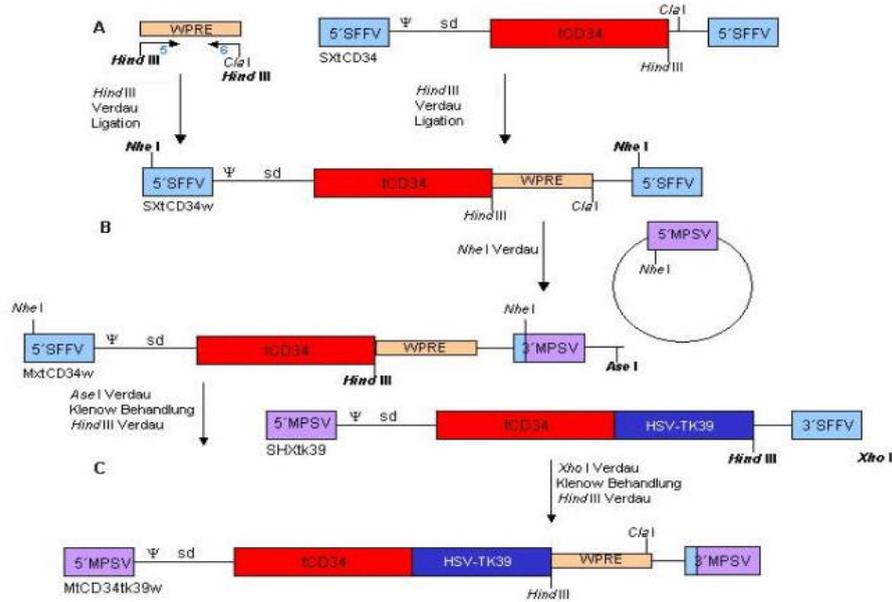


Abb. 28: Konstruktion des retroviralen MtCD34tk39w-Vektors. *sd* = spleiß donor; Ψ = Verpackungssignal; (A) Zwischenklonierung des WPRE-Elements in den retroviralen Vektor SxtCD34; (B) Klonierung der MPSV-LTR. (C) Entwicklung des optimierten retroviralen Fusionsgen-Vektors.

Ob die Veränderungen auf molekularer Ebene eine Auswirkung auf Expression und Funktionalität des Fusionsgens hatten wurde in folgenden Tests analysiert.

3.2.2.2 Transduktion, Selektion und Funktionalität des MtCD34tk39w-Vektors in T-Zelllinien.

Es wurden Analysen in Bezug auf Transduktionseffizienz, Selektion, Funktionalität und Langzeitexpression des MtCD34tk39w-Vektors in Jurkat-Zellen durchgeführt. Wie bereits beschrieben, wurden die Zellen mit transient transfizierten Phoenix gp GALV-pseudotypisierten Virusüberständen transduziert, durchflusszytometrisch hinsichtlich der tCD34-Expression analysiert, immunmagnetisch selektiert und abschließend nochmals durchflusszytometrisch untersucht, um die Effizienz der Anreicherung zu demonstrieren (Abb. 29).

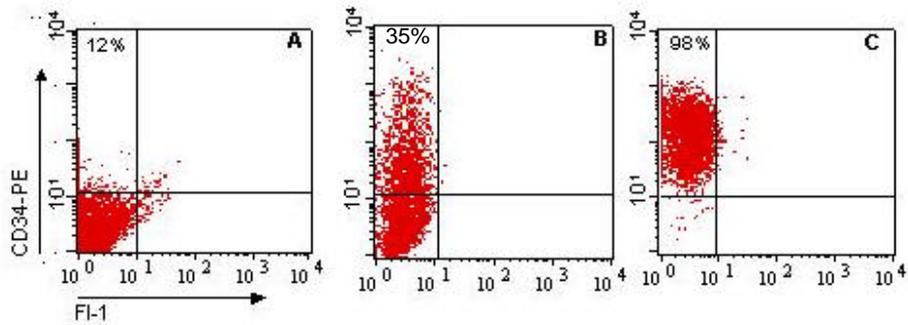


Abb. 29: FACS-Analyse der MtCD34tk39w-transduzierten und selektierten Jurkat-Zellen. (A) nicht-transduzierte Kontrollzellen; (B) MtCD34tk39w transduzierte Zellen; (C) MtCD34tk39w transduzierte und selektierte Zellen.

Die mittlere Transduktionsrate des MtCD34tk39w-Vektors in Jurkat-Zellen variierte zwischen 30 % und 60 % (abhängig von der Qualität der Virusüberstände). Durch immunomagnetische Separation konnten die transduzierten Populationen bis zu 97 % - 99 % Reinheit hinsichtlich der tCD34-Expression aufgereinigt werden. Vergleicht man die mittlere Fluoreszenz (MF) von ca. 160 mit der MF von ca. 220 des vorherigen Konstrukts SHXtk39, so war kein Anstieg im Expressionslevel zu erkennen (Abb. 30).

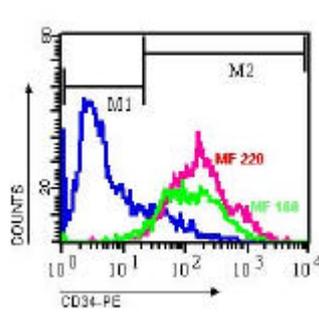


Abb. 30: Expressionsvergleich der transduzierten und selektionierten SHXtk39 und MtCD34tk39w Populationen. (-) MtCD34tk39w transduzierte und selektierte Jurkat-Zellen, (-) SHXtk39 transduzierte und selektierte Jurkat-Zellen. Die Zellen wurden mit einem direkt PE-markierten antiCD34-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (-) nicht-transduzierte Kontrollpopulation.

Ein direkt in Zusammenhang mit der Integration der MPSV-LTR und des WPRE stehender Effekt war anhand der FACS-Analysen in T-Zelllinien nicht zu erkennen.

Analog den ersten HSV-tk39-Funktionalitätstestungen wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an GCV behandelt und über TrypanBlau-Färbung in Bezug auf die Veränderung der Zellzahl im Vergleich zu einer nicht-transduzierten Kontrollpopulation untersucht (Abb. 31).

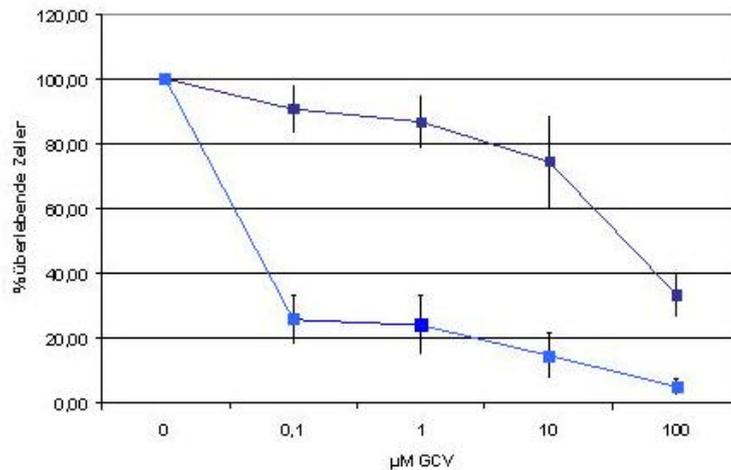


Abb. 31: GCV-Test der MtCD34tk39w Population. (–) MtCD34tk39w transduzierte und selektierte Jurkat-Population. Die Werte wurden aus mindestens 4 unabhängigen Testungen in Duplikaten gemittelt.

Durch Zugabe von 0,1 µM GCV wurden bis zu 70 % der Zellen spezifisch eliminiert und durch eine Erhöhung der Konzentration auf 10 µM konnte die Zellzahl noch einmal deutlich um weitere 15 % reduziert werden (80 %-85 %). Ein Vergleich dieser Daten mit den unter 3.2.1.4 ermittelten Daten des ursprünglichen Fusionsvektors (SHXtk39) zeigte, dass im Schnitt eine Effizienzerhöhung der HSV-tk39 Aktivität von ca. 15 % festzustellen war (Abb. 32).

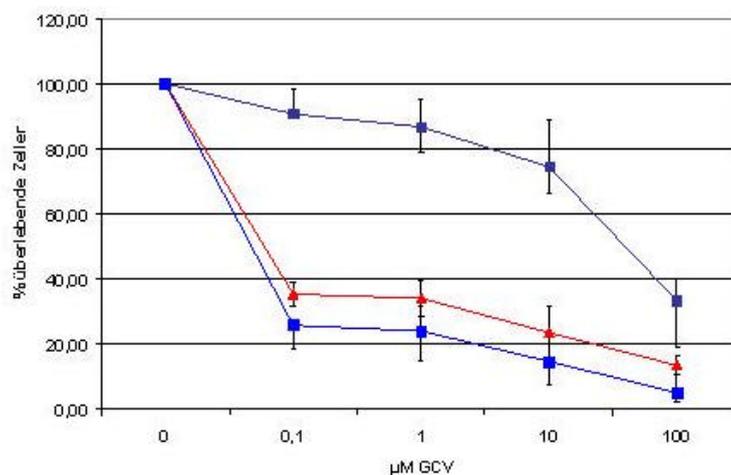


Abb. 32: Vergleich der GCV-Sensitivität SHXtk39 und MtCD34tk39w transduzierter und selektionierter Jurkat-Populationen. (–) MtCD34tk39w transduzierte und selektierte Zellen, (–) SHXtk39 transduzierte und selektierte Zellen, (–) Kontrollzellen. Die Daten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung gemittelt.

Das Transgen *per se* wurde im Rahmen der Vektoroptimierung nicht verändert. Die deutlich effizientere Eliminierung der transduzierten Zellen durch GCV-Behandlung stand scheinbar in direktem Zusammenhang mit der Integration der Expressions-verstärkenden Elemente,

obwohl man auf Basis der durchflusszytometrischen Analysen keine Aussage hinsichtlich eines verstärkenden Effekts in Bezug auf den Expressionslevel (MF) treffen konnte.

In einer abschließenden Gegenüberstellung der HSV-tk39-vermittelten GCV-Sensitivität der drei „Vektorgenerationen“ in transduzierten und selektierten Jurkat-Zellen konnte die Verbesserung der Suizid-Effizienz durch die Optimierung des Vektorgerüsts verdeutlicht werden (Abb. 33).

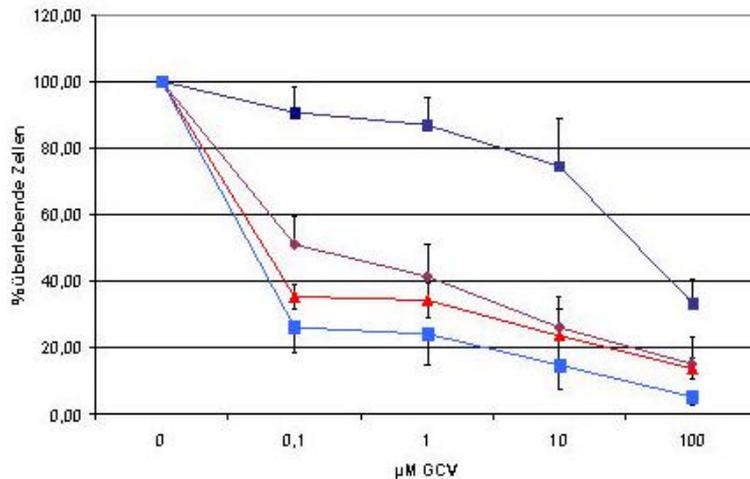


Abb. 33: Gegenüberstellung der Induktion des Zelltods aller Vektorgenerationen. Die ermittelten Werte setzen sich aus mindestens 4 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung zusammen. (○) Mock transduzierte Kontrollpopulation, (●) SXTk39 transduzierte und selektierte Population, (▲) SHXtk39 transduzierte und selektierte Population; (■) MtCD34tk39w transduzierte und selektierte Population.

In der folgenden Tabelle wurde eine Zusammenfassung der mittleren Transduktionseffizienzen und mittleren Fluoreszenzen als Maß der Expressionsstärke der beiden retroviralen Fusionsvektoren dargestellt (Tab. 15).

Vektorbezeichnung	mittlere Transduktionseffizienz	mittlere Fluoreszenz (MF)
SHXtk39	54 %	178
MtCD34tk39w	55 %	180

Tab. 15: Darstellung der mittleren Transduktionseffizienzen und MF's der beiden Fusions-Vektoren. Die Jurkat-Zellen wurden im Schnitt mit einer MOI von 2-3 transduziert.

Die einzelnen Abbildungen stellten repräsentative Beispiele aus einer Vielzahl von Transduktions- und Selektionsprozessen dar. Die zusammenfassende tabellarische Darstellung ermöglichte eine direkte Gegenüberstellung der mittleren Fluoreszenzen (gemittelt

aus verschiedenen Versuchen) der verschiedenen Vektoren. Der Vergleich der Mittelwerte zeigte, dass die Veränderung des Vektors durch Integration Expressions-verstärkender Elemente in keiner durchflusszytometrisch darstellbaren Verbesserung des Expressionslevels resultierte.

Die Expression des MtCD34tk39w-Vektors in T-Zelllinien (Jurkat) resultierte in einer GCV-induzierten Eliminierung der Zellen, die vergleichbar der Effizienzen anderer Vektoren war, die bereits in der Literatur beschrieben wurden (Tiberghien 1994, Qasim 2002).

3.2.2.3 Eliminierung der kryptischen Spleiß-Donor (*sd*) Sequenz des *HSV-tk39* Gens

Das *in vitro* Testsystem wurde für folgende Analysen verändert, so dass anstelle der Jurkat-Zelllinie die HUT78 Zelllinie (2.6.2.2.1) verwendet wurde und dass zur Detektion der Zellzahl neben der TrypanBlau-Färbung noch verschiedene andere Methoden, wie MTS-Tests (Cory 1991; 2.6.9.2) oder die Färbung apoptotischer Zellen mit Annexin-V FITC (2.6.7.2) zum Einsatz kamen.

Um eine potentielle Möglichkeit der Resistenzbildung durch einen Spleiß-Prozess (4.1.1.3) auszuschließen, wurde die Sequenz des *sd* in dem retroviralen MtCD34tk39w-Vektor durch eine Mutagenese-PCR (2.3.2) modifiziert. Die verwendeten Primer enthielten im Vergleich zu der wt HSV-tk39 Sequenz drei Punktmutationen, die zu einer Änderung der Basenabfolge führten, ohne die AS-Sequenz oder den Leserahmen des Proteins zu verändern (Tab. 16)

	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Nukleotidlänge
7	Mfor1	CAC CGC CTC GAC CAA G/GA GAA ATA G T G ORI TCG GCC GGG GAC GCG GC	41mer
8	Mrev1	GTG GCG GAG CTG GTT C/CT CTT TAT C A C ORI AGC CGG CCC CTG CGC CG	41mer

Tabelle 16: Primer der Mutagenese-PCR. Die modifizierten Basen sind **farbig** und **fett** hervorgehoben. Die Original-Basen sind **farbig** und **fett** in der folgenden Zeile dargestellt und mit ORI = Original Sequenz gekennzeichnet.

Die Mutagenese-PCR wurde auf Basis des Original HSV-tk39 Plasmids (pET23dHSV-TK39) durchgeführt. Anschließend wurde das mutierte HSV-tk39-Fragment über die Restriktionsenzyme *Sna*BI und *Sph*I isoliert und mit dem ebenso verdauten MtCD34tk39w Vektor ligiert. Über Sequenzierungsreaktionen wurde nachgewiesen, dass die kryptische *sd*-Sequenz tatsächlich modifiziert war, ohne dass der Leserahmen und die AS-Sequenz verändert wurden (MtCD34tk39mw). Es folgten durchflusszytometrische Expressionsanalysen auf Basis der HUT 78 T-Zelllinie (Abb. 34).

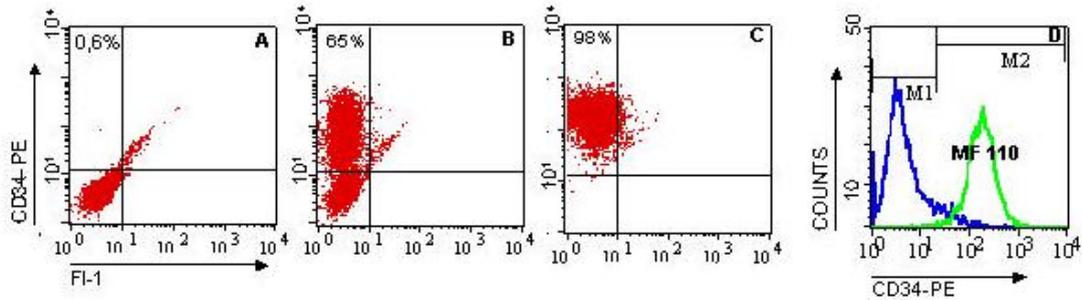


Abb. 34: FACS Analyse der MtCD34tk39mw transduzierten und selektierten HUT 78 Zellen. (A) nicht-transduzierte Kontrollzellen; **(B)** MtCD34tk39mw transduzierte Zellen; **(C)** MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte Population; **(D)** Histogrammanalyse der selektierten Zellen.

Die Transduktion der HUT 78 Zellen wurde nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, das für die Jurkat Zellen etabliert war (2.6.5). Die Transduktionseffizienzen mit transient transfizierten Phoenix gp GALV-pseudotypisierten Virusüberständen waren vergleichbar denen der Jurkat Zellen und variierten zwischen 30 % und 70 % in Abhängigkeit von der Qualität des Virusüberstands. Die immunomagnetische Selektion der tCD34-exprimierenden Zellen führte im Schnitt zu 98 % reinen Populationen. Diese Populationen wurden hinsichtlich der GCV-spezifischen Induktion des Zelltods im Vergleich zu MtCD34tk39w (nicht spleiß-korrigiert) transduzierten und selektierten HUT 78 Zellen sowie nicht-transduzierten Kontrollzellen in GCV-Sensitivitätstestungen analysiert. Die MtCD34tk39w Population diente als Kontrolle, um eine mögliche Zelllinien-abhängige Veränderung der GCV-Reaktivität zu demonstrieren und gleichzeitig ein funktionales System als Vergleich zu haben, um eventuelle Veränderungen durch die *sc*-Modifikation zu detektieren.

Bevor die Zellen zur MTS-Analyse eingesetzt wurden erfolgte nach drei Tagen eine mikroskopische Analyse der mit 10 μ M GCV behandelten Populationen (Abb. 35).

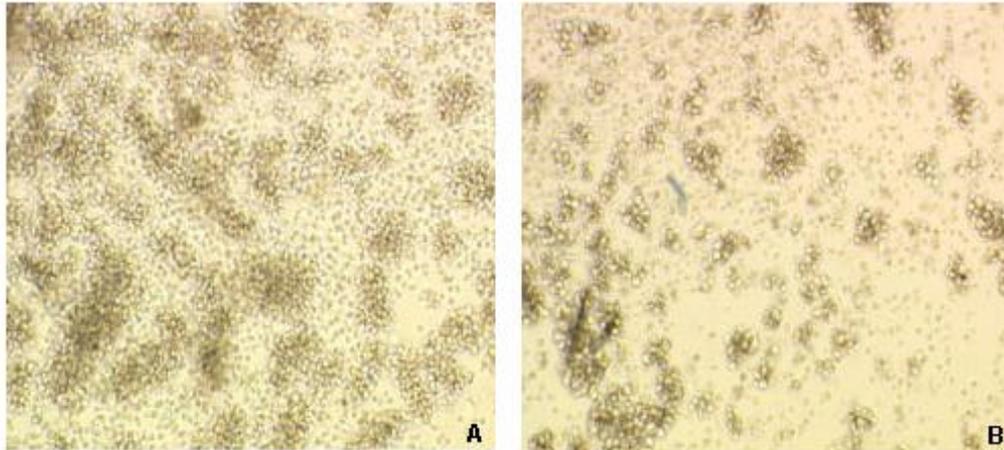


Abb. 35: Mikroskopische Darstellung der GCV-behandelten Kontrollzellen und der MtCD34tk39mw transduzierten und selektierten Zellen. (A) Nicht-transduzierte HUT 78 Kontrollzellen nach 3 tägiger GCV-Behandlung mit 10 μM GCV. **(B)** MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte HUT 78 Zellen nach 3 tägiger GCV-Behandlung mit 10 μM GCV.

Die Kontrollpopulation zeigte das für HUT 78 typische „Cluster“-Wachstum. Morphologisch handelte es sich bei den Einzelzellen um runde, wenig granuläre Zellen (Abb. 35A). Das mikroskopische Bild der mit 10 μM GCV behandelten MtCD34tk39mw transduzierten und selektierten Population zeigte deutliche Unterschiede zur Kontrolle. Partiiell war die „Cluster“-Bildung proliferierender Zellen noch erkennbar, aber die deutliche Reduktion der Proliferationsfähigkeit durch die GCV-Behandlung wurde durch die signifikant geringere Zellzahl bereits deutlich. Die noch verbliebenen, erkennbaren Zellen waren im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht mehr symmetrisch rund und zeigten eine deutlich stärkere Granularität, was darauf hindeutete, dass es sich bei diesen Zellen um apoptotische, bzw. tote Zellen handelte (Abb. 35B).

Um eine genaue Aussage über den GCV-Effekt treffen zu können, wurden die Populationen am fünften Tag mit Hilfe des kolorimetrischen MTS-Tests analysiert (Abb. 36).

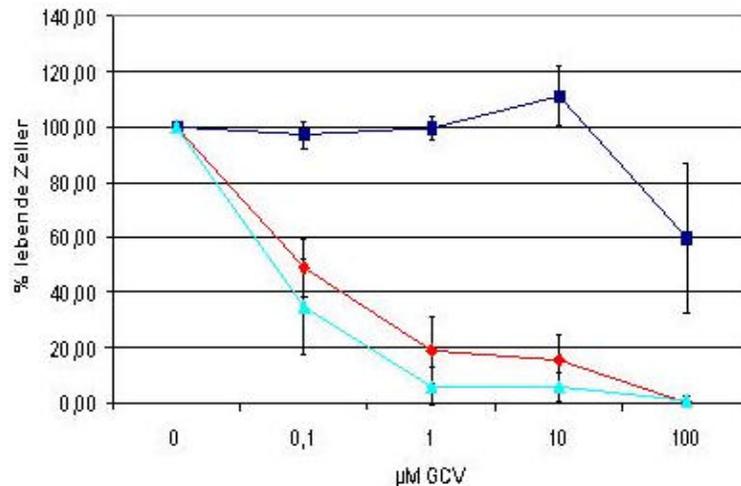


Abb. 36: MTS-Analyse der transduzierten und selektierten HUT 78 Populationen. (-) HUT 78 Kontroll Population, (-) MtCD34tk39w transduzierte und selektierte HUT78 Population, (-) MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte HUT 78 Population. Die Werte wurden als Verhältnis der $(OD_{490} + GCV : OD_{490} - GCV) \times 100$ dargestellt und wurden aus mindestens 3 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung gemittelt.

Die beiden verschiedenen transduzierten HUT 78-Populationen zeigten den transduzierten Jurkat-Zellen vergleichbare GCV-Sensitivitäten, so dass die Verwendung einer anderen T-Zelllinie in keiner Limitierung des Testsystems resultierte.

Die Transgen-exprimierenden Zellen zeigten eine signifikante GCV-Sensitivität bereits bei niedrigen GCV-Konzentrationen. Nahezu 100 % (95 %-99 %) der mit der Spleiß-korrigierten HSV-tk39 Sequenz transduzierten Zellen konnten durch die Anwendung von 1 µM und 10 µM GCV eliminiert werden. Im Vergleich zu der nicht spleiß-korrigierten HSV-tk39 wurde die Effizienz des Suizidsystems durch die Korrektur des *sd* um ca. 10 % verbessert. Obwohl auf Basis von RT-PCR's und normalen PCR's kein Spleiß-Produkt, bzw. Spleiß-Vorgang detektiert werden konnte, der zur Bildung eines inaktiven HSV-tk39 Proteins führen könnte, schien die Modifikation der *sd*-Sequenz zu einer verbesserten Eliminierung der Zellen zu führen. Durchflusszytometrische Analysen der Zellen nach 4tägiger GCV-Behandlung zeigten, dass von den noch lebenden 4 % ca. 80 % den tCD34-Selektionsmarker auf der Zelloberfläche exprimierten, während nach zusätzlicher zweitägiger Inkubation nur noch ca. 1 % der Zellen überlebte und davon nur noch 12 % der Zellen tCD34 exprimierten (4.1.1.3).

Zusätzlich wurde der MtCD34tk39mw Vektor dergestalt modifiziert, dass sowohl *sd* als auch *sa* mutiert wurden (MtCD34tk39msaw), was jedoch in keiner weiteren Verbesserung der Eliminierungseffizienz resultierte (Abb. 37). Die folgenden Analysen in humanen primären T-Zellen wurden mit dem *sd*-mutierten MtCD34tk39mw Vektor durchgeführt

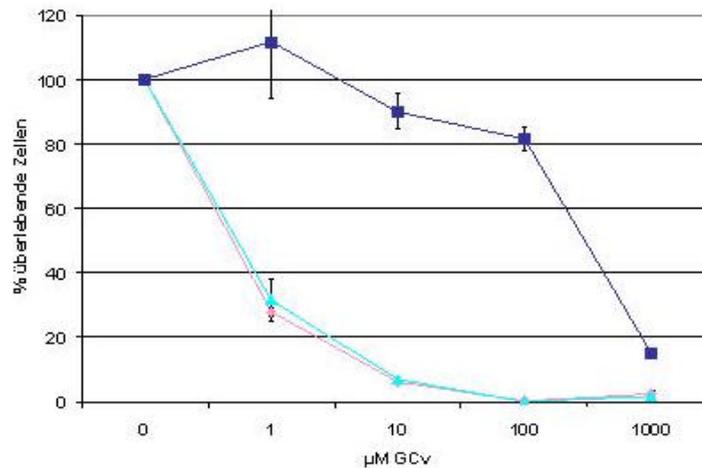


Abb. 37: Vergleichende MTS-Analyse der GCV-spezifischen Induktion des Zelltods in MtCD34tk39mw und MtCD34tk39msaw transduzierten HUT 78-Zellen. (-) Kontrollzellen, (-) MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte HUT 78 Zellen; (-) MtCD34tk39msaw transduzierte und selektierte HUT 78 Zellen. Die Zellen wurden für 4Tage mit verschiedenen Konzentrationen an GCV behandelt.

Die Analysen in den verschiedenen Zelllinien zeigten, dass es sich bei dem optimierten MtCD34tk39mw Vektor um einen effizienten retroviralen Gentransfer-Vektor im Sinne der Transduktion, Selektion und GCV-spezifischen Eliminierung von Zellen handelte.

Da die spezifische Induktion des Zelltods durch das HSV-tk39 Suizidprotein ausnahmslos auf teilende Zellen beschränkt war, bestand die Möglichkeit, dass zumindest ein Teil der ca. 4 % überlebenden Zellen auf sogenannte „ruhenden“, nicht proliferierende Zellen zurückzuführen war. Im Hinblick auf die Anwendung in einem pädiatrischen *setting* war eine Eliminierung sowohl der teilenden, als auch der ruhenden Zellen wünschenswert, so dass noch ein zweiter retroviraler Selektions/Suizid-Fusionsvektor entwickelt wurde, der unabhängig vom Proliferationsstatus der Zelle agierte (3.2.3) und eine spätere Kombination zweier verschiedener Fusionsproteine in einem retroviralen Vektor ermöglichte.

3.2.3 Entwicklung des DED basierten retroviralen Suizid-Vektors

Um einen direkten Vergleich beider Vektoren in Bezug auf Transgenexpression und Effizienz des induzierten Zelltods zu ermöglichen, wurde das chimäre tCD34/HSV-tk39 Fusionsprotein gegen das Δ LNGFR/Fv'Fv/DED Fusionsprotein ausgetauscht, so dass die Basis des retroviralen Vektors, wie LTR und WPRE, erhalten blieb.

Das DED-Element des humanen FADD-Moleküls (1.7.2) wurde durch die Fusion mit zwei modifizierten FKBP-Domänen (Fv' und Fv, *ARIAD Regulated Homodimerization Kits* (ARIAD Pharmaceuticals, Inc.), Clackson 1998, Thomis 2000) regulierbar gemacht. Die spezifische

Gabe des synthetischen FK506-Analogs AP20187 (Abb. 38), das weder immunsuppressiv wirkt, noch toxisch für die Zellen ist, induziert die Dimerisierung dieses Fusionsproteins und resultiert in der Apoptose.

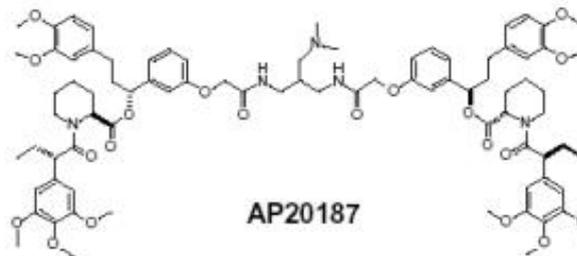


Abb. 38: Chemische Struktur des AP20187-Moleküls.

3.2.3.1 Konstruktion des Fusionsgens Δ LNGFR/Fv'Fv/DED in einem retroviralen Vektor

Das Klonierungsplasmid pNF2hmpl (A. Blau, Seattle, USA, Abb. 15) enthielt bereits ein Fusionsgen bestehend aus einem Oberflächenmarker (Δ LNGFR), den zwei Dimerisierungsdomänen Fv'Fv und der Sequenz des *hmpl*-Gens. Über Restriktion mit den Enzymen *SpeI* und *Bam*HI wurde die Sequenz des *hmpl*-Gens eliminiert. Parallel dazu wurde ein 625 bp langes PCR-Produkt des humanen FADD-Moleküls aus dem Plasmid pCDNA3.1FADD/ER (GSH, Frankfurt, Abb. 16) amplifiziert. Der Vorwärts-Primer enthielt eine 5' endständige Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *SpeI* (Tab. 17). Der reverse Primer fügte 3' endständig eine *Bam*HI-Erkennungssequenz ein. Das entstandene Fusionskonstrukt Δ LNGFR/Fv'Fv/FADD wurde über eine weitere PCR mit der 5' endständigen Schnittstelle *NotI* und der 3' endständigen Schnittstelle *Hind*III amplifiziert (Tab. 17), mit den entsprechenden Enzymen verdaut und mit dem *NotI*, *Hind*III linearisierten MtCD34tk39mw Vektor (tCD34/tk39 wurde ausgeschnitten) ligiert (MNF2FADD).

Die DED des humanen FADD-Moleküls wurde aus dem Vektor pCDNA3.B/FADDER (GSH, Frankfurt) über PCR amplifiziert. Der Vorwärts Primer enthielt neben einer 5' endständigen Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *SpeI* noch einen *Glycin-Serin Spacer* (SGSGGS). Der reverse Primer fügte 3' endständig eine *Hind*III Erkennungssequenz ein (Tab. 17).

	Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Nukleotidlänge	Schnittstelle
9	FADDrevklon	GCT AGT GGA TCC GAC GCT TCG GAG G	25mer	<i>Bam</i> HI
10	FADDspefor1	GGG CGA CTA GTG CCA TGG ACC CGT TCC TGG TGC TG	35mer	<i>Spe</i> I
11	FADDrevhind 2	CGC GCC CAA GCT TGG CTA GCT AGT GGA TCC GAC GCT TCG GAG GTA G	46mer	<i>Hind</i> III
12	Lngfrfornt2	GGC GAA GGA AAA AA G CGG CCG CAA AGC GAT GGG GGC AGG TGC CAC CGG CC	50mer	<i>Not</i> I
13	FADD5sp	CCG G AC TAG TGG ATC AGG TGG AGG CAG TGA CCC GTT CCT GGT GCT	45mer	<i>Spe</i> I, GS- Spacer
14	FADDdDD10 0 rev	GGC CC A AGC TTT CAT GCT GCA CAC AGG TCT TCT TCC C	37mer	<i>Hind</i> III

Tab. 17: Primer der DED-Klonierung. Die Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen wurden **farbig** und **kursiv** hervorgehoben. Der GS-Spacer wurde **farbig** markiert. **TCA** = Stopcodon in reverser Orientierung (*)

Parallel zu dem *SpeI/HindIII* Verdau des DED PCR-Fragments wurde der MNF2FADD-Vektor ebenso verdaut. Da die Schnittstelle *SpeI* zweimal im Vektor enthalten war, musste eine 3-Fragment Ligation durchgeführt werden (MNFv'FvDED), wobei ein Element nicht gerichtet integrierte, so dass die Klonierung über Sequenzierungsreaktionen überprüft wurde (Abb.39).

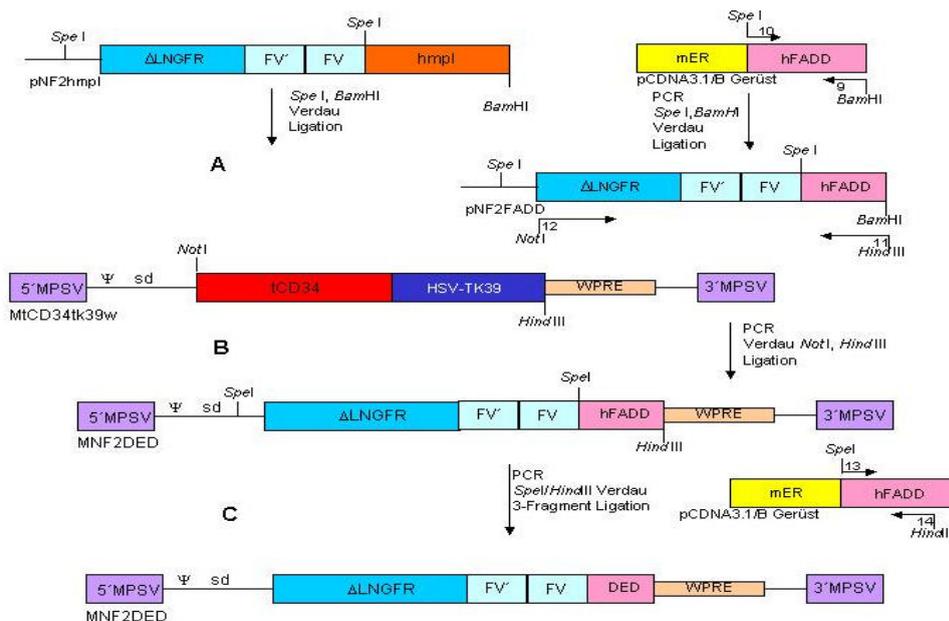


Abb. 39: Schematische Darstellung der MNFv'FvDED-Klonierung. (A) pNF2FADD-Vorstufe; (B) retrovirale FADD-Vorstufe; (C) retroviraler MNFv'FvDED-Vektor.

Die Sequenzierungsreaktionen zeigten, dass ein offener Leserahmen, beginnend mit dem Δ LNGFR-Startcodon bis zu dem DED-Stopcodon zu finden war.

Das Prinzip der spezifischen Eliminierung DED-transduzierter Zellen wurde bereits beschrieben (1.7.2). Analog zu den Expressions- und Funktionalitätstestungen der HSV-tk39 transduzierten und selektierten Zellen wurden für die Untersuchungen des MNFv´FvDED Vektors ebenfalls HUT 78-Zellen mit dem retroviralen Vektor transduziert und immunomagnetisch über die Δ LNGFR-Expression aufgereinigt (Abb. 40)..

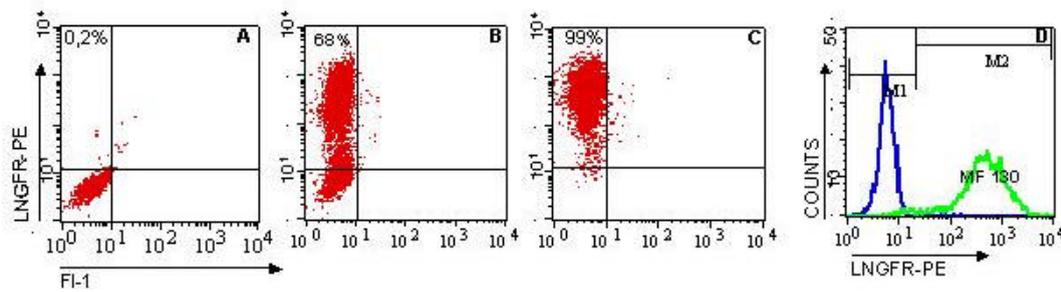


Abb. 40: FACS-Analyse der MNFv´FvDED transduzierten und selektierten HUT 78 Population. (A) nicht-transduzierte Kontrollpopulation; (B) MNFv´FvDED transduzierte Population; (C) MNFv´FvDED transduzierte und selektierte Population; (D) Histogramm der transduzierten und selektierten Zellen: der **blaue** Peak repräsentiert die nicht-transduzierten Zellen, der **grüne** Peak stellt die transduzierten und selektierten Zellen dar.

Das retrovirale Gerüst des MNFv´FvDED Vektors entsprach dem des MtCD34tk39mw Vektors und war in Bezug auf die Transkriptions-kontrollierenden Elemente nicht verändert worden. Die einzige Veränderung bestand in dem Austausch des Transgens. Das Transgen *per se* sollte keine direkte Einwirkung auf das Transduktionsverfahren haben. Eine Varianz im Expressionslevel ist durchaus möglich, da die Kompatibilität zwischen Promotor (i.d.F. die virale LTR) und Transgen eine wichtige Rolle spielt. Vergleicht man die Transduktionseffizienzen des MNFv´FvDED Vektors mit denen des MtCD34tk39mw Vektors bei gleicher MOI (zwischen 1 und 2), so sind wie in der Expressionsstärke (MF) des Transgens keine deutlichen Unterschiede zu erkennen.

Ein weiterer Aspekt, der gleichzeitig mit der immunomagnetischen Selektion überprüft werden konnte, war die potentielle Induktion der DED-Apoptose-Kaskade durch Bindung des Antikörpers an das Δ LNGFR-Oberflächenmolekül. Die Interaktion des LNGFR-Rezeptors mit dem zugehörigen Liganden führt normalerweise zu einer Dimerisierung des Rezeptors. Sollte die Dimerisierung des Rezeptors ausreichen, um den intrazytoplasmatischen Fusionsteil ebenfalls zu dimerisieren, so würde gleichzeitig die Apoptose-Kaskade durch die dimerisierte DED ausgelöst und die transduzierten und selektionierten Zellen würden sterben. Die Selektion der Δ LNGFR exprimierenden Zellen führte allerdings in keinem Fall zu einer

apoptotischen Population, sondern die angereicherten Populationen (94 % bis 98 %) konnten genauso lange kultiviert werden, wie die nicht-transduzierten wt-Zellen.

3.2.3.2 Analyse der Funktionalität des DED-Suizidproteins in T-Zelllinien

In Funktionalitätstestungen des AP20187 Homodimerisierungssystems (ARIAD Pharmaceuticals, Inc.; Manual) wurde gezeigt, dass im Konzentrationsbereich von 10 nM bis 100 nM AP20187 ein maximaler Effekt zu beobachten war. Um die Funktionalität des retroviralen DED-basierten Suizid-Vektors zu überprüfen, wurden die MNFv´FvDED transduzierten und selektionierten HUT 78-Populationen mit verschiedenen Konzentrationen des AP20187-Dimerisierers für 3 - 4 Tage inkubiert. Jeden Tag wurde das Medium gewechselt und mit frischen AP20187 versetzt. Bevor die Zellen in Bezug auf die Veränderung der Zellzahl mit MTS-Tests und Annexin-V FITC Färbungen analysiert wurden, erfolgte eine mikroskopische Analyse der Zellmorphologie, um durch Apoptose hervorgerufene Veränderungen zu visualisieren (Abb. 41).

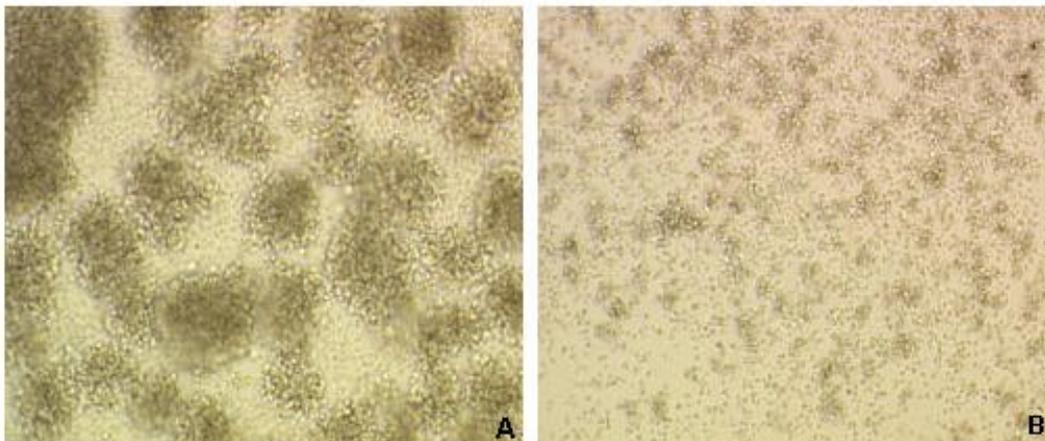


Abb. 41: Mikroskopische Darstellung der AP20187 (10 nM)-behandelten MNFv´FvDED transduzierten und selektierten HUT 78 Zellen. (A) nicht-transduzierte HUT 78 Kontroll-Zellen; (B) MNFv´FvDED transduzierte und selektierte HUT 78 Zellen.

Die hier abgebildeten Zellen wurden mit 10 μ M AP20187 für 3 Tage behandelt und mikroskopisch analysiert. Die nicht-transduzierten Kontrollzellen zeigten trotz AP20187-Behandlung normale Proliferation in Form von „Cluster“. Die einzelne Zelle zeigte wie bereits beschrieben eine runde, wenig granuläre Morphologie. Im Gegensatz dazu sah das mikroskopische Bild der AP20187-behandelten DED-exprimierenden Zellen ganz anders aus. Neben einer deutlich geringeren Zellzahl waren weder „Cluster“, die auf Proliferation der Zellen schließen ließen, noch morphologisch normale Zellen zu erkennen. Die neben den

wenigen noch intakten Zellen vorkommenden apoptotischen Zellen zeichneten sich durch ihre veränderte Morphologie (extrem granulär, keine deutlich symmetrische Form) aus. Zur genaueren Analyse der DED-Suizid Aktivität wurden am vierten oder fünften Tag MTS-Tests und Färbungen mit dem Apoptosemarker Annexin-V FITC durchgeführt (Abb. 42).

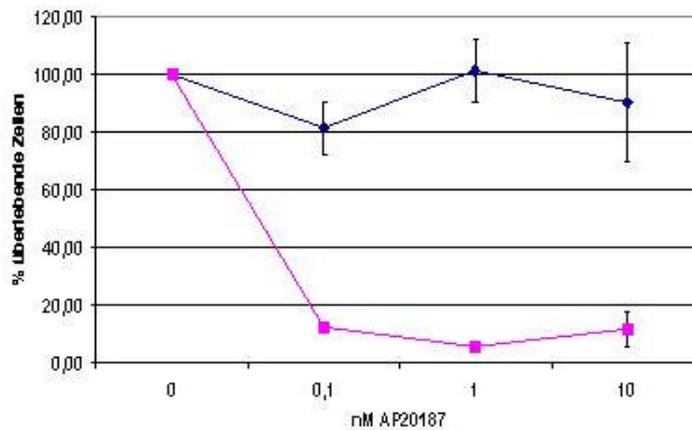


Abb. 42: AP20187 induzierter Zelltod von MNFvFvDED transduzierten und selektierten HUT 78-Zellen. (-) nicht-transduzierte HUT 78 Kontroll Zellen, (◻) MNFvFvDED transduzierte und selektierte HUT 78 Zellen. Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Testungen in Triplikaten (MTS-Tests).

Die DED-exprimierenden Zellen zeigten eine deutliche Reduktion der Zellzahl als Reaktion auf die AP20187-Behandlung. Zwischen den einzelnen Konzentrationen (0,1-10 nM) war keine deutliche Differenz hinsichtlich der Induktion der Apoptose festzustellen. Bereits die niedrigste Konzentration von 0,1 nM AP20187 resultierte in einer Reduktion der Zellzahl auf 10 %. Die Verwendung höherer Konzentrationen (1-10 nM) führte jedoch zu keiner Verstärkung des Effekts, sondern eine ca. 10 %ige „resistente“ Population blieb auch bei der Verwendung von 10 nM AP20187 bestehen. Die durchflusszytometrische Analyse der überlebenden Zellen zeigte, dass von den ca. 10 % lebenden Zellen noch ungefähr 20 % Δ LNGFR auf ihrer Oberfläche exprimierten.

Die Induktion des DED-vermittelten Zelltods zeigte im Vergleich zu dem HSV-tk39 induzierten Zelltod eine etwas geringere Effizienz (85 % vs. 95 %).

Beide retroviralen Suizidvektoren ermöglichten eine Transduktion und Selektion der HUT 78 Zellen und vermittelten eine jeweils Transgen-spezifische Induktion der Apoptose.

Langzeit-Kultivierungen (bis zu 3 Monaten) von transduzierten und selektionierten HUT 78 Zellen wurden für beide retroviralen Vektoren durchgeführt und hinsichtlich der stabilen Expression des Transgens und der Aktivierung des jeweiligen Suizidproteins, verbunden mit der spezifischen Induktion der Apoptose, analysiert. Es wurden keine Unterschiede zu frisch-aufgetauten oder kurz-kultivierten Zellen detektiert (Tab. 18).

	MtCD34tkk39mw			MNFv FvDED		
Kultivierungsdauer (Wochen)	1	6	12	1	6	12
% Transgen- exprimierende Zellen	99	97	98	97	96	97
% induzierte Apoptose	98	95	97	85	81	86

Tab. 18: Vergleich der Transgenexpression und der spezifischen Induktion der Apoptose von kurz- und lang-kultivierten transduzierten und selektionierten HUT 78 Zellen.

3.3 Analysen beider Vektoren in humanen primären T-Zellen

Zelllinien weisen im Vergleich zu primären Zellen Veränderungen auf, wie z. B. die Zytokin-unabhängige Proliferation. Um ein System für die klinische Anwendung zu etablieren, müssen die notwendigen Testungen nach Entwicklung und Optimierung in den leichter kultivierbaren Zelllinien auch auf Basis der eigentlichen primären Zielzellen durchgeführt werden, da diese Zellen unter Umständen einer der Zelllinie verschiedene Reaktion zeigen.

Für die bisher durchgeführten klinischen Studien, in denen die genetische Modifikation von hämatopoetischen Stammzellen oder T-Lymphozyten involviert war, wurden ausnahmslos retrovirale Vektoren auf Basis des *Moloney-murine-leukemia-virus* (MuLV) verwendet (1.6.2).

Die Aktivierung der primären T-Zellen für die *ex vivo* Transduktion mit den retroviralen Vektoren wurde analog verschiedener veröffentlichter Protokolle (Movassagh 2000, Lamana 2001) durchgeführt. Nach Isolation der primären humanen T-Zellen wurden sie in RPMI1640 Medium und einer Kombination aus antiCD3 Antikörper (OKT-3, Janssen-Cilag) und Interleukin-2 (hIL-2, Chiron), bzw. einer Kombination aus antiCD28 Antikörper (BD-Pharmingen), OKT-3 und IL-2 für 3 Tage prä-stimuliert (2.6.3). Die aktivierten Zellen wurden in drei Transduktionsrunden (2.6.5.2) mit dem jeweiligen Vektor transduziert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 43).

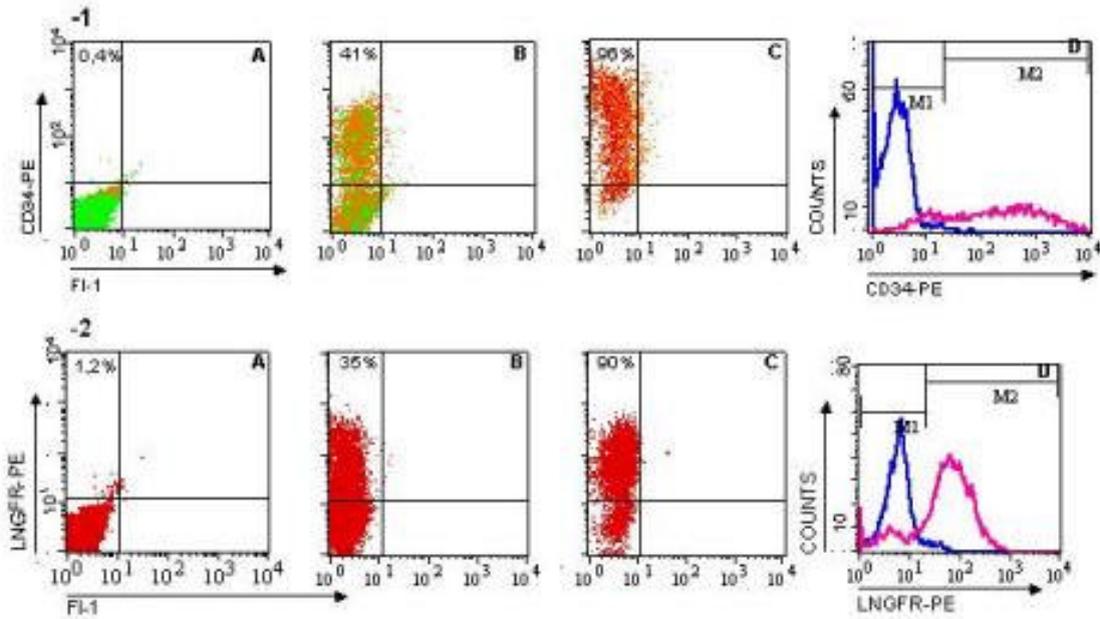


Abb. 43: FACS Analysen der MtCD34tk39mw/MNFv'FvDED transduzierten und selektierten primären T-Zellen. -1 (A) nicht-transduzierte Kontrollzellen; (B) MtCD34tk39mw transduzierte primäre T-Zellen, (C) MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte primäre T-Zellen, (D) Histogramm Analyse der transduzierten und selektierten primären T-Zellen. Der **blaue** Peak repräsentiert die nicht-transduzierten Kontrollzellen, der **pinkfarbene** Peak repräsentiert die selektierten Zellen. -2 (A) nicht-transduzierte Kontrollzellen; (B) MNFv'FvDED transduzierte primäre T-Zellen; (C) MNFv'FvDED transduzierte und selektierte primäre T-Zellen; (D) Histogramm Analyse der transduzierten und selektierten primären T-Zellen. Der **blaue** Peak repräsentiert die nicht-transduzierten Kontrollzellen, der **pinkfarbene** Peak repräsentiert die selektierten Zellen.

Für die Produktion der Virusüberstände wurden zu Beginn transient transfizierte Phoenix gp Verpackungszellen verwendet. Später wurden auch stabil transduzierte PG13 (2.6.2.1.3) Verpackungszelllinien entwickelt (Tab. 19).

Verpackungszelllinie	Konstrukt	Titer (TU/ml)	MOI
Phoenix gp	MtCD34tk39mw	1,5 x 10 ⁶	1,5 - 3
PG13	MtCD34tk39mw	1 x 10 ⁶	0,5 - 1
Phoenixgp	MNFv'FvDED	1,5 x 10 ⁶	1,5 - 3
PG13	MNFv'FvDED	1 x 10 ⁶	0,5 - 1

Tab. 19: Titer und MOI der Virusüberstände für die Transduktion primärer T-Zellen. TU/ml = transducing units per ml; MOI = multiplicity of infections.

Zumeist wurden die Zellen mit einer MOI von ~1,5 transduziert, was im Kontext von drei Transduktionsrunden einer finalen MOI von 3-4,5 entsprach. Die Transduktionseffizienz variierte zwischen 30 % und 50 %, abhängig von der Qualität des Virusüberstandes; die Transduktion mit Virusüberständen aus transient transfizierten Verpackungszellen schien

etwas effizienter zu sein, was möglicherweise auf die höheren Titer zurückzuführen war. Beide Vektoren zeigten vergleichbare Effizienzen sowohl in der Transduktion, als auch in der Selektion. Im Vergleich zu T-Zelllinien resultierte die immunomagnetische Selektion über eine einzelne MiniMacs-Säule (Miltenyi Biotec) in Populationen, die zu 91 % - 97 % Transgen-positiv waren. Um eine effizientere Selektion zu erzielen, wäre eine Selektion über zwei hintereinandergeschaltete Säulen oder über die Verwendung von zwei verschiedenen Oberflächmolekülen möglich.

3.3.1 Proteinchemische Analysen der Expression der Fusionsproteine nach Transduktion und Selektion von primären humanen T-Zellen

Neben den durchflusszytometrischen Analysen der Transgenexpression wurde die Fusionsprotein-Expression des weiteren mit Hilfe von Western Blots untersucht. 1×10^7 transduzierte und selektierte Zellen wurden lysiert und im Anschluss in einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese nach den Molekülgrößen der Proteine aufgetrennt. Abschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und mit einem spezifischen Antikörper gegen das jeweilige Oberflächenmarkerprotein detektiert. Da T-Zellen von Natur aus weder CD34 noch Δ LNGFR an ihrer Oberfläche exprimieren, sollte die Detektion des Antikörpers in nur einer spezifischen Bande des Fusionsproteins resultieren.

3.3.1.1 Das tCD34/HSV-tk39 Fusionsprotein

Von den MtCD34tk39mw transduzierten und selektierten Zellen wurden Lysate angefertigt und mit einem mAk gegen humanes CD34 (sc9095, Santa Cruz) in einem Western Blot analysiert. Die rein rechnerisch ermittelte molare Masse des ca. 2.100 bp langen tCD34/HSV-tk39 Fusionsproteins betrug ungefähr 77 kD. Das CD34-Molekül ist jedoch ein stark-glykosyliertes Protein und hat eine alleinige molare Masse von 105 kD bis 120 kD, abhängig von dem Glykosylierungsmodus der Zielzelle. Durch die Fusion mit dem ca. 50 kD großen HSV-tk39 Protein entstand ein Fusionsprotein mit einem zu erwartenden Molekulargewicht von 155 kD bis 170 kD. Um die unterschiedliche Größe des tCD34-Einzelproteins und des tCD34/HSV-tk39 Fusionsproteins zu verdeutlichen, wurden tCD34 enthaltende Kontroll-Lysate der Phoenix gp Verpackungszellen mitgeführt (Abb. 44).

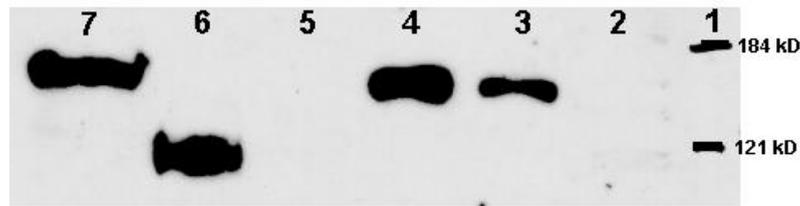


Abb. 44: Western Blot der MtCD34tk39mw transduzierten und selektierten primären humanen T-Zellen. 1- Bench-Marker, 2- Zellextrakte von nicht-transduzierten primären T-Zellen, 3 bis 4- Zellextrakte von MtCD34tk39w transduzierten und selektierten primären T-Zellen, 5 Zellextrakte von nicht-transduzierten Phoenix gp-Zellen, 6 Zellextrakte von SHXw transfizierten Phoenix gp-Zellen, 7- Zellextrakte von MtCD34tk39mw transfizierten Phoenix gp-Zellen. Der Western Blot wurde mit dem mAk antiCD34 (SantaCruz, 1:200) durchgeführt.

Um Banden, die durch unspezifische Reaktionen des Antikörpers detektiert wurden als falsch positive Signale auszuschließen, wurden Zellextrakte von nicht-transduzierten Kontrollzellen mitgeführt (Abb. 44/2 und /5). Spezifische Signale wurden sowohl in den Lysaten der primären tCD34/tk39 exprimierenden T-Zellen (Abb. 44/3 und /4), als auch in den tCD34 und tCD34/tk39 exprimierenden Phönix gp Zellen detektiert (Abb. 44/6 und/7). Das in den primären T-Zellen identifizierte Protein hatte ein Molekulargewicht von ca. 160 kD, was der für das Fusionsprotein angenommenen Größe entsprach. In den Verpackungszellen wurde ein spezifisches Signal des Fusionsproteins mit einer Größe von ca. 170 kD detektiert. Diese kleine Diskrepanz in der Größe war vermutlich auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster der verschiedenen Zellen zurückzuführen. Als Kontrolle wurden zusätzlich Phönix gp Zellen analysiert, die das tCD34-Protein als Einzelprotein exprimierten (Abb. 44/6), um die Größenveränderung durch Fusion mit dem HSV-tk39 Protein zu verdeutlichen.

Die tCD34/tk39 exprimierenden T-Zellen zeigten außer der Fusionsprotein-spezifischen Bande keine weitere Bande im Bereich der zu erwartenden tCD34-Größe von 105 kD-120 kD.

3.3.1.2 Das DLNGFR/Fv´Fv/DED Fusionsprotein

Analog zu der proteinchemischen Analyse der MtCD34tk39mw transduzierten und selektierten primären T-Zellen wurden die MNFv´FvDED transduzierten und selektierten primären T-Zellen hinsichtlich der korrekten Expression des Δ LNGFR/Fv´Fv/DED Fusionsproteins im Western Blot untersucht. Die spezifische Detektion des Fusionsproteins konnte mit zwei verschiedenen mAk durchgeführt werden: antiLNGFR Antikörper (C40-1457, BD-Pharmingen) oder antiFKBP12 Antikörper (PA1-026A, Dianova). Für das 1.081 bp große Δ LNGFR/Fv´Fv/DED Fusionsprotein wurde ein Molekulargewicht von ca. 67 kD errechnet, ohne Berücksichtigung von Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, da über solche weder in Bezug auf den Oberflächenmarker, noch in Bezug auf die DED etwas bekannt war (Abb. 45).

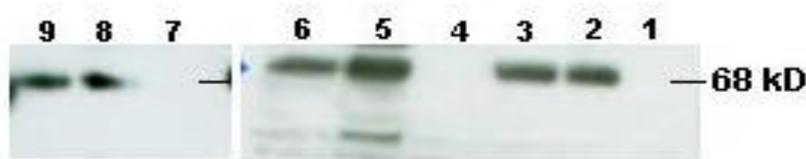


Abb. 45: Western Blot Analyse der MNFv'FvDED transduzierten und selektierten primären T-Zellen. 1- Zellextrakt nicht-transduzierter HUT78 Zellen; 2 bis 3- Zellextrakt MNFv'FvDED transduzierter und selektierter HUT78 Zellen; 4 Zellextrakt nicht-transfizierter PG13-Zellen; 5 bis 6- Zellextrakt MNFv'FvDED transfizierter PG13-Zellen; 7- Zellextrakt nicht-transduzierter primärer T-Zellen; 8 bis 9- Zellextrakt MNFv'FvDED transduzierter und selektierter primärer T-Zellen. Der Western Blot wurde mit dem anti LNGFR mAk (BD-Pharmingen, 1:500) durchgeführt.

Nicht-transduzierte Kontrollzellen wurden eingesetzt, um unspezifische Reaktionen des Antikörpers im zu erwartenden Größen-Bereich des Fusionsproteins zu detektieren (Abb. 45/1; /4 und /7). In allen Lysaten transduzierter oder transfizierter Zellen wurde eine spezifische Bande der Größe von ca. 70 kD detektiert (Abb. 45/2-3; /5-6; /8-9). Die Größe der spezifischen Bande unterschied sich kaum von der rein rechnerisch ermittelten Größe des Fusionsproteins.

3.3.2 Untersuchungen der spezifischen Induktion des Zelltods in MtCD34tk39mw und MNFv'FvDED transduzierten und selektionierten primären T-Zellen

Für Funktionalitätsanalysen wurden entweder direkt die transduzierten Zellen eingesetzt und über eine PI-Doppelfärbung durchflusszytometrisch analysiert (2.6.7.3), oder aber selektierte Populationen, die analog den T-Zelllinien über MTS-Tests oder Annexin-V FITC Färbung untersucht wurden. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz (AP20187, oder GCV) für vier Tage inkubiert. Jeden Tag erfolgte ein Medienwechsel und die erneute Gabe des Suizid-Induktors. Am fünften Tag wurden die Populationen hinsichtlich der Veränderung der Zellzahl analysiert (Abb. 46). In Vergleichstestungen wurde überprüft, dass alle drei Analyseverfahren eine ähnliche Spezifität hatten und somit vergleichbare Ergebnisse lieferten.

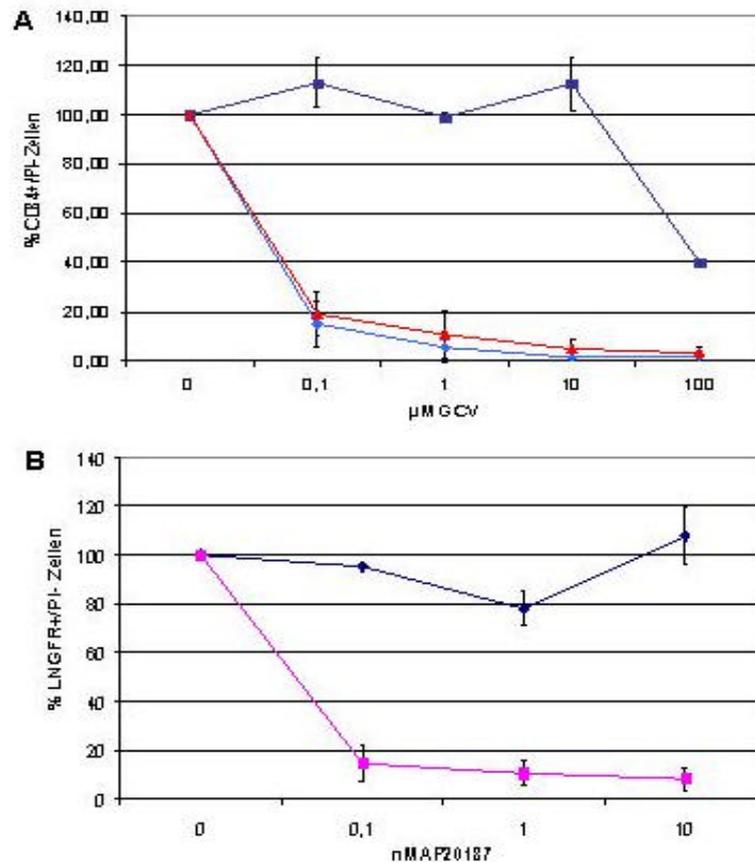


Abb. 46: Analyse der spezifisch induzierten Apoptose in transduzierten und selektierten primären T-Zellen. (-) Mock-transduzierte Kontrollzellen, (-) MtCD34tk39w transduzierte und selektierte primäre T-Zellen, (-) MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte primäre T-Zellen; (-) MNFv'FvDED transduzierte und selektierte primäre T-Zellen. **(A)** GCV induzierte Apoptose HSV-tk39 exprimierender Zellen. **(B)** AP20187 induzierte Apoptose DED-exprimierender Zellen. Die Werte sind aus 5 unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemittelt. **Berechnung:**

$$\text{CD34+PI- Zellen} + \text{GCV Behandlung} / \text{CD34+PI- Zellen} - \text{GCV Behandlung} \times 100$$

Vergleichbar den T-Zelllinien zeigten die humanen primären T-Zellen signifikante Reaktionen gegenüber den Apoptose induzierenden Substanzen.

3.3.2.1 Apoptose Induktion durch GCV

Die primären T-Zellen wurden mit zwei verschiedenen HSV-tk39 basierenden Vektoren im Vergleich transduziert und gegebenenfalls selektiert: *MtCD34tk39w* und *MtCD34tk39mw*. Beide Vektoren wurden verwendet, um die Verbesserung der Suizid-Funktionalität, die im Rahmen der Vektor-Optimierung in HUT 78-Zellen nachgewiesen wurde, auch hier zu bestätigen (Abb. 46A). Bereits in geringen Konzentrationsbereichen (0,1 μM bis 1 μM) wurden in den transduzierten Populationen HSV-tk39 spezifische Reduktionen der Zellzahl bis zu 95 % erreicht. Durch Verwendung einer Konzentration von 10 μM konnte die Zellzahl bis auf

ca. 3 % im Schnitt reduziert werden. Die Verwendung von GCV-Konzentrationen im Bereich von 1 μ M-10 μ M resultierte in einer 95 %-99 % HSV-tk39 spezifischen Eliminierung, die deutlich höher war, als in T-Zelllinien, was darauf hindeutet, dass ein Zelllinien-basierendes System Richtungs-weisend ist, aber eine aussagekräftige Analyse nur in den eigentlichen Zielzellen durchzuführen ist.

3.3.2.2 Apoptose-Induktion durch AP20187

Bereits der Einsatz von 0,1 nM AP20187 führte zu einer DED-spezifischen Eliminierung der Zellen bis zu 90 % (Abb. 46B), die durch den Einsatz höherer Konzentrationen (1 nM und 10 nM) nicht deutlich verstärkt werden konnte (max. 95 % bei 10 nM). Mit dem Einsatz dieses Zellzyklus-unabhängigen Systems wurden dem GCV-System vergleichbare Resultate erzielt. In diesem Fall verblieben zwischen 5 % und 10 % „resistenter“ Zellen. Die „Resistenzbildung“ einiger Zellen in diesem Kontext war nicht auf den Proliferationsstatus zurückzuführen, da es sich bei dem DED-System um ein Zellzyklus-unabhängiges System handelte (4.1.2).

Anhand von humanen primären T-Zellen wurde gezeigt, dass weder der Selektionsmarker, noch das Suizidgen durch die Fusion miteinander in der Expression oder Funktionalität verändert oder sogar inaktiviert wurden. Sowohl eine effiziente Selektion, als auch eine verbesserte, spezifische Eliminierung der transduzierten Zellen wurden in den primären humanen T-Zellen nachgewiesen. Beide retroviralen Fusionsvektoren zeigten potentielle Möglichkeiten auf, um T-Zellen dergestalt zu modifizieren, dass sie im Kontext einer GVHD-Entwicklung in Folge einer DLI-Behandlung, spezifisch eliminiert werden könnten.

3.4 Vergleichende funktionelle Analyse der beiden Suizidelemente: HSV-tk39/GCV und DED/AP20187

Da die beiden retroviralen Fusionsvektoren zwei unterschiedlich wirkende Suizidelemente enthielten wurde in einer vergleichenden funktionellen Analyse die Effizienz und Zeitabhängigkeit der spezifischen Induktion des Zelltods des jeweiligen Suizidelements sowohl in T-Zelllinien, als auch in primären T-Zellen untersucht. Voraussetzung für einen solchen direkten Vergleich in transduzierten Zellen war die gleich Anzahl an proviralen Kopien im Zielzellgenom, so dass ein stärkerer Suizideffekt nicht auf eine höhere Expression, die aus einer höheren Anzahl integrierter proviraler Kopien resultieren könnte, zurückzuführen war.

3.4.1 Bestimmung der Anzahl der integrierten proviralen Kopien in transduzierten und selektionierten primären T-Zellen

Um die proviralen Integrationen zu quantifizieren wurde im Rahmen einer semiquantitativen PCR (2.3.4) eine Standard-Verdünnungsreihe des jeweiligen Plasmids auf Basis genomischer wt-DNA hergestellt. Die Verdünnungsreihe umfasste 9 Kopien/Zelle bis 0,03 Kopie/Zelle (Faktor 3).

Ausgehend von den Plasmidkonzentrationen (MtCD34tk39mw 3,62 µg/µl und MNFv´FvDED 2,2 µg/µl) und den entsprechenden Größen (MtCD34tk39mw 7.185 bp und MNFv´FvDED 6.887 bp) wurden die einzelnen Verdünnungsschritte berechnet.

3.4.1.1 Der MtCD34tk39mw Vektor

Die Berechnung der MtCD34tk39mw Standard-Verdünnungsreihe ist im Folgenden aufgeführt:

1 µg des MtCD34tk39mw Plasmids der Größe 7.185 bp entsprachen 0,21 pmol, was wiederum $1,25 \times 10^{11}$ Kopien entsprach (2.3.4). Als genomischer Hintergrund wurde 1 µg DNA aus nicht-transduzierten primären T-Zellen eingesetzt, was 150.000 Zellen entsprach. 1 Kopie/Zelle bedeutete im Falle von 1 µg genomischer DNA 150.000 Plasmid-Kopien. 150.000 Kopien waren in 1,2 pg des Plasmids enthalten. Daraus ergab sich folgende Berechnung:

9 Kopien/Zelle – 10,8 pg
3 Kopien/ Zelle – 3,6 pg
1 Kopie/Zelle – 1,2 pg
0,3 Kopien/Zelle – 0,4 pg
0,1 Kopien/ Zelle – 0,13 pg
0,03 Kopien/Zelle – 0,043 pg

Die Verdünnungen wurden in einer PCR (2.3.4) als Standard für eine semiquantitative Analyse eingesetzt und in Bezug auf Zyklenzahl und Temperatureinstellungen der Reaktion optimiert.

Von der MtCD34tk39mw selektierten primären T-Zellpopulation wurde genomische DNA präpariert (2.2.1.4). 1 µg genomische DNA wurde pro Reaktion eingesetzt. Die Primer wurden so konstruiert, dass ein ca. 160 bp großes Fragment amplifiziert wurde, das die Fusionsstelle zwischen der tCD34- und der HSV-tk39 Sequenz umfasste (Tab. 20).

	Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Nukleotidlänge
15	Cd34tkicycfor2	CAC AGG AGA AAG GCT GGA GCT G	22mer
16	Cd34tkicycrev2	GTG GCT TCT TGC TGC CGG CGA G	22mer

Tab. 20: Primer der semiquantitativen MtCD34tk39mw PCR.

Die PCR-Ansätze wurden auf einem 1,5 %igem Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des BioRAD Quantifizierungsprogramms (Quantity One) anhand der Standardverdünnungsreihe semiquantitativ analysiert (Abb. 47).

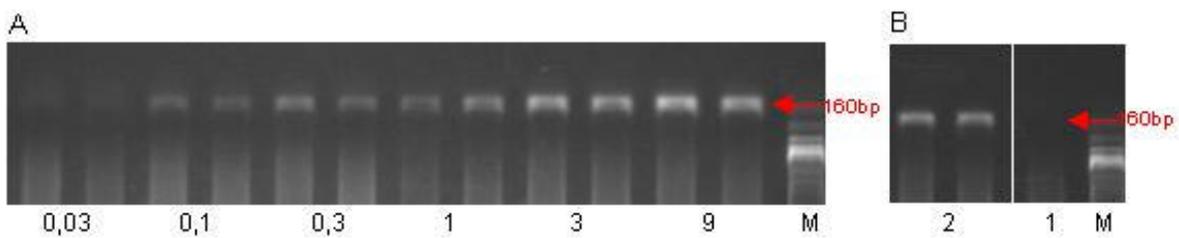


Abb. 47: PCR Analyse der proviralen Kopienzahl des MtCD34tk39mw Vektors in primären T-Zellen. M-Smartladder; (A) 9 - 0,03 Verdünnungsreihe Kopien/Zelle. (B) 1- genomische DNA nicht-transduzierter primärer T-Zellen; 2- genomische DNA MtCD34tk39mw transduzierter und selektierter primärer T-Zellen.

Die densitometrische Quantifizierung der Banden der Verdünnungsreihe (9-0,03K/Z) wurde als Standardkurve verwendet, anhand dieser die DNA-Proben der primären T-Zellen analysiert wurden. (Zur Überprüfung der eingesetzten DNA-Mengen wurde eine β -Actin PCR mitgeführt.) Die Proben wurden in Doppelbestimmung angesetzt, so dass sich die einzelnen Punkte der Standardkurve und der genomischen DNA als Mittelwerte aus zwei Bestimmungen errechneten (Tab. 21).

Intensität	Provirale Integration /Zelle
112,6	9
106,6	3
83,6	1
81,7	0,3
73,3	0,1
60,7	0,03

Tabelle 21: Quantifizierung der Standardkurve. Densitometrische Bestimmung der Banden.

Für das PCR-Produkt auf Basis der genomischen DNA der MtCD34tk39mw transduzierten T-Zellen wurde eine Intensität von 100,9 errechnet. Anhand der Standardkurve konnte die Intensität in die Angabe Kopien/Zelle umgerechnet werden (Abb. 48).

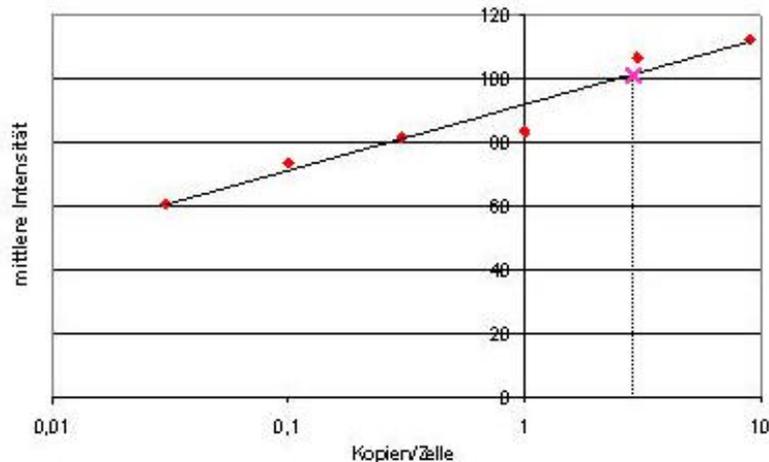


Abb. 48: Berechnung der proviralen Integrationen. X = Intensitätsmittelwert des PCR-Produktes der genomischen DNA MtCD34tk39mw selektionierter primärer T-Zellen.

Es ergaben sich ca. 3 provirale Integrationen des MtCD34tk39mw Vektors in das Genom der primären T-Zellen. Die Zellen wurden im Rahmen der drei Transduktionsrunden mit einer finalen MOI von ca. 3-4,5 transduziert.

3.4.1.2 Der MNFv´FvDED Vektor

Die Berechnung der Verdünnungsreihe auf Basis des MNFv´FvDED Plasmids erfolgte nach dem gleichen Prinzip (3.4.1.1):

1 µg des Plasmids der Größe 6.887 bp entsprach 0,2 pmol und $1,19 \times 10^{11}$ Kopien, 150.000 Kopien waren in 1,3 pg enthalten, so dass sich für die Verdünnungsreihe folgende Berechnung ergab:

- 9 Kopien/Zelle – 11,7 pg**
- 3 Kopien/ Zelle – 3,9 pg**
- 1 Kopie/Zelle – 1,3 pg**
- 0,3 Kopien/Zelle – 0,43 pg**
- 0,1 Kopien/ Zelle – 0,14 pg**
- 0,03 Kopien/Zelle – 0,048 pg**

1 µg der genomischen DNA MNFv´FvDED selektierter primärer T-Zellen wurde hinsichtlich der Anzahl der proviralen Kopien in einer PCR analysiert. Die Primer wurden so konstruiert, dass

ein ca. 300 bp großes Fragment, das die Fusionsstelle zwischen dem Δ LNFR- und dem Fv'-Element umfasste (Tab. 22).

	Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Nukleotidlänge
17	NGFicycfor1	CTT GTG GCC TAC ATA GCC TTC AAG	24mer
18	NGFicycrev2	CTC CTC TAG TCT CGA TCA ACA G	22mer

Tab. 22: Primer der semiquantitativen MNFv'FvDED-PCR.

Die PCR Ansätze wurden über ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetrennt (Abb. 49) und mit der Quantity One Software densitometrisch analysiert

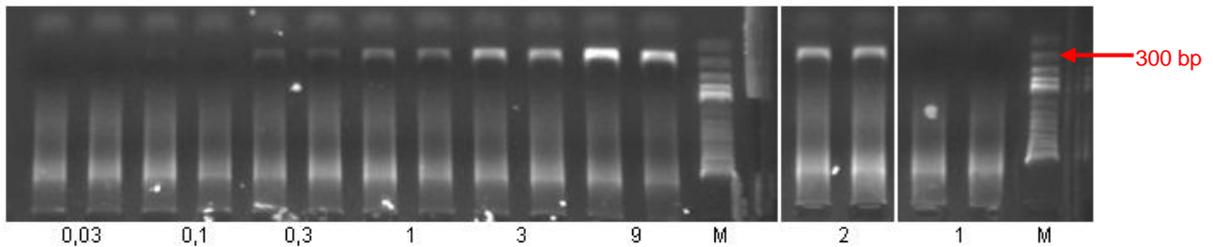


Abb. 49: PCR Analyse der proviralen Kopienanzahl des MNFv'FvDED Vektors in primären T-Zellen. M- Smartladder; 1- genomische DNA nicht transduzierter primärer T-Zellen; 2- genomische DNA MNFv'FvDED transduzierter und selektierter primärer T-Zellen; 9 – 0,03 Verdünnungsreihe Kopien/Zelle.

Über die densitometrische Analyse der PCR-Produkte der Verdünnungsreihe (Tab. 23) wurde die Standardkurve ermittelt.

Intesität	Provirale Integration /Zelle
179	9
133	3
88	1
70	0,3
62	0,1
60	0,03

Tabelle 23: Quantifizierung der Standardkurve. Densitometrische Bestimmung

Mit Hilfe der Standardkurve konnte die Anzahl der proviralen Integrationen in den MNFv'FvDED selektionierten Zellen berechnet werden (Abb. 50).

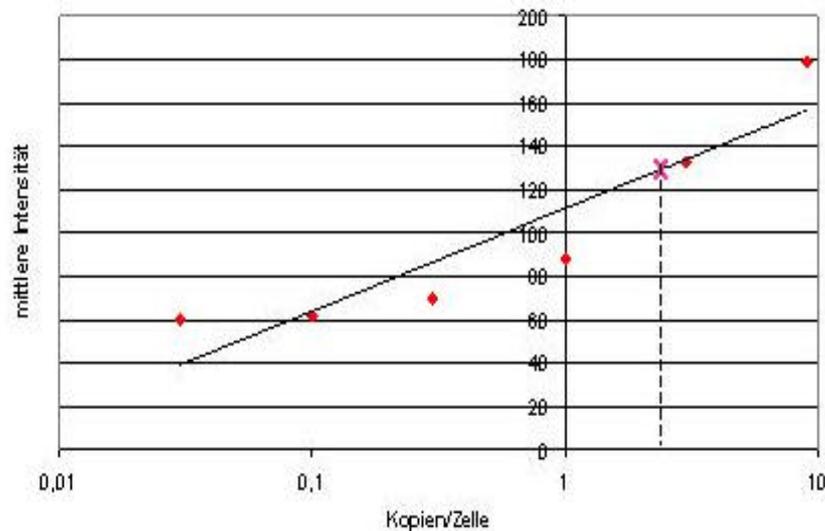


Abb. 50: Berechnung der proviralen Integration. X = Intensitätsmittelwert des PCR-Produkts von MNFv'FvDED selektionierten Zellen.

Für beide retroviralen Vektoren ergaben sich ca. 3 provirale Kopien/Zelle (Transduktionsrunden mit einer finale MOI von 3 - 4,5), so dass ein direkter Vergleich beider Fusionsvektoren im Hinblick auf Expression des Transgens und die Effizienz der spezifischen Induktion der Apoptose möglich war.

3.4.2 Die vergleichenden funktionelle Analyse

In einer Vorabtestung wurden selektionierte HUT 78-Populationen hinsichtlich der zeitabhängigen Eliminierung der Zellen durch Aktivierung des jeweiligen Suizidelements untersucht. Zum Zeitpunkt T0 wurden 1×10^5 HUT 78-Zellen pro ml Medium ausgesät und mit der jeweiligen optimalen Konzentration an Substrat (10 μ M GCV, bzw. 10 nM AP20187, HUT 78 Zellen) versetzt. Analog den vorangegangenen Tests wurde jeden Tag ein kompletter Medien- und Substratwechsel vorgenommen. Zu verschiedenen Zeitpunkten (T1-T6) wurden Proben entnommen und entweder kolorimetrisch (2.6.9.2) oder über Annexinfärbung (2.6.7.2) bezüglich des prozentualen Anteils an eliminierten Zellen analysiert (Abb. 51).

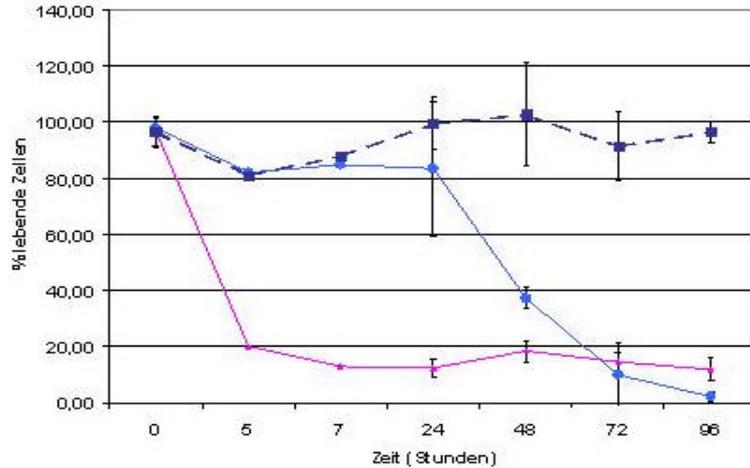


Abb. 51: Vergleichende Kinetik der Aktivitäten beider Suizidelemente. Transduzierte und selektionierte HUT 78-Zellen, zu ca. 98% Transgen-positiv, wurden in diesen Tests verwendet. Der Prozentsatz an eliminierten Zellen wurde mittels MTS-Test oder auch Annexin-Färbung ermittelt. Die Werte stellen Mittelwerte von mindestens 4 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung dar. (-) Kontrollpopulation; (-) MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte Population; (-) MNFv'FvDED transduzierte und selektierte Population.

Nachdem gezeigt wurde, dass der Zeitfaktor eine wesentliche Rolle in der Induktion des Zelltods durch die beiden unterschiedlichen Suizidelemente spielte, wurden im Anschluss daran transduzierte primäre T-Zellen ebenfalls hinsichtlich dieses Aspekts untersucht (Abb. 52). 5×10^5 Zellen wurden in 1 ml Medium mit der jeweils optimalen Konzentration des entsprechenden Suizidaktivators (1 μM GCV, bzw. 1 nM AP20187.) ausgesät und für 4 Tage inkubiert, wobei jeden Tag ein kompletter Medien- und Substratwechsel vorgenommen wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten (T0-T6) wurden die Ansätze hinsichtlich der Lebendzellzahl über Annexinfärbung oder PI-Doppelfärbung analysiert (Abb. 52).

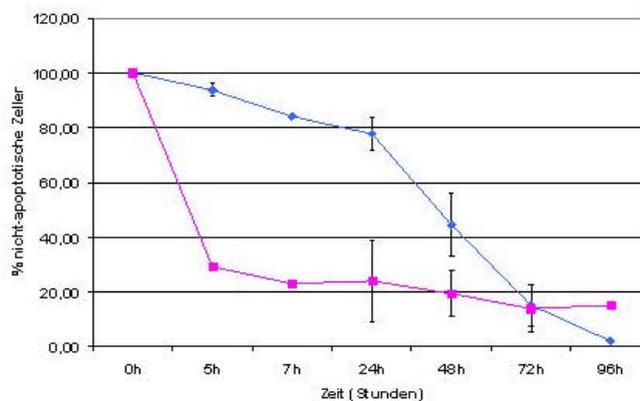


Abb. 52: Zeitabhängige Induktion des Zelltods in transduzierten primären T-Zellen. MtCD34tk39mw (-) transduzierte und selektionierte primäre T-Zellen; MNFv'FvDED (-) transduzierte und selektionierte primäre T-Zellen in einer vergleichenden Kinetik hinsichtlich der spezifischen Induktion des Zelltods durch GCV (1 μM) oder AP20187 (1 nM). Die Werte wurden aus mindestens 3 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung gemittelt.

In beiden Testsystemen (T-Zelllinie; primäre T-Zellen) wurde eine deutliche Zeitabhängigkeit der Suizidmechanismen nachgewiesen. Während die Aktivierung des DED-Elements innerhalb der ersten 5 Stunden in einer deutlichen Abnahme der Zellzahl auf 25 % der Population resultierte, zeigte sich bei Aktivierung des HSV-tk39 Elements erst nach 48 Stunden eine Reduktion der Zellzahl von bis zu 55 %. Durch die länger andauernde Behandlung der HSV-tk39 exprimierenden Zellen mit GCV wurde die Effizienz der spezifischen Eliminierung auf bis zu 99 % erhöht, während die längere Inkubation der DED exprimierenden Zellen mit AP20187 nur noch in einer leichten Verbesserung der Eliminierungseffizienz auf bis zu 85 % resultierte. Eine schnelle Eliminierung (innerhalb 5 Stunden) der Zellen schien durch den DED/AP20187 Mechanismus eher gewährleistet zu sein als durch den HSV-tk39/GCV Mechanismus. Im Vergleich dazu führte die Aktivierung des HSV-tk39 Elements jedoch zu einer deutlich höheren Eliminierungseffizienz (99 % vs. 85 %) als die Induktion des DED-Suizidelements.

3.5 Möglichkeit zur Optimierung der Suizid-Aktivität

Die ursprüngliche Idee dieses Ansatzes war die Entwicklung eines retroviralen Suizidvektors, der die spezifisch induzierte Eliminierung sowohl von proliferierenden als auch von ruhenden Zellen vermitteln sollte. Die Kombination der beiden Selektions/Suizid-Fusionsproteine (in einem Vektor) könnte einen additiven Effekt in Bezug auf die Induktion der Apoptose haben. Im Folgenden wurden erste Analysen einer Kombination beider Vektoren in HUT 78-Zellen durchgeführt. Eine MtCD34tk39mw transduzierte und selektionierte HUT 78-Population wurde in einem zweiten Transduktionsprozess mit dem MNFv FvDED retroviralen Vektor transduziert und über die Expression des Δ LNGFR-Oberflächenmarkers immunomagnetisch selektiert, so dass eine tCD34/ Δ LNGFR doppelt-positive Population angereichert wurde (Abb. 53).

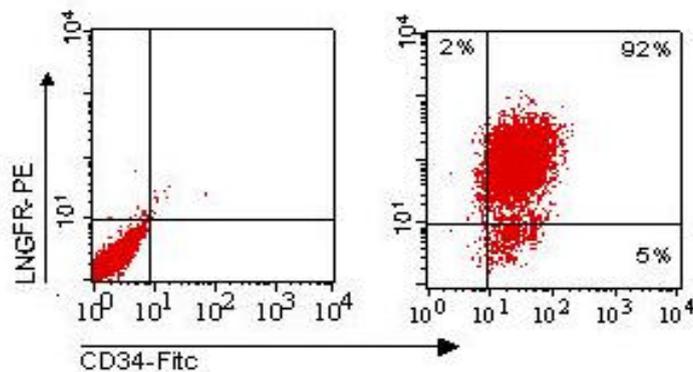


Abb. 53: FACS Analyse der doppelt-transduzierten und selektierten HUT 78 Zellen. 92% der Population exprimierten beide Transgene.

92 % der Population exprimierten beide Oberflächenmarker und sollten demzufolge auch beide Suizidelemente exprimieren. Im Vergleich zu den einzel-positiven HUT 78 Populationen (MtCD34tk39mw und MNFv´FvDED) wurde die doppelt-positive Population in GCV/AP20187 Sensitivitätstestungen hinsichtlich der Effizienz der Induktion des spezifischen Zelltods analysiert. Anhand mikroskopischer Analysen wurden die einzelnen Populationen in Bezug auf die Veränderung der Zell-Morphologie durch die Behandlung mit den verschiedenen Substraten untersucht. Die Substrate wurden in den optimalen Konzentrationen 10 µM GCV, bzw. 10 nM AP20187 eingesetzt (Abb. 54).

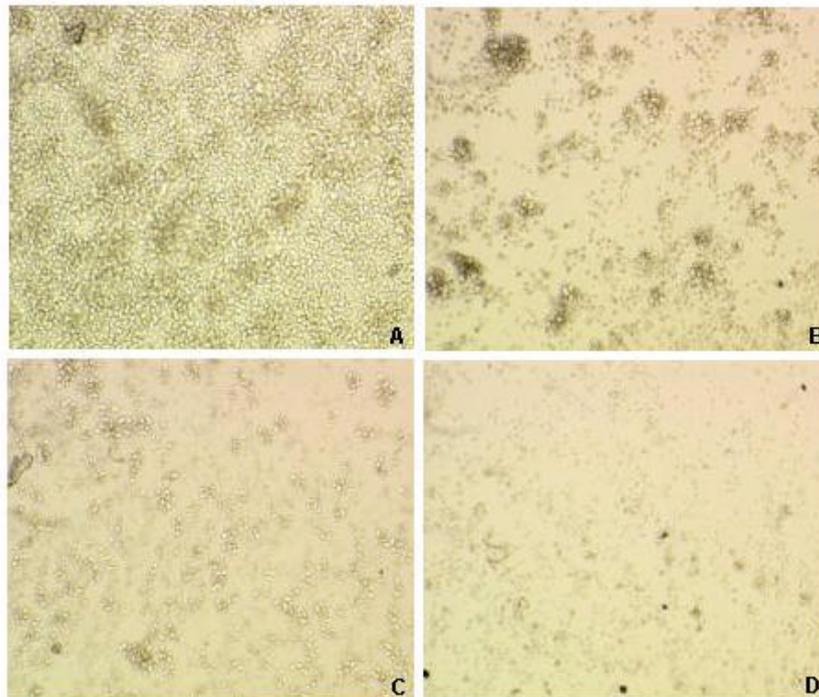


Abb. 54: Mikroskopische Analysen der verschiedenen HUT 78-Populationen. (A) nicht-transduzierte Kontrollpopulation, GCV/AP20187 behandelt; (B) MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte Zellen, GCV behandelt; (C) MNFv´FvDED transduzierte und selektierte Zellen AP20187 behandelt; (D) MtCD34tk39mw/MNFv´FvDED transduzierte und selektierte Zellen GCV/AP20187 behandelt.

Die GCV/AP20187-behandelten nicht-transduzierten Kontrollzellen zeigten keine mikroskopisch sichtbare Veränderung der Proliferation oder der Zell-Morphologie, während die GCV-behandelten HSV-tk39 exprimierenden Zellen deutlich weniger stark proliferierten und die Zellmorphologie auf apoptotische Zellen (stark-granulär, wenig symmetrisch) hindeutete. Die Behandlung der DED-exprimierenden Zellen mit AP20187 resultierte ebenfalls in einer kaum wahrnehmbaren Proliferation der Zellen (keine Cluster-Bildung) und einer Veränderung der Zellmorphologie. Intakte Zellen waren kaum noch zu erkennen. Die doppelt-positive Population schien mikroskopisch am effizientesten in der Proliferation und dem Überleben der Zellen durch die Behandlung mit beiden Substraten gehemmt zu werden. Um eine objektive

und unabhängige Beurteilung der eliminierenden Effekte treffen zu können, wurden anschließend noch MTS-Analysen oder Annexin-Färbungen durchgeführt (Abb. 55).

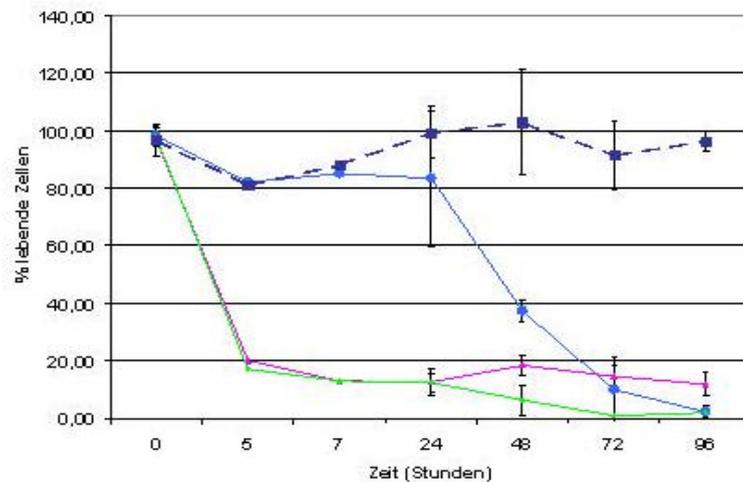


Abb. 55: Annexin-Färbung GCV/AP20187 behandelter Zellen. (-) nicht-transduzierte HUT 78 Kontrollzellen; (-) MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte HUT 78-Zellen; (-) MNFV'FVDED transduzierte und selektierte HUT78-Zellen; (-) MtCD34tk39mw/MNFV'FVDED transduzierte und selektierte HUT 78-Zellen. Die Werte wurden aus 2 unabhängigen Testungen in Doppelbestimmung gemittelt.

Die mikroskopischen Analysen wurden durch die Annexin- und MTS-Analysen bestätigt. Die Kombination beider Suizidelemente schien tatsächlich in einem additiven Effekt bezüglich der Effizienz der Induktion des Zelltods zu resultieren. Bereits nach 5 Stunden waren 80 % der Zellen durch die Aktivierung des DED-Elements eliminiert und nach 72 Stunden waren 99 % der Zellen eliminiert. Die höhere Effizienz in der Induktion des Zelltods in doppelt-positiven Populationen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Großteil der Population (92 %) beide Suizidelemente exprimiert, so dass Zellen, die für eines der beiden Suizidelemente eine „Resistenz“ entwickelten möglicherweise durch die Aktivierung des zweiten Suizidelements eliminiert werden konnten.

Anhand dieser ersten Daten in einem T-Zelllinien-System schien eine Kombination beider Fusionselemente eine optimierte Möglichkeit zu bieten, um eine nahezu 100 %ige Eliminierung der Zellen im Falle einer GVHD zu erzielen. Weitere Testungen in primären T-Zellen sind erforderlich.

3.6 Einfluss verschiedener Virostatika auf HSV-tk39-transduzierte und nicht-transduzierte T-Zellen

In den folgenden Analysen wurden neben GCV noch zwei weitere Virostatika (ACV und Cido, Abb. 56, 4.1.1.5) hinsichtlich ihrer eliminierenden Effekte auf HSV-tk39 exprimierende T-Zellen und nicht-transduzierte T-Zellen untersucht.

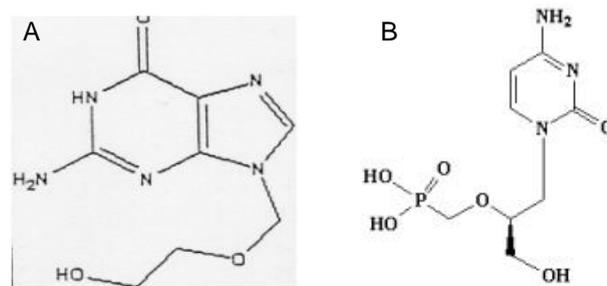


Abb. 56: Chemische Darstellung der Virostatika. A) Acyclovir (ACV); B) Cidofovir (Cido).

Beide Virostatika wirken ähnlich dem GCV als Nukleosid-Analoga und werden präferentiell durch die HSV-tk phosphoryliert. Cido unterscheidet sich etwas von ACV und GCV, da es bereits in der monophosphorylierten Form vorliegt und somit der Initialschritt durch die HSV-tk nicht notwendig ist.

In den folgenden Analysen wurden sowohl HSV-tk39 exprimierende HUT 78-Zellen, als auch transduzierte primäre T-Zellen hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Konzentrationen der Virostatika getestet. Von jeder „*prodrug*“ wurde eine Verdünnungsreihe (1 mM; 100 μ M; 10 μ M; 1 μ M und 0,1 μ M) hergestellt. 5×10^5 Zellen wurden in 1 ml Medium mit den entsprechenden Konzentrationen des jeweiligen Virostatikums ausgesät, jeden Tag einem kompletten Medienwechsel unterzogen und nach 4-tägiger Inkubation über MTS-Tests oder Annexinfärbung hinsichtlich der Veränderung in der Zellzahl analysiert (Abb. 57).

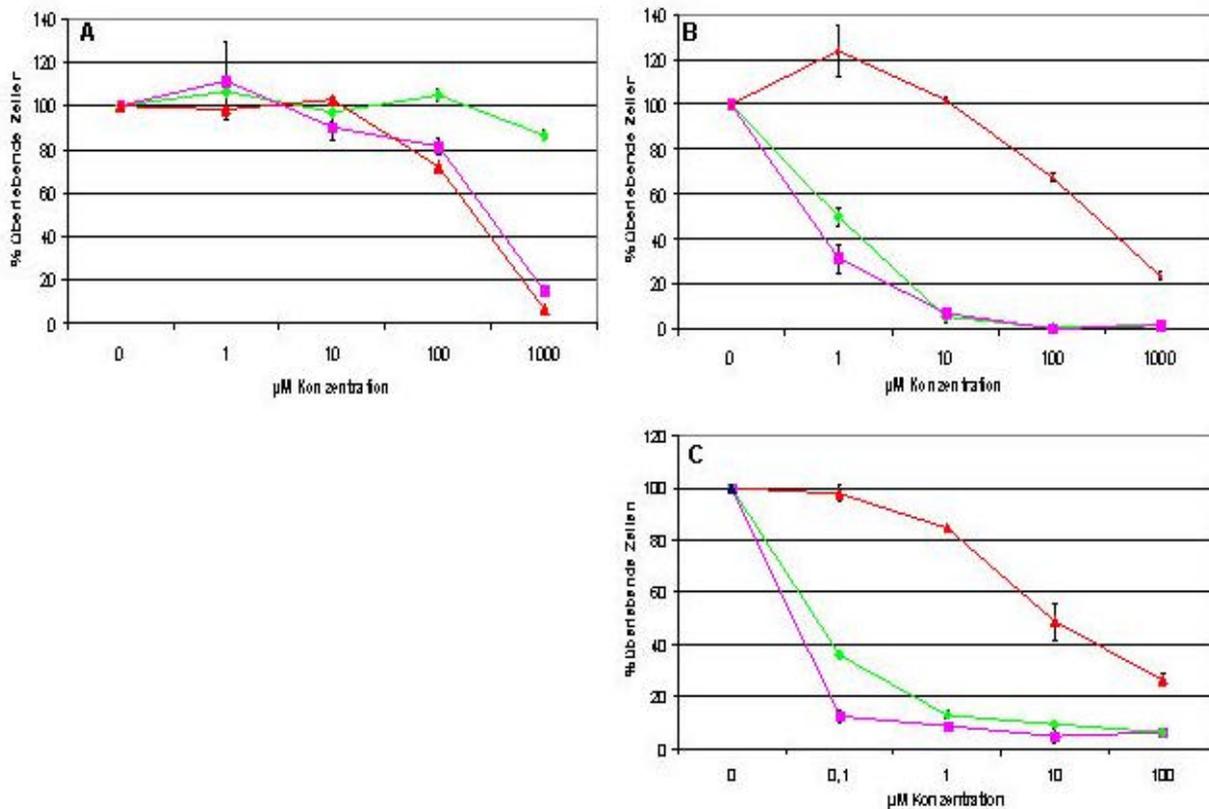


Abb. 57: Vergleichende Analyse der HSV-tk39 spezifischen Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Virostatika (–) GCV behandelte HSV-tk39 exprimierende Zellen; (–) ACV behandelte HSV-tk39 exprimierende Zellen; (–) Cidofovir behandelte HSV-tk39 exprimierende Zellen. Die Werte stellen Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung dar. **(A)** Effekt der verschiedenen Virostatika-Konzentrationen auf nicht-HSV-tk39 exprimierende HUT 78 Kontrollzellen (MTS-Test). **(B)** Effekt der verschiedenen Virostatika Konzentrationen auf HSV-tk39 exprimierende HUT 78 Zellen (MTS-Test). **(C)** Effekt der verschiedenen Virostatika-Konzentrationen auf HSV-tk39 exprimierende primäre T-Zellen (PI-Doppelfärbung).

Die Behandlung der nicht-transduzierten HUT 78-Zellen (Abb. 57A) mit den verschiedenen Virostatika resultierte im Konzentrationsbereich zwischen 1 µM und 100 µM in keiner signifikanten Reduktion der Zellzahl, während die Behandlung der Zellen mit 1 mM in einer konzentrationsabhängigen, Virostatikum-unspezifischen Abnahme der Zellzahl resultierte, mit Ausnahme des ACV.

Analysen auf Basis von HSV-tk39 exprimierenden HUT 78-Zellen (Abb. 57B) zeigten deutliche Effekte sehr niedriger Konzentrationen von ACV und GCV (im Bereich um 1 µM) auf die Zellzahl, die um ca. 50-70 % reduziert wurde. Die Behandlung einer viralen Infektion mit ACV würde, wie auch die Behandlung mit GCV in einer frühzeitigen, ungewollten Eliminierung der transduzierten Spender T-Zellen resultieren. Cidofovir hingegen schien keinen HSV-tk39 spezifischen Effekt zu zeigen, so dass, vergleichbar den nicht-transduzierten Kontrollzellen, die Zellzahl erst bei Verwendung sehr hoher Konzentrationen von 100 µM und 1 mM reduziert wurde (bis zu 75 %). Analysen in primären T-Zellen (Abb. 57C) zeigten bereits bei einer Konzentration von 10 µM Cidofovir eine Reduktion der Lebendzellzahl um ca. 50 %.

Bei Behandlung viraler Infektionen in adulten Patienten werden Cido-Serumspiegel zwischen 7,3 µg/ml und 11,5 µg/ml (je nach Applikationsmenge), was Konzentrationen von 26 µM und 41 µM entsprechen würde, erzielt. In pädiatrischen Patienten liegen bisher keine Daten über Cidofovir Serumlevel vor (Auskunft der Firma Pharmacia). Anhand der *in vitro* Analysen auf Basis HSV-tk39 exprimierender primärer T-Zellen würde somit die Behandlung einer viralen Infektion mit 11,5 µg/ml (41 µM) in einer Reduktion der Zellzahl von maximal 60 % resultieren, so dass die verbliebenen T-Zellen weiterhin proliferieren und einen GVL-Effekt ausüben könnten.

3.7 Testung der Alloreaktivität der transduzierten und selektionierten primären T-Zellen gegenüber leukämischen Blasten

Der Erfolg einer adaptiven Immuntherapie basiert vor allem auf dem „alloreaktiven Erkennen“ verbliebener leukämischer Blasten durch die transplantierten Spender T-Lymphozyten (GVL). In der Kinderklinik Frankfurt (S. Zimmermann) wurde ein 4-Farben FACS-basierender Zytotoxizitäts-Test (2.6.7.4) entwickelt, der eine Analyse der Alloreaktivität von T-Zellen oder NK-Zellen gegenüber leukämischen Blasten ermöglicht. Anhand der Markierung von Oberflächenmarkern der Effektor-Zellen (T-Zellen und NK-Zellen) und der Zielzellen (leukämische Blasten, zumeist CD10; CD19; CD33; CD34) durch geeignete Antikörper und einer parallelen Färbung mit PI, zur Trennung von toten und lebenden Zellen, konnte die zytotoxische Aktivität der T-Zellen nach Inkubation mit den Blasten, bestimmt werden (Abb. 58).

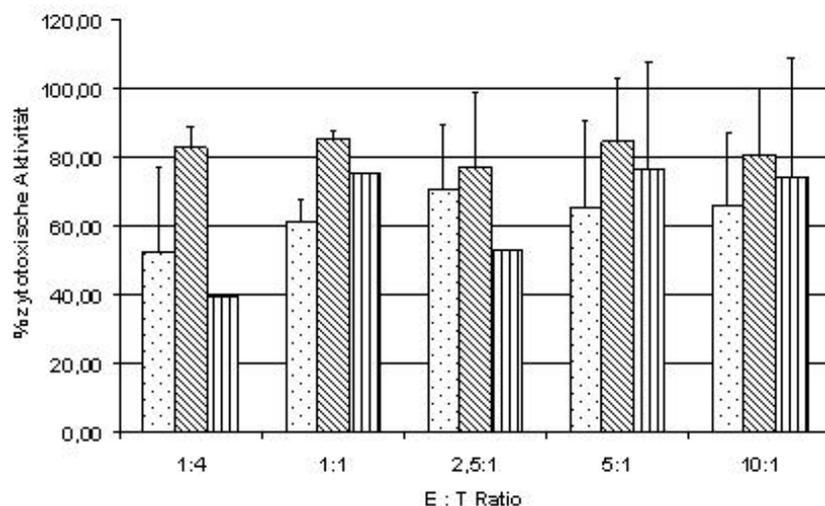


Abb. 58: Analyse der Alloreaktivität transduzierter und selektierter primärer T-Zellen gegenüber leukämischen Blasten. □ nicht transduzierte Kontrollzellen; ▨ MtCD34tk39mw transduzierte und selektierte Zellen; ▤ MNFVv'FvDED transduzierte und selektierte Zellen. Die zytotoxische Aktivität wurde in Prozent angegeben. Die Werte wurden aus 3 unabhängigen Tests gemittelt.

Die nicht-transduzierten Zellen wurden ebenso lange *ex vivo* kultiviert (maximal 13 Tage), wie die Zellen, die der Transduktions- und Selektionsprozedur unterlagen. Frisch aufgetaute Zellen, wurden nicht *ex vivo* aktiviert sondern direkt in den Test eingesetzt. Diese Zellen starben direkt ab.

Die Abnahme der PI-negativen, Zielzellepitop-positiven leukämischen Blasten diente als Maß der alloreaktiven Aktivität und wurde als Prozent der initial lebenden Zielzellen minus der spontan toten Zellen der Kontrollen dargestellt. Sowohl die Kontrollzellen, als auch die transduzierten und selektierten Zellen zeigten bei allen E : T Verhältnissen eine ähnliche zytotoxische Aktivität. Mit Ausnahme des ersten Mischungsverhältnis von 1:4 zeigten die Effektorzellen innerhalb der jeweiligen Population (nicht-transduzierte, HSV-tk39 transduzierte und DED transduzierte Zellen) in allen Verhältnissen eine vergleichbare zytotoxische Aktivität gegenüber den leukämischen Blasten. Die Verwendung von mehr Effektorzellen pro einer Zielzelle resultierte in keiner Verbesserung der zytotoxischen Aktivität, die sich sowieso auf einem hohen Level befindet. Eine negative Beeinflussung der Alloreaktivität der T-Zellen gegenüber leukämischen Blasten durch den Prozess der Transduktion und Selektion im Vergleich zu nicht-transduzierten T-Zellen wurde nicht deutlich. Um den Effekt der *ex vivo* Kultivierung auf die Alloreaktivität der Zellen zu untersuchen müsste eine weitere Kontrolle von frisch isolierten, bzw. nur prästimulierten (3 Tage) Zellen im Vergleich getestet werden.

3.8 Optimierungen des MtCD34tk39mw Vektors im Hinblick auf eine klinische Anwendung

Für eine klinische Anwendung der retroviralen Vektoren unter Berücksichtigung einer GMP-gerechten Produktion des Virusüberstandes, der Transduktion und der Selektion der primären T-Zellen, wurden im Folgenden weitere Veränderungen an dem Vektor durchgeführt.

Das WPRE RNA-Element, das die effiziente Expression des Transgens unterstützen sollte, enthielt laut neueren Untersuchungen (M. v. Laer, GSH, Frankfurt) kurze kodierende offene Leserahmen (ORFs, *open reading frame*), die für Elemente viraler WHV-Proteine kodierten. Aus diesem Grund wurde die WPRE-Sequenz aus dem MtCD34tk39mw Vektor eliminiert. Folgende Expressions- und Funktionalitätsanalysen gaben darüber Aufschluss ob eine stabile, effiziente Expression des Transgens und damit verbunden eine kontinuierliche Suizidaktivität auch ohne das Vorhandensein des WPR-Elements gewährleistet war.

3.8.1 Eliminierung des WPR-Elements

Der MtCD34tk39mw Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *ClaI* verdaut. Durch diese Restriktion wurde die Sequenz des WPRE eliminiert. Die überhängenden Enden

des linearisierten Vektors wurden in einer Klenow-Reaktion (2.2.2.3) zu glatten Enden modifiziert. Durch eine T4-Ligase vermittelte Reaktion (2.2.2.5) wurde der linearisierte Vektor wieder in einen zirkulär vorliegenden Vektor umgewandelt (Abb. 59).

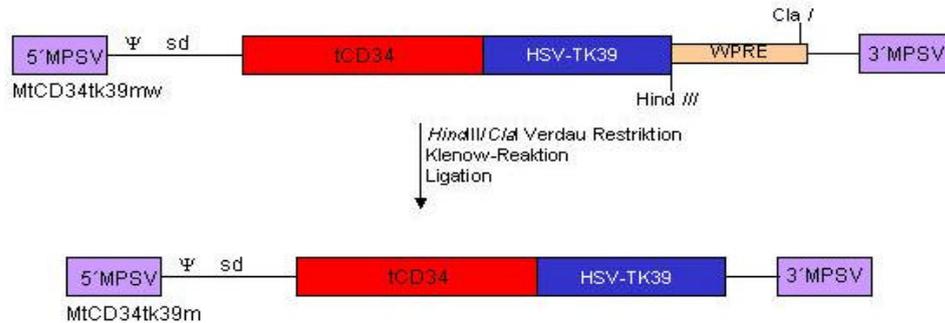


Abb. 59: Eliminierung der WPRE-Sequenz.

3.8.2 Analyse der Expression des Transgens nach MtCD34tk39m Transduktion

Analog den bereits beschriebenen Analysen wurden HUT 78-Zellen mit MtCD34tk39m Virusüberstand aus transient transfizierten Phoenix gp Verpackungszellen transduziert, immunomagnetisch selektiert und durchflusszytometrisch hinsichtlich der tCD34-Expression analysiert (Abb. 60A-E). Während 11-wöchiger *ex vivo* Kultivierung wurde die Expression des Transgens in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrisch im Vergleich zu MtCD34tk39mw selektierten HUT 78-Zellen analysiert, um eine Veränderung in der Langzeitexpression des Transgens, hervorgerufen durch die Eliminierung der WPRE Sequenz, nachzuweisen (Abb. 60F-G).

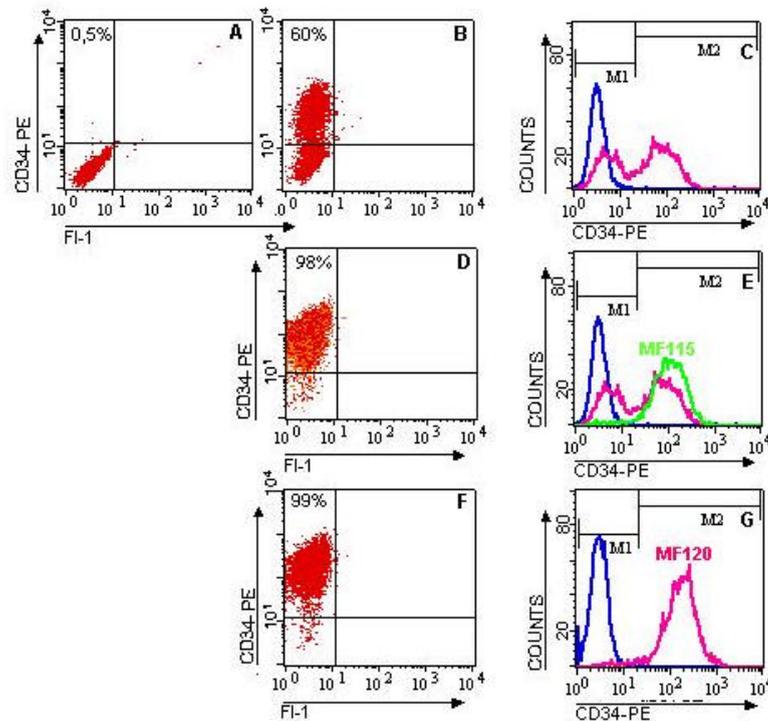


Abb. 60: FACS Analysen der MtCD34tk39m transduzierten und selektierten HUT 78 Zellen. (A) nicht-transduzierte Kontrollzellen; (B) transduzierte HUT 78 Zellen; (C) Histogrammanalyse der transduzierten HUT 78 Zellen: der pinkfarbene Peak repräsentiert die transduzierte Population; (D) transduzierte und selektierte HUT 78 Zellen; (E) Histogrammanalyse der transduzierten und selektierten HUT 78 Zellen: der pinkfarbene Peak repräsentiert die transduzierten Zellen, der grüne Peak repräsentiert die transduzierten und selektierten Zellen; (F) transduzierte und selektierte HUT 78 Population nach 11 wöchiger ex vivo Kultivierung; (G) Histogrammanalyse der Langzeit-Kultur: der pinkfarbene Peak repräsentiert die transduzierten und selektierten lang-Zeit kultivierten Zellen. MF = mittlere Fluoreszenz. Der blaue Peak repräsentiert die nicht-transduzierten Kontrollzellen.

Die Transduktion der HUT 78 Zellen mit dem MtCD34tk39m Vektor resultierte in ca. 60 % tCD34-positiver Zellen. Das Transgen wurde in gleichem Maße exprimiert, wie im Fall des MtCD34tk39mw Vektors, so dass eine immunomagnetische Selektion der Zellen über eine magnetische Säule ausreichte, um eine Population von 98 % tCD34-positiven Zellen anzureichern. Vergleicht man die Expression des Transgens von WPRE-positiven und -negativen Populationen in einer Langzeitstudie (11 Wochen) miteinander, so ist keine Reduktion der Expression durch die Eliminierung des WPR-Elements festzustellen.

3.8.3 Analysen der Aktivität des HSV-tk39 Proteins nach Eliminierung der WPRE-Sequenz

Nachdem in durchflusszytometrischen Analysen gezeigt werden konnte, dass die Eliminierung des WPR-Elements keinen negativen Einfluss auf die Stärke und Dauer der Expression des Transgens hatte, folgten weitere funktionelle Testungen der GCV-induzierten Apoptose.

Analog den bereits beschriebenen GCV-Testungen wurden MtCD34tk39m selektierte HUT 78 Zellen für 4 Tage mit verschiedenen GCV-Konzentrationen inkubiert und hinsichtlich der Zellzahl im Vergleich zu WPRE-positiven Zellen untersucht (Abb. 61).

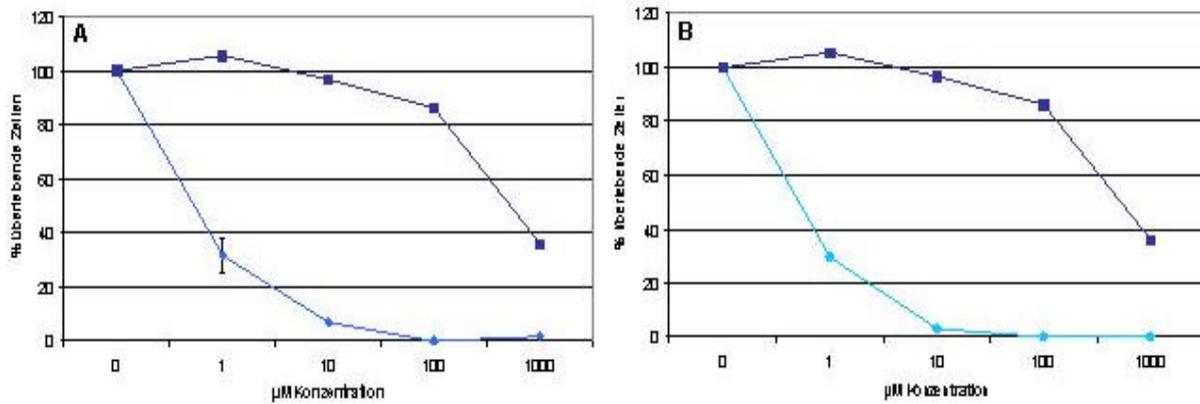


Abb. 61: GCV-Sensitivität WPRE-negativer Zellen. (A) MtCD34tk39mw (-)selektionierte Populationen (WPRE-positiv); (B) MtCD34tk39m (-) selektionierte Populationen (WPRE-negativ), (-) nicht-transduzierte Kontrollpopulation. Die Werte wurden aus 2 unabhängigen Tests in Doppelbestimmung gemittelt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 1,5-2 transduziert Die Analysen erfolgten über MTS-Tests.

WPRE-negative Zellen zeigten keine Reduktion hinsichtlich ihrer funktionalen HSV-tk39 Expression. Vergleichbar den WPRE-positiven Zellen wurden bereits bei der geringsten Konzentration von 1 µM GCV bis zu 70 % der Zellen eliminiert. Durch Behandlung der Populationen mit höheren GCV-Konzentrationen wurden nahezu alle Zellen eliminiert. Die Integration der WPRE-Sequenz bringt keinen Vorteil für die Expression des Transgens in den Zielzellen.

Es wurden zwei gleichwertige retrovirale Selektions/Suizid-Fusionsvektoren für die Transduktion von humanen primären T-Zellen entwickelt.

4. Diskussion

Akute Leukämien sind die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter. Trotz signifikanter Fortschritte in der Therapie existieren nach wie vor verschiedene Formen der lymphatischen oder myeloischen Leukämie, die eine sehr schlechte Prognose haben und für deren Behandlung die allogene Stammzelltransplantation nach konditionierender Chemo/Radiotherapie ein elementarer Therapiebestandteil ist. Die „heilende“ oder besser „Remissions-induzierende“ Wirkung dieser Form der Therapie wird zum einen auf die Konditionierung mittels hoch-aggressiver Chemotherapeutika und zum anderen auf immunologische Reaktionen zwischen den in dem allogenen Transplantat enthaltenen immunkompetenten T-Zellen, bzw. den aus diesen allogenen Stammzellen neu differenzierten Immunkompetenten T-Zellen und den verbliebenen leukämischen Blasten des Patienten zurückgeführt (Horowitz 1990, Feinstein 2001). Der immunologische Aspekt wird auch als Graft-versus-Leukämie Effekt (GVL) beschrieben und basiert auf der Aktivität zweier verschiedener zytotoxischer Zellpopulationen: T-Zellen und NK-Zellen.

Der GVL-Effekt der immunkompetenten Spender T-Zellen wird auch in Form einer zusätzlichen T-Zell Infusion (DLI) in Kombination mit einer chemo/radiotherapeutischen Behandlung als Präventiv-Maßnahme in akuten Leukämie-Patienten mit minimaler Resterkrankung (MRD) und drohenden Rezidiven eingesetzt, um die Remission zu stabilisieren (Bader 1999, 1.5.1). Bei der Behandlung von CML-Rezidiven wurden bereits vielversprechende Erfolge erzielt (60-80 % Remission, Carlens 2001). Erste Daten deuten darauf hin, dass bei der DLI-Behandlung von MRD's in akuten Leukämiepatienten bzw. bei Anstieg des autologen Anteils bei akuten Leukämiepatienten die Verhinderung eines beginnenden Rezidivs in Abhängigkeit von der eingesetzten T-Zell-Dosis steht (Shiobara 2000). Limitiert ist der Einsatz von DLI's durch das mögliche Auftreten einer weiteren immunologischen Reaktion, der GVHD. Diese Erkrankung ist auf die Alloreaktivität der Spender T-Zellen gegenüber Patienten-Antigenen zurückzuführen und kann mit schweren Komplikationen verbunden sein oder zum Teil kann sie auch einen tödlichen Verlauf nehmen. Gerade im Hinblick auf die adaptive Infusion von hohen T-Zelldosen (1×10^8 T-Zellen/kgKG, Shiobara 2000) stellt die Gefahr einer GVHD-Entwicklung eine große Einschränkung dar. Der Einsatz Suizidgen-exprimierender T-Zellen ist ein erster Schritt, der die Applikation allogener T-Zellen sicherer und kontrollierbarer machen könnte.

Bei Kindern verläuft die immunologische Rekonstitution in der Phase nach Transplantation schneller und anders als beim erwachsenen Patienten. Während sich der Anteil der T-Zellen bei erwachsenen Patienten größtenteils aus peripher expandierten Zellen zusammensetzt, ist der Großteil der T-Zellen bei Kindern Thymus-geprägt (Eyrich 2001). Da zum jetzigen Zeitpunkt keinerlei Daten für eine pädiatrische DLI mit gentechnisch veränderten T-Zellen vorliegen zielen die Anforderungen an ein solches „System“ auf eine effiziente Selektion und

Eliminierung der aktivierten, proliferierenden und auch der „ruhenden“ transduzierten Spender T-Zellen ab. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche retrovirale Selektions/Suizidgen Fusionsvektoren entwickelt, die die Möglichkeit einer späteren Kombination eröffneten, um ein effizientes synergistisch wirkendes „System“ zu etablieren.

4.1 Die Suizid-Strategie zur Depletion von Spender T-Zellen (*in vivo* infolge einer GVHD-Entwicklung)

Die gentechnische Modifikation von Spender T-Zellen mit sogenannten Suizidgenen ermöglicht eine *in vivo*-Depletion der Zellen im Falle einer GVHD-Entwicklung (1.7.3). Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene retrovirale Selektions/Suizid-Fusionsvektoren entwickelt.

4.1.1 Der tCD34/HSV-tk39 retrovirale Fusionsvektor

In dem ersten retroviralen Vektor wurden die Sequenzen der zytoplasmatisch trunkierten Version des humanen CD34 Oberflächenmoleküls (tCD34, 1.6.2.2) und einer GCV-hypersensitiven Mutante der HSV-tk (HSV-tk39, 1.7.1) fusioniert (3.2.1.3). Im Vergleich zu bisher verwendeten retroviralen Suizidvektoren für die Transduktion von Spender T-Zellen wurde erstmals ein Fusionskonstrukt entwickelt, während in anderen Vektoren häufig interne Promotoren oder IRES-Elemente zur Expression von zwei Genen eingesetzt wurden (Tiberghien 1994, Bonini 1997). Mittlerweile wurde ein weiteres Fusionskonstrukt bestehend aus tCD34 und wtHSV-tk publiziert (Fehse 2002). Im Gegensatz zu dem häufig als Selektionsmarker verwendeten *Neomycin*-Resistenzgen (NeoR), bei dem es sich um einen sogenannten metabolischen Selektionsmarker handelt, der eine relativ lange *ex vivo* Kultivierung erfordert (Tiberghien 2001) und dadurch möglicherweise die T-Zell Funktionalität negativ beeinflusst (Sauce 2002, 4.1.4), ermöglicht das tCD34-Oberflächenprotein eine immunomagnetische Anreicherung der transduzierten Zellen, die mit einer kürzeren *ex vivo* Kultivierung der Zellen verbunden ist (Fehse 2000). Der Vorteil, den das tCD34-Molekül gegenüber dem ebenfalls häufig verwendeten Δ LNGFR-Oberflächenmarker hat, liegt in der Möglichkeit einer GMP-gerechten Aufreinigung von CD34-exprimierenden Zellen, die durch den Einsatz des Δ LNGFR-Oberflächenmarkers nicht gegeben ist (Fehse 2002). In einem transgenen Mausmodell wurde gezeigt, dass die Expression des *fulllength* humanen CD34-Moleküls *per se* keine Veränderungen der murinen T-Zell-Entwicklung hervorruft (Healy 1995). Basierend auf *in vivo* Daten mit murinen hämatopoetischen Zellen konnte die gleiche Aussage für das tCD34-Molekül getroffen werden (Fehse 2000). Trotzdem kann noch nicht mit letzter Konsequenz festgestellt werden, dass sich die tCD34-Expression neutral gegenüber

physiologischen Funktionen der modifizierten Zellen auswirkt. Möglicherweise kann eine aberrante Expression die Zellphysiologie der transduzierten Zelle durch Bindung an bisher unbekannte Liganden oder durch Heterodimerisierung mit anderen Oberflächenmolekülen in Bezug auf *homing*, Differenzierung oder Effektor-Funktionen verändern (Fehse 2000). Diese Interaktionen sind vermutlich jedoch Spezies-spezifisch, was bereits für die Stroma-Adhäsion gezeigt wurde (Healy 1995). Im Gesamtkontext gesehen erfüllt der tCD34-Oberflächenmarker mindestens drei von vier Kriterien, die für eine klinische Applikation notwendig sind:

- ® Humaner Ursprung
- ® Expression ausschließlich auf transduzierten Zellen
- ® Kompatibel mit einer GMP-gerechten Technologie zur Aufreinigung der Zellen

Keine Interferenzen mit den physiologischen Funktionen der Zielzellen.

Als Suizidelement wurde die mutierte HSV-tk39 eingesetzt, die gegenüber der wtHSV-tk eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber GCV besitzt und somit den Einsatz geringerer GCV-Konzentrationen zur Eliminierung der transduzierten Zellen erfordert (Black 2001). Ein direkter Vergleich der GCV-spezifischen Suizidinduktion in wtHSV-tk und HSV-tk39 transduzierten T-Zellen zeigte die deutlich erhöhte GCV-Sensitivität von HSV-tk39 exprimierenden Zellen gegenüber geringen Konzentrationen an GCV (Qasim 2002).

4.1.1.1 Die korrekte Expression des tCD34-Moleküls im Kontext des Fusionsproteins

In dieser Arbeit wurde ein retroviraler Vektor konstruiert, durch den das tCD34-Molekül nicht als Einzelprotein exprimiert wurde, sondern als N-terminaler Bestandteil eines Fusionsproteins. Um mögliche Auswirkungen der Fusion auf die korrekte Expression des tCD34-Moleküls zu überprüfen wurden vergleichende Expressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurden Zellen der Jurkat T-Zelllinie mit einem retroviralen Vektor transduziert, der nur für das tCD34-Einzelprotein kodierte (SHX, Abb. 17), bzw. mit einem retroviralen Vektor, der für das Fusionsprotein tCD34/HSV-tk39 kodierte (SHXtk39, Abb. 25). Durchflusszytometrische Analysen der transduzierten und selektierten Zellen zeigten, dass durch die Fusion die korrekte Expression des tCD34-Moleküls an der Zelloberfläche nicht beeinflusst wurde und die Zellen in gleichem Maße aufgereinigt werden konnten, wie die tCD34-exprimierenden Zellen (Abb. 26). Zusätzliche proteinchemische Analysen zeigten ebenfalls, dass die Expression durch die Fusion nicht beeinflusst wurde (Abb. 44). Die immunomagnetische Selektion der tCD34-exprimierenden Zellen resultierte im Schnitt in Populationen, die einen Reinheitsgrad von 97-99 % besaßen (vglb. den Ergebnissen von Fehse 2000)

4.1.1.2 Die GCV-spezifische Eliminierung tCD34/HSV-tk39 exprimierender Zellen

Nachdem in ersten funktionellen Kontrolltestungen gezeigt wurde, dass die HSV-tk39 eine GCV-spezifische Eliminierung in transduzierte Zellen vermittelte (Abb. 23), wurde die Konstruktion des Fusionsvektors durchgeführt (Abb. 25). Durch die Fusion mit dem tCD34 Oberflächenmolekül wird das HSV-tk39 Protein membranständig im Zytoplasma exprimiert. Im Rahmen der Fusion der wtHSV-tk Sequenz an das eGFP-Molekül wurde ein starkes NL-Signal (*nuclear localization signal*) in der HSV-tk Sequenz identifiziert, das für den Transport des Proteins in den Zellkern verantwortlich ist. Die Deletion dieses NLS führt zu einer zytoplasmatischen Expression des Fusionsproteins (vergleichbar dem tCD34/HSV-tk39 Protein), ohne dass die GCV-Sensitivität der transfizierten Zellen reduziert wird (Degreve 1998, Degreve 1999). Diese Daten in Zusammenhang mit den Ergebnissen, die für das tCD34/wtHSV-tk Fusionsmolekül publiziert wurden deuten darauf hin, dass das HSV-tk Protein im Kontext eines Fusionsproteins und damit verbundener zytoplasmatischer Expression weiterhin funktional und aktiv ist (Fehse 2002).

Funktionelle Analysen in Jurkat-Zellen mit dem Ausgangs tCD34/HSV-tk39 Fusionsvektor (SHXtk39) zeigten, dass die Aktivität des HSV-tk39 Proteins bereits bei geringen Konzentrationen von 0,1-1 μM GCV zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl (ca. 60-65 %) führte. Legt man jedoch die Zahl von 1×10^8 T-Zellen/kgKG (Shiobara 2000) für eine wirksame DLI in ALL- und AML-Patienten zugrunde, so würde eine 60 %ige Eliminierung der transduzierten T-Zellen, wie durch Einsatz des SHXtk39-Vektors erreicht, dazu führen, dass noch ca. 6×10^7 T-Zellen/kgKG im Patienten verbleiben. Diese Zellzahl könnte durchaus ausreichend für eine Weiterentwicklung der GVHD sein. Selbst ein minimaler Prozentsatz an überlebenden Spender T-Zellen von 0,1 %, entspricht bei einer Ausgangsdosis von 1×10^8 T-Zellen/kgKG einer Zahl von ca. 10.000 verbliebenen T-Zellen/kgKG. Bonini *et al.* (1997) und Tiberghien *et al.* (2001) konnten bereits in ihren klinischen Studien mit wtHSV-tk transduzierten Spender T-Zellen zeigen, dass die GCV-Applikation bei aGVH-Reaktionen ausreichte um die GVHD zu behandeln. Im Falle von cGVHD-Patienten wurden aber zum einen nach GCV-Applikation noch transduzierte Spender T-Zellen in den Patienten nachgewiesen und zum anderen reichte diese auch nicht aus um die GVHD zu verhindern.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen immunologischen Rekonstitution bei pädiatrischen und adulten Patienten (4) und der möglicherweise damit verbundenen unterschiedlichen immunologischen Reaktionen ist der Einsatz eines verbesserten Suizidmechanismus im Kontext einer pädiatrischen DLI mit gentransduzierten T-Zellen gefordert: so dass weitestgehend sowohl die Eliminierung der proliferierenden, als auch die Eliminierung der ruhenden Zellen vermittelt wird.

In einigen wenigen Tests wurden wtHSV-tk transduzierte Jurkat-Zellen und SHXtk39 transduzierte Jurkat-Zellen hinsichtlich der unterschiedlichen Effizienzen in der GCV-

spezifischen Apoptose-Induktion verglichen (3.2.1.4). Im Rahmen der GCV-Sensitivitätsanalysen zeigten die wtHSV-tk transduzierten Jurkat-Zellen eine deutlich geringere Eliminierungseffizienz von 40 % bei einer GCV-Konzentration von 10 μM , während die Zellzahl der HSV-tk39 exprimierenden Jurkat-Zellen bei einer Konzentration von 10 μM GCV um 70 % reduziert wurde. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist im eigentlichen Sinn jedoch nicht möglich, da es sich um zwei völlig unterschiedliche retrovirale Vektoren handelte die für die jeweilige HSV-tk-Sequenz kodierten.

Es existieren verschiedene Publikationen, die einen direkten Vergleich von wtHSV-tk und HSV-tk39 in Bezug auf die GCV-spezifische Eliminierung beschreiben (Black 1996 und 2001, Qasim 2002). Qasim *et al.* (2002) zeigten mit wtHSV-tk und HSV-tk39 transduzierten PBMC's, dass bei Konzentrationen $< 1 \mu\text{M}$ (Konzentrationsbereich, in dem wahrscheinlich kein myelosuppressiver Effekt des GCV auftritt) bis zu 60 % der HSV-tk39-exprimierenden Zellen GCV-spezifisch eliminiert wurden, während keine deutliche Reduktion der Zellzahl der wtHSV-tk exprimierenden Zellen festzustellen war (MTT-Analysen).

4.1.1.3 Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Effizienz des Fusionsvektors

Um den retroviralen Fusionsvektor für die Transduktion von – und die Expression in- primären T-Zellen zu optimieren, wurden verschiedene Änderungen der retroviralen Basis durchgeführt. Anstelle der LTR des *spleen-focus-forming virus* (SFFV) wurde die LTR des *murine-proliferative-sarcoma virus* (MPSV) verwendet. In einer früheren Studie von Onodera *et al.* (1998) wurde gezeigt, dass diese LTR zu einer verbesserten Expression in T-Zellen führte. Zusätzlich wurde ein posttranskriptionelles Regulationselement aus dem *Woodchuck-hepatitis virus* (WPRE) 3' der Sequenz des Fusionsgens integriert, das in einigen Zielzellen eine Zellzyklus- und Promotorunabhängige expressionsverstärkende Wirkung haben soll (Zuffrey 1999). Der genaue Mechanismus der WPRE-Funktion ist noch nicht geklärt: scheinbar greift es sehr früh während der Biogenese des RNA-Transkripts ein, möglicherweise dadurch, dass die RNA sofort nach dem Verlassen der transkriptionellen Maschinerie effizient prozessiert wird (Zuffrey 1999). Neuere Daten zeigen, dass das WPR-Element eine Verlängerung des Poly-A Anteils bewirkt (<http://www.uic.edu/depts/mcmmi/faculty/hope.html>). Die *leader*-Region des retroviralen Vektors war dergestalt modifiziert, dass alle potentiell rekombinanten viralen kodierenden Sequenzen sowie 6 von 7 aberranten AUG-Startcodons eliminiert wurden. Auf diese Weise wurde die Möglichkeit der homologen Rekombination mit verwandten viralen Sequenzen (die möglicherweise endogen in den Verpackungszellen oder Zielzellen vorhanden sind), die zu der Entstehung von neuen oder replikationskompetenten Retroviren führen könnten, die potentiell pathogen sein könnten, minimiert (Hildinger 1999).

Der optimierte retrovirale Fusionsvektor (MtCD34tk39w) zeigte in durchflusszytometrischen Analysen keine deutliche Steigerung der Transduktionsrate oder gar der Expressionseffizienz

(Abb. 30, Tab. 15), führte aber in GCV-Sensitivitätstestungen zu einer verbesserten Eliminierung transduzierter T-Zellen bei allen verwendeten GCV-Konzentrationen. Im Bereich von 0,1-1 μM GCV wurden zwischen 70-75% der Zellen eliminiert.

Ein Problem, was möglicherweise die Effizienz des HSV-tk39 Proteins negativ beeinflussen könnte ist die Bildung eines durch einen Spleißvorgang nicht-funktionalen HSV-tk39 Transgens. Garin *et al.* (2001) konnten eine nicht-funktionale Spleißvariante der HSV-tk nachweisen, die auf die Existenz eines kryptischen Spleißmechanismus in der Sequenz des *HSV-tk* Gens zurückzuführen war. Das gespleißte HSV-tk Produkt ist um ca. 227 bp kürzer als die funktionale HSV-tk. Die Eliminierung des kryptischen Spleißmechanismus durch Mutagenese-PCR scheint zu einer effizienteren Eliminierung der transduzierten Zellen und einer geringeren „Resistenzbildung“ zu führen (Chalmers 2001). In anderen Untersuchungen hingegen konnte kein inaktives Spleißprodukt nachgewiesen werden. Die Ergebnisse, die dort dargestellt wurden deuten darauf hin, dass es sich um einen Spleißvorgang handelt, der bereits in der Verpackungszelllinie eingetreten war, so dass die Zielzellen bereits mit einer gespleißten HSV-tk Version transduziert wurden (Qasim 2002).

Um eine Resistenzbildung der Zellen aufgrund eines inaktiven Spleißprodukts zu vermeiden wurde im Rahmen dieser Arbeit die kryptische *spleiß-donor* Sequenz in der HSV-tk39 Sequenz durch Mutagenese-PCR eliminiert, ohne den Leserahmen oder sie Aminosäuresequenz zu verändern (3.2.2.3, MtCD34tk39mw). Zunächst wurden vergleichende Analysen zu dem nicht-spleißkorrigierten Vektor in HUT 78-Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen zeigten die HUT 78-Zellen bereits mit der nicht-spleißkorrigierten HSV-tk39 Sequenz eine höhere Effizienz in der Reduktion der Zellzahl durch GCV. Bei einer Konzentration von 1 μM GCV wurden bereits bis zu 80 % der Zellen eliminiert (vs. 70-75 % der Jurkat-Zellen). Dieser Aspekt deutet auf eine unterschiedliche Zell-spezifische HSV-tk39 Sensitivität hin und zeigt, dass aussagekräftige Analysen letztendlich nur in den eigentlichen Zielzellen durchzuführen sind. Die spleißkorrigierte HSV-tk39 vermittelte GCV-Sensitivität führte zu einer verbesserten Eliminierung der transduzierten Zellen in allen Konzentrationsbereichen; bereits bei 1 μM GCV wurden bis zu 95 % der Zellen eliminiert. In der folgenden Tabelle (Tab. 24) sind noch einmal die Vektor-vermittelten GCV-Sensitivitäten sowohl in Jurkat-Zellen, als auch in HUT 78-Zellen bei einer Konzentration von 1 μM GCV einander gegenübergestellt.

	<i>Jurkat Zellen</i>			<i>HUT 78 Zellen</i>	
	SXtk39	SHXtk39	MtCD34tk39w	MtCD34tk39w	MtCD34tk39mw
% induzierter Zelltod	60	65-70	75-82	80-85	95

Tab. 24: Vergleich der GCV-induzierten Apoptose durch die verschiedenen retrovirale Konstrukte; sowohl in Jurkat-Zellen, als auch in HUT 78-Zellen. Die Zellen wurden für 4 Tage mit einer Konzentration von 1 μ M GCV inkubiert und am fünften Tag über MTS-Tests hinsichtlich der Zellzahl analysiert.

Die verschiedenen Optimierungsschritte führten zu einer deutlichen Verbesserung der GCV-spezifischen Eliminierung der HSV-tk39 transduzierten Jurkat- und HUT 78-Zellen.

Weitere retrovirale Suizidvektoren wurden ebenfalls in verschiedenen anderen präklinischen *in vitro* Studien in T-Zelllinien getestet. Vergleiche der GCV-spezifischen Induktion des Zelltods des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten MtCD34tk39mw-Vektors mit Daten anderer Arbeitsgruppen, die zumeist mit der wtHSV-tk ermittelt wurden, zeigen, dass die verschiedenen Vektoren eine ähnliche GCV-Sensitivität vermitteln (Tab. 25).

	MtCD34tk39mw (HUT 78 Zellen, 1 μ M GCV)	G1TkSvNa (Tiberghien 1994, HUT 78 Zellen, ca. 3 μ M GCV)	TKSR39.1 (Qasim 2002, Molt 4- Zellen, 1 μ M GCV)	F (Fehse 2002, Jurkat- Zellen 3 μ M GCV)
% induzierter Zelltod	95	80	55	90

Tab. 25: Vergleich der verschiedenen retrovirale HSV-tk Vektoren in Bezug auf die effiziente GCV-spezifische Eliminierung der transduzierten Zellen. G1TkSvNa und F-transduzierte Zellen wurden mit 3 μ M GCV behandelt, während die MtCD34tk39mw und TKSR39.1 transduzierten Zellen mit 1 μ M GCV behandelt wurden. Die Kultivierungsdauer variiert von 4-6 Tagen. Zur Detektion der Zellzahl wurden die TrypanBlau-Färbung (F), ³Thymidin-Einbau (G1TkSvNa) und MTT- bzw. MTS-Tests (TKSR39.1 sowie MtCD34tk39mw) eingesetzt.

Auch in diesem Fall ist ein direkter Vergleich nicht möglich, da es sich um verschiedene retrovirale Vektoren, verschiedene GCV-Inkubationszeiten und verschiedene Detektionsmethoden der Zellzahl handelt. Die GCV-behandelte MtCD34tk39mw Population wurde parallel zu den MTS-Analysen auch über TrypanBlau-Färbung hinsichtlich der Veränderung der Zellzahl analysiert. Mikroskopisch konnten nach TrypanBlau-Färbung keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden. Die verbliebene im MTS-Test detektierte biologische Aktivität könnte ein Artefakt sein und auf die Anwesenheit von degenerativem zellulären Material zurückzuführen sein (Qasim 2002, Korkoris 1999). Möglicherweise stellt der Test jedoch auch einfach eine gegenüber der TrypanBlau-Färbung sensitivere Methode zur

Bestimmung der Zellzahl dar, die vergleichbare Ergebnisse zu PI-Färbungen oder auch Annexin-V Färbungen liefert.

In weiterführenden Analysen wurde versucht, die Frage nach dem „Resistenz“-Mechanismus der wenigen überlebenden Zellen zu klären. Obwohl die Modifikation des kryptischen *sd's* in der HSV-tk39 Sequenz zu einer Verminderung der Zahl überlebender Zellen führte, konnte weder auf DNA noch auf RNA-Basis ein Unterschied zu den nicht-korrigierten Zellen detektiert werden. In keiner der Proben wurde ein ca. 227 bp verkürztes Spleißprodukt detektiert.

Durchflusszytometrische Analysen der GCV-behandelten Zellen gaben Aufschluss über die Expression des Transgens. *Silencing*-Vorgänge hätten z. B. dazu führen können, dass das Transgen nicht länger exprimiert wurde und die Zellen auf diese Weise der GCV-Behandlung gegenüber resistent waren. Nach 4tägiger Behandlung mit 10 µM GCV verblieben noch ca. 2-4 % „resistente“ Zellen, die zu ca. 70 % noch CD34 exprimierten. Eine anschließende zweitägige *in vitro* Kultivierung der Zellen führte zu einer Restpopulation von ca. 1-2 % „resistenter“ Zellen, die lediglich nur noch zu 12 % CD34 exprimierten. Obwohl es sich hierbei um eine T-Zelllinie handelte, die eine recht hohe Teilungsrate hat (ca. 24 hrs), scheint die resistente Population nach viertägiger GCV-Behandlung durchaus auf eine geringere Teilungsfrequenz der Zellen zurückzuführen sein, so dass die Zellen eine vorübergehende GCV-Resistenz erwerben, die aber durch die andauernde Kultivierung und darauf folgende wieder eintretende Proliferation minimiert werden kann. Bei den verbliebenen 12 % CD34-exprimierenden resistenten Zellen ist der Mechanismus der zu der „Resistenz“ führt noch nicht weiter untersucht worden. Durchflusszytometrische Analysen von Aktivierungsmarkern z.B. könnten Aufschluss über den Proliferationsstatus der Zellen geben.

4.1.1.4 Die Funktionalität des optimierten tCD34/HSV-tk39-Fusionsvektors in humanen primären T-Zellen

Die wirklich aussagekräftigen Untersuchungen eines neuen Ansatzes können nur in den eigentlichen Zielzellen durchgeführt werden, da es sich bei Zelllinien letztendlich um eine Art „artifizielles“ System handelt, das anderen Gesetzen unterliegt als die primären Zellen. T-Zelllinien z.B. wachsen Zytokin-unabhängig, während frisch isolierte primäre T-Zellen erst mit einer bestimmten Zytokinkombination zur Proliferation und Aktivierung angeregt werden müssen (1.6.2). Um die Effizienz des retroviralen Fusionsvektors in primären T-Zellen zu untersuchen, wurden CD3-selektierte T-Zellen aus *Buffy-Coats* mit dem entsprechenden Vektor transduziert und selektiert. Im Gegensatz zu dem ursprünglich weit verbreiteten Einsatz von PBLs (Tiberghien 1994, Verzeletti 1998) wurden für unseren Ansatz die T-Zellen über den CD3-Oberflächenmarker selektioniert. Diese Methode der Aufreinigung von T-Zellen soll im Hinblick auf eine klinische Anwendung das Risiko der Kontamination mit B-Lymphozyten, die zu der Entwicklung eines späteren EBV-assoziierten Lymphoms führen können, minimieren

(Meijer 2002). Die T-Zellen wurden mit einer Kombination aus antiCD3/CD28 und hIL-2 prästimuliert, was nach bisherigen Erkenntnissen im Vergleich zu anderen Stimulationsmethoden zu der geringsten Veränderung der T-Zell Funktionalität führt (4.1.4).

Die in der vorliegenden Arbeit transduzierten und selektionierten primären T-Zellen wurden hinsichtlich der GCV-induzierten Apoptose untersucht (3.3.2). Im Gegensatz zu den HUT 78-Zellen war lediglich ein minimaler Unterschied in der Eliminierungseffizienz von nicht-spleißkorrigierter und spleißkorrigierter HSV-tk39 zu erkennen (Abb. 46A). Die Transduktion mit dem optimierten MtCD34tk39mw Vektor resultierte bereits bei der geringen Konzentration von 0,1 μM GCV in einer Reduktion der Zellzahl auf 15-20 %, während der Einsatz höherer Konzentrationen zu einer Reduktion der Zellzahl von 95-99 % führte.

In einer aktuell publizierten Studie wurde ebenfalls ein retroviraler Suizid-Fusionsvektor, bestehend aus dem tCD34-Selektionsmolekül und dem *wtHSV-tk* Gen hinsichtlich der effizienten GCV-spezifischen Eliminierung von transduzierten primären T-Zellen getestet (Fehse 2002). Da es sich um ein analoges Prinzip zu dem in dieser Arbeit konstruierten Vektor handelt, bietet sich ein Vergleich der erzielten Ergebnisse an. Die 6-tägige Behandlung von tCD34/*wtHSV-tk* transduzierten T-Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ (ca. 3 μM) GCV führte zu einer Eliminierung von nahezu 99 % der Zellen (bestimmt über TrypanBlau-Färbung, Fehse 2002), während die 4-tägige Inkubation von MtCD34tk39mw transduzierten T-Zellen mit 1 μM GCV in einer Reduktion der Zellzahl von 95-98 % resultierte (über MTS, bzw. PI-Färbung ermittelt). Vergleicht man die GCV-induzierte Apoptose des *wtHSV-tk* Vektors (Fehse) und des tCD34/HSV-tk39 Fusionsvektors, so zeigen beide Vektoren eine ähnlich gute Effizienz (99 % vs. 98 %). Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist nicht möglich, da die Daten nicht in einer einheitlichen Studie unter gleichen Bedingungen ermittelt wurden.

In einem weiteren Vergleich wurde der Fusionsvektor direkt mit einem anderen retroviralen Vektor, der für das HSV-tk39 Einzelgen kodierte, verglichen. MtCD34tk39mw transduzierte PBL's sowie TKS39.1 transduzierte PBL's wurden *in vitro* in Bezug auf die GCV-induzierte Eliminierung untersucht (W. Qasim, persönliche Mitteilung). Beide Vektoren vermittelten den transduzierten PBL's eine vergleichbare Eliminierungseffizienz (ca. 70 % bei 3 μM GCV, MTT-Test).

Alle präklinischen Untersuchungen (*in vitro* und *in vivo* Mausmodelle) mit HSV-tk transduzierten T-Zellen wurden zumeist unter Bedingungen durchgeführt, die einen GVL-Effekt nicht berücksichtigten. Litvinova (2002) zeigten in einem murinen Leukämiemodell, in dem die Mäuse mit TCD-Knochenmarkszellen (5×10^6) und zusätzlich $8,4 \times 10^6$ bis $9,2 \times 10^6$ T-Zellen transplantiert wurden, dass eine GCV-Applikation (50 mg/kg) zum Zeitpunkt des *engraftens* eine GVHD-Entwicklung kontrollieren kann, aber gleichzeitig auch zu einem Verlust des GVL-Effekts führt. Eine spätere GCV-Applikation an Tag 6 führte ebenfalls zu der Kontrolle einer GVHD-Entwicklung eliminierte aber nicht gleichzeitig den GVL-Effekt.

Verbliebene „resistente“ Donor T-Zellen waren nicht in der Lage eine erneutes Leukämie-Rezidiv, hervorgerufen durch eine zweite Infusion von 2×10^3 leukämischen Zellen (P815), zu kontrollieren. Möglicherweise führte die GCV-Behandlung zu einer Reduktion der Zahl allo-Antigen-spezifischer oder Leukämie-Antigen-spezifischer GVL-vermittelnder T-Zellen, die vielleicht einen verspätet eintretenden leukämischen Rückfall hätten verhindern können (Litvinova 2002). Die Daten aus diesem Mausmodell zeigen, dass eine zeitabhängige GCV-Eliminierung der Zellen präventiv einer GVHD-Entwicklung zu einem Fortbestehen des GVL-Effekts führen kann. Möglicherweise eröffnen sich somit andere, neuartige klinische GCV-Applikationsprotokolle zur Kontrolle einer GVHD und zur „Entwicklung“ eines GVL-Effekts, denn in den bisher durchgeführten klinischen Studien wurde GCV lediglich dann zur Eliminierung der T-Zellen eingesetzt, wenn eine GVHD-Entwicklung auftrat.

4.1.1.5 Potentielle Limitierungen des tCD34/HSV-tk39 Vektors

Keine der bisher auf Basis der HSV-tk entwickelten Suizidstrategien führt zu einer „100 %igen“ Eliminierung der Zellen; trotzdem wurden bereits deutliche Erfolge in der Therapie von GVHD-Entwicklungen in Patienten durch Applikation von GCV erzielt, wobei sich die Behandlung von cGVHDs als problematisch erwies, was auf deutlich langsamer proliferierende Zellen zurückzuführen sein könnte. Trotz der vergleichbaren und zum Teil besseren Effizienz des MtCD34tk39mw Vektors weist diese Strategie durchaus limitierende Faktoren auf.

Die Zellzyklusabhängigkeit der HSV-tk besteht auch für die GCV-hypersensitive Mutante, d.h. ausnahmslos proliferierende Zellen können eliminiert werden. Normalerweise sollte dies für die Behandlung einer GVHD ausreichen, da nach bisherigen Erkenntnissen nur aktivierte und proliferierende T-Zellen eine alloreaktive Funktion ausüben können. Ob ruhende, nicht eliminierte Spender T-Zellen zur Entwicklung einer cGVHD beitragen können ist zur Zeit nicht bekannt. Ein Suizidmechanismus der die Eliminierung sowohl proliferierender alloreaktiver T-Zellen als auch ruhender T-Zellen ermöglicht würde zu einer verbesserten Sicherheit dieser Art der adaptiven Therapie führen.

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung spielt die Frage nach dem immunogenen Potential des Transgens eine entscheidende Rolle, da dies zu einer sofortigen Eliminierung der transduzierten T-Zellen führen könnte. Der Selektionsmarker tCD34 ist humanen Ursprungs, während das HSV-tk39 Suizidgen viralen Ursprungs ist und somit potentiell immunogen wirken kann. Zusätzliche Faktoren sind zum einen die Fusion der beiden Gene, die in der Entstehung eines neuen immunogenen Epitops resultieren könnte und zum anderen die Verwendung einer mutierten HSV-tk Variante, die möglicherweise verstärkt oder aber auch vermindert immunogen wirken könnte. Über das immunogene Potential der HSV-tk *per se* ist nicht viel bekannt. In der klinischen Studie von Bonini *et al.* (1997) wurden immunogene Reaktionen gegenüber dem NeoR/wtHSV-tk Fusionsprotein festgestellt, wobei zu berücksichtigen ist, dass

das NeoR Protein für sein hohes immunogenes Potential bereits bekannt ist (Verzeletti 1998). Aussagen in Bezug auf diesen Aspekt im Kontext des in dieser Arbeit entwickelten Vektors können nur im Rahmen einer klinischen Phase I Studie getroffen werden.

Eine weitere Problematik ergab sich durch die WPRE-Sequenz, die z.T. für offene Leserahmen des WHV kodierte, die zur Expression von potentiell toxischen Produkten führen könnten. Aus sicherheitstechnischen Aspekten wurde die WPRE-Sequenz aus dem MtCD34tk39mw Vektor eliminiert. Expressions- und Funktionsanalysen zeigten keine Veränderung der Expressionsstärke des Transgens, keine Veränderung der Funktionalität sowie keine negativen Auswirkungen auf die Langzeit-Expression des Transgens (3.8.3). Der MtCD34tk39m Vektor steht nun für den Einsatz in einer klinischen Phase I Studie zur Verfügung.

Im Zusammenhang mit der klinischen Anwendung von HSV-tk39 transduzierten Zellen sind noch weitere Aspekte zu berücksichtigen. Zur Behandlung von viralen Infektionen kommt zumeist das Virostatikum GCV zum Einsatz, das in dem hier zugrunde liegenden Konzept zu einer unerwünschten Eliminierung der transduzierten Spender T-Zellen führen würde. Aus diesem Grunde wurden verschiedene andere Virostatika (ACV und Cido) hinsichtlich ihrer eliminierenden Funktion auf HSV-tk39 exprimierende Zellen getestet. Cidofovir war das einzige Virostatikum, das lediglich in einer partiellen Eliminierung der transduzierten Zellen resultierte. Maximal wird eine Serumkonzentration von 40 µM Cido in erwachsenen Patienten bei der Behandlung einer viralen Infektion erreicht (Produktinformation), was zu einer Eliminierung von 50-60 % der HSV-tk39 exprimierenden Zellen führen würde. Die verbliebenen Zellen könnten jedoch weiterhin zu einem GVL-Effekt beitragen, während der Einsatz von GCV oder ACV in diesem Konzentrationsbereich zu einer nahezu vollständigen Eliminierung der Zellen führen würde.

Eine andere Frage, die jedoch nur in einem *in vivo* Modell beantwortet werden kann bezieht sich auf das *homing*-Verhalten und das Überleben der transduzierten Zellen. In einer präklinischen Studie wurden HSV-tk transduzierte humane T-Zellen in NOD/SCID-Mäuse injiziert und hinsichtlich ihrer Verteilung und Eliminierung durch GCV-Applikation untersucht. Transduzierte T-Zellen unterschieden sich weder im *engraftment* noch im *homing*-Verhalten von nicht-transduzierten T-Zellen (Di Ianni 2002, Olive 1998). Ähnlich den hier erzielten *in vitro* Daten waren auch in dem Mausmodell nach GCV-Behandlung noch einige wenige resistente Zellen zu finden, deren „Resistenz“ entweder auf Methylierungsprozesse auf DNA-Ebene oder auf die Zellzyklusabhängigkeit des Systems zurückzuführen war (Di Ianni 2002).

4.1.2 Der DLNGFR/Fv´Fv/DED retrovirale Vektor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zweites Selektions/Suizid Fusionsmolekül entwickelt. Dadurch entsteht für die Zukunft die Möglichkeit einen aus zwei unterschiedlichen Fusions-elementen bestehenden Vektor zu konstruieren, der einen additiven/synergistischen Mechanismus sowohl in Bezug auf die Selektion, als auch in Bezug auf die Eliminierung der Zellen bieten könnte und dadurch die Sicherheit der GVHD-Kontrolle erhöhen würde.

Der zweite Fusionsvektor wurde aus völlig anderen Elementen konstruiert. Der Vorteil von Oberflächenmarkern gegenüber metabolischen Markern zur Selektion der transduzierten Zellen wurde bereits erläutert (4.1.1). Um im Hinblick auf eine spätere Kombination beider Fusionsgene eine effiziente Selektion (über zwei verschiedene Marker) zu ermöglichen wurde für die Entwicklung dieses Fusionsproteins ein tCD34-verschiedener Selektionsmarker eingesetzt, der Δ LNGF-Rezeptor (1.6.2.1), der bereits in verschiedenen präklinischen und klinischen Studien verwendet wurde. Als Suizidelement wurde die DED des humanen FADD Moleküls verwendet, die durch kontrollierte Dimerisierung in den transduzierten Zellen Apoptose induziert (1.7.2).

4.1.2.1 Induktion der Apoptose durch kontrollierte Dimerisierung der DED in transduzierten Zellen

Die transduzierten HUT 78-Zellen konnten über die Expression des Δ LNGFR durchflusszytometrisch analysiert werden und durch immunomagnetische Selektion zu homogenen Populationen (96-98 %) angereichert werden (3.2.3.1). Sowohl hinsichtlich der Transduktionseffizienz (40-50 %), als auch in Bezug auf die Effizienz der Selektion waren die Ergebnisse vergleichbar einem ähnlichen Fusionsvektor, der für das Δ LNGFR-Molekül als Selektionsmarker in Kombination mit dem intrazytoplasmatischen Teil des Fas-Moleküls als Suizidelement (Thomis 2001) kodierte. Erste Funktionalitätstests des retroviralen DED-Vektors wurden in HUT 78-Zellen durchgeführt und zeigten, dass in einem Konzentrationsbereich von 0,1-10 nM des Dimerisierers AP20187 (Abb. 38) bereits 85-90 % der Zellen eliminiert wurden und durch Einsatz höherer Konzentrationen (100 nM) der Anteil an überlebenden Zellen nicht weiter reduziert werden konnte (Abb. 42). Humane primäre T-Zellen wurden ebenfalls mit dem Vektor mit einer Transduktionseffizienz von 35 % transduziert und immunomagnetisch auf eine Population von 91 % transduzierten Zellen angereichert (Abb. 43B). AP20187-Behandlung von transduzierten und selektierten Zellen führten zu einer spezifischen Reduktion der Zellzahl von 80-85 % im Bereich von 0,1-10 nM AP20187 (Abb. 46B). Durch die Aktivierung des analogen Fas-basierenden Suizidelements wurden bei einer Konzentration von 0,1 nM AP1903 (AP20187 Vorstufe) ca. 40 % der Zellen eliminiert, was durch die Verwendung höherer

Konzentrationen auf 80 % erhöht werden konnte (Thomis 2001). Der Einsatz des im Fas-Signaltransduktionsweg weiter *downstream* lokalisierten DED-Moleküls könnte den Vorteil haben, dass weniger Moleküle zur Induktion der Apoptose benötigt werden, so dass eine geringere Basis für Defekte, die in einer ineffizienten Eliminierung resultieren würden, vorhanden ist.

4.1.2.2 Einschränkende Faktoren der DED-Apoptose-Induktion

Die Zellen wurden kontinuierlich mit dem Dimerisierer behandelt. T-Zellen, die mit dem Fas-basierten Fusionsvektor transduziert wurden, resultierten nach kontinuierlicher AP1903-Behandlung in einer resistenten Population von ca. 20 % (Thomis 2001). Durchflusszytometrische Analysen von AP20187 behandelten HUT 78-Zellen zeigten, dass noch 20 % der überlebenden Zellen den Δ LNGFR-Marker und somit das Transgen exprimierten. Der Großteil der resistenten Zellen (80 %) exprimierte Δ LNGFR nicht mehr durchflusszytometrisch nachweisbar auf der Zelloberfläche. Möglicherweise ist dieses „Phänomen“ auf die kontinuierliche Behandlung mit dem Dimerisierer zurückzuführen. Das permanente Vorhandensein des AP20187 kann zu einer Clusterbildung des Fusionsproteins an der Zellmembran führen und in der Endozytose resultieren. Auf diese Weise ist weder der Δ LNGFR-Oberflächenmarker durchflusszytometrisch nachweisbar, noch kann durch Dimerisierung der DED die Apoptose induziert werden, so dass die Zellen vorübergehend „resistent“ sind (persönliche Mitteilung T. Clackson, ARIAD Pharmaceuticals Inc.). Eine Behandlung mit mehreren Impulsen an AP20187 anstelle der kontinuierlichen Behandlung führt zu einer leichten Erhöhung der eliminierten Zellzahl (ca. 90 %) und zu einer Reduktion der Δ LNGFR exprimierenden „resistenten“ Zellen auf ca. 12% (Tab. 26)

	kontinuierliche AP20187 Behandlung	AP20187-Impuls Behandlung
% induzierte Apoptose	85	92
% resistente NGFR+ Zellen	20	12

Tab. 26: Vergleich der Behandlung von HUT 78 Zellen mit 10 nM AP20187. Gegenüberstellung der resistenten Δ LNGFR+ HUT78-Zellen nach 4-tägiger kontinuierlicher oder Impuls-artiger AP20187-Behandlung.

Ähnliche Ergebnisse wurden in der Studie von Thomis (2001) erzielt, die ebenfalls eine effizientere Eliminierung der transduzierten Zellen durch Impuls-Gaben von AP1903 im Vergleich zu kontinuierlicher Behandlung zeigen konnten.

Eine weitere mögliche Begründung für die resistenten Zellen könnte ein *Silencing*-Vorgang von *downstream*-Molekülen des Fas-Apoptose Signaltransduktionswegs durch DNA-Methylierung sein. In pädiatrischen Neuroblastompatienten wurde bereits ein Defekt der Fas-induzierten Apoptose aufgrund von *silencing* der Caspase 8 nachgewiesen (Teitz 2000). Um einen möglichen *downstream*-Defekt der Fas-Signaltransduktionskette nachzuweisen, wurden die resistenten AP20187 behandelten transduzierten HUT 78-Zellen mit dem Fas-Liganden (antiFlag, Cycloheximid) behandelt, was in der Eliminierung sämtlicher Zellen resultierte. Ein Defekt der *downstream*-Moleküle des Fas-Signaltransduktionswegs war somit auszuschließen, ebenso wie eine transiente Überexpression von antiapoptotischen Molekülen, wie bcl-2, bcl-xL. Eine noch nicht geklärte Möglichkeit der Resistenzentwicklung könnte auf *rearrangements* durch die beiden FKBP-Kopien (Fv´Fv) im retroviralen Genom zurückzuführen sein, die in der Expression eines inaktiven Suizidmoleküls resultieren könnten. Dies muss über PCR-Reaktionen von DNA und RNA untersucht werden. Thomis *et al.* (2001) konnten mit dem analogen Fas-Fusionsvektor zeigen, dass die beiden FKBP-Kopien zu keinen *rearrangement*-Formen führten.

Im Hinblick auf die klinische Anwendung des MNFv´FvDED Vektors ist zu bedenken, dass für die immunomagnetische Aufreinigung von Δ LNGFR+ Zellen kein GMP-gerechtes Protokoll existiert. Der Austausch des Δ LNGFR-Markers gegen ein Selektionsmolekül, das eine GMP-gerechte Aufreinigung ermöglicht, ist zu überlegen. Ein alternatives Molekül wäre das humane CD133-Oberflächenmolekül, das auf primitiven Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird (Miraglia 1997). Über die Funktion des Moleküls ist bislang nichts bekannt, möglicherweise spielt es jedoch eine Rolle in der Hämatopoese und Differenzierung. CD133 ist ein Rezeptorprotein mit 5-Transmembran-Domänen und scheint zur Familie der murinen Prominin-Glykoproteine zu gehören, deren spezifische Funktion und potentielle Liganden noch charakterisiert werden müssen. Ein antiCD133 Antikörper (CD133⁺ microbeads, Miltenyi Biotec) wurde bereits zur Selektion von CD133-positiven Stammzellen im Kontext einer autologen Transplantation in einem pädiatrischen Patienten verwendet (Koehl 2002), so dass die Anwendung des CD133-Moleküls als Selektionsmarker auf transduzierten T-Zellen eine mögliche Alternative bieten würde. Erste Versuche zeigten, dass Zellen, die mit einem retroviralen Vektor transfiziert wurden, der für die cDNA von CD133 kodierte, im Anschluss an die Transfektion effizient CD133 an ihrer Oberfläche exprimierten. Es wurde bereits eine zytoplasmatisch deletierte CD133-Mutante konstruiert, um mögliche physiologische Interferenzen mit den Zielzellen zu vermeiden, die ebenfalls von transfizierten Zellen exprimiert wurde. Expressionsanalysen und Funktionalitätsanalysen im Kontext eines Fusionsproteins müssen jedoch noch durchgeführt werden. Weiterführende *in vivo* Analysen könnten Aufschluss über eine Veränderung der Funktionalität, bzw. des *homing*-Verhaltens der CD133-transduzierten T-Zellen geben, analog den CD34 Maus-Experimenten (4.1.1).

4.1.3 Die kontrollierte Induktion des Zelltods steht in Abhängigkeit von der Zeit

In einer zeitabhängigen Kinetik wurden die beiden Selektions/Suizid-Fusionselemente in Bezug auf die kontrollierte Induktion des Zelltods in T-Zellen untersucht. Vorab durchgeführte semiquantitative PCR-Analysen ermöglichten eine Aussage über die Anzahl der integrierten Kopienzahlen des jeweiligen Provirus in die Zielzellen, um einen direkten Vergleich durchführen zu können (3.4.1). Die transduzierten Zellen wurden kontinuierlich für 4 Tage mit GCV (1 μ M) oder AP20187 (1 nM) behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich der Veränderungen der Zellzahl analysiert (3.4.2). In der folgenden Tabelle (Tab. 27) sind die Effizienzen einander gegenübergestellt.

Zeitpunkt (Stunden)	HSV-tk39 % überlebende Zellen	DED % überlebende Zellen
0	100	100
5	95	30
7	85	22
24	78	22
48	45	20
72	18	18
96	2	19

Tab. 27: Vergleich der spezifisch induzierten Apoptose in MtCD34tk39mw und MNFv'FvDED transduzierten Zellen. Die MtCD34tk39mw transduzierten Zellen wurden mit 1 μ M GCV behandelt, die MNFv'FvDED transduzierten Zellen wurden mit 1 nM AP20187 behandelt.

Die AP20187 induzierte Apoptose in MNFv'FvDED transduzierten Zellen führte bereits innerhalb der ersten fünf Stunden zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl (70 %), die durch eine längere Inkubation verstärkt wurde (81 %) und für den Fas-basierenden Vektor bereits beschrieben wurde (Thomis 2001). Die Induktion der Apoptose in MtCD34tk39mw transduzierten Zellen durch GCV-Gabe resultierte im Gegensatz dazu erst nach 48 hrs in einer deutlichen Reduktion der Zellzahl (55 %), die aber durch die länger andauernde Behandlung noch deutlich erhöht wurde und zur Eliminierung nahezu aller Zellen führte (98%). Die langsamere Wirkung des HSV-tk39 Moleküls steht wahrscheinlich mit der Zellzyklusabhängigkeit des Suizidelements in Zusammenhang. Während die AP20187 kontrollierte Eliminierung der Zellen bereits nach kurzer Zeit eine deutliche Wirkung zeigt, führt die langsamer wirkende GCV-Kontrolle zu einer besseren Eliminierung der Zellen. Die ursprüngliche Idee, eine Kombination beider Fusionsgene in einem retroviralen Vektor zu konstruieren, könnte tatsächlich in einem additiven Effekt resultieren, indem sowohl die schnelle Aktion des DED-Moleküls, als auch die effizientere Methode des HSV-tk39 Proteins

kombiniert würden. Erste Analysen hierzu wurden in doppelt-transduzierten und selektionierten HUT 78-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse deuten auf eine schnellere und effizientere Eliminierung der transduzierten Zellen durch Aktivierung beider Suizidmoleküle hin (Abb. 55). Analysen in primären T-Zellen wurden noch nicht durchgeführt.

4.1.4 Veränderung der Alloreaktivität von T-Zellen durch *ex vivo* Kultivierung und den Transduktions/Selektionsprozess

4.1.4.1 Auswirkungen von *ex vivo* Kultivierung und Transduktionsprozess auf die Alloreaktivität von T-Zellen

Für die erfolgreiche adaptive Gentherapie ist es notwendig, dass die T-Zellen durch die *ex vivo* Prozedur der Aktivierung, Transduktion und Selektion nicht ihre Alloreaktivität gegenüber leukämischen Blasten verlieren. Da oncoretrovirale Vektoren ausnahmslos proliferierende Zellen transduzieren können, müssen die frisch-isolierten T-Zellen *ex vivo* mit Zytokinen aktiviert und zur Proliferation stimuliert werden (1.6.2). Die Art der Aktivierung der Zellen kann zu einer Veränderung des Migrations- und *homing*-Verhaltens der T-Zellen und damit verbunden zu einer Veränderung der *in vivo*-Funktion der Zellen führen (Hamann and Rebstock 1993). Der Einfluss mitogener Stimulation (PHA) auf die T-Zell Funktionalität wurde unter anderem in einem murinen allogenen Knochenmarkstransplantations-Modell gezeigt, in dem eine größere Anzahl an aktivierten T-Zellen im Vergleich zu frisch isolierten Zellen für die vergleichbare Induktion einer GVHD benötigt wurde (Contassot 1998). Es wurden bereits Beweise erbracht, dass der Expansionsprozess, d.h. die *ex vivo* Kultivierung *per se*, im Vergleich zu der Integration und der Expression des Transgens einen signifikanten Effekt auf die Funktion der T-Zellen *in vitro* und *in vivo* im Tiermodell zu haben scheint (Mavilio 1994, Cohen 1997, Ferrand 2000, Sauce 2002). In einer Studie von Duarte *et al.* (2002) wurde ein Vergleich bezüglich der Funktionalität primärer humaner T-Zellen: frisch isoliert, PHA-stimuliert und antiCD3/CD28 stimuliert durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die PHA-Stimulierung zu einer Reduktion der Alloreaktivität der T-Zellen gegenüber allogenen und spezifischen-viralen Antigenen führte, während antiCD3/CD28 stimulierte Zellen annähernd ihre normale Funktion beibehielten. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht geklärt, mit Sicherheit tragen jedoch die Veränderungen des CD4/CD8 Verhältnisses, die Expression verschiedener Aktivierungsmarker, wie CD25 und CD69, sowie das TCR- β V Repertoire nach Transduktion dazu bei (Duarte 2002). Der Vorteil der antiCD3/CD28 Aktivierung könnte darin liegen, dass diese Art der Stimulierung die Differenzierungsschritte und funktionellen Phänotypen, die durch eine Antigen-spezifische Aktivierung hervorgerufen werden, reproduziert. Sauce *et al.*

(2002) zeigten, dass die *ex vivo* Kultivierung *per se*, sowie deren Dauer einen limitierenden Effekt auf die anti EBV-Reaktivität der T-Zellen ausüben kann, dass aber der Effekt auf die Funktionalität in antiCD3/CD28 stimulierten T-Zellpopulationen deutlich geringer war, als bei anderen Aktivierungsstrategien (möglicherweise spielt der antiapoptotische Effekt des co-stimulatorischen Moleküls CD28 eine Rolle).

4.1.4.2 Der Transduktionsprozess *per se* beeinflusst die Alloreaktivität von T-Zellen gegenüber leukämischen Blasten nicht

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand die Analyse der Funktionalität der T-Zellen nicht im Vordergrund, sondern die eigentliche Entwicklung der Vektoren. Um jedoch eine Aussage hinsichtlich der Alloreaktivität gegenüber leukämischen Blasten (Patientenmaterial) treffen zu können, wurden die transduzierten und selektionierten T-Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten T-Zellen in einem durchflusszytometrischen Zytotoxizitätstest untersucht (3.7). Diese ersten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transduktionsprozess die Funktionalität der T-Zellen gegenüber leukämischen Blasten nicht negativ beeinflusst. Über Auswirkungen der *ex vivo* Kultivierungsdauer *per se* können zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussagen getroffen werden; weitere Analysen sind jedoch erforderlich, um detailliertere Informationen zu erhalten. Was Alloreaktivitätsanalysen von *ex vivo* kultivierten und transduzierten Zellen in Bezug auf antivirale Aktivität oder Alloreaktivität allgemein angeht, so gibt es bereits verschiedene Publikationen, die diesen Aspekt eingehender untersucht haben (Sauce 2002, Duarte 2002).

Der Aspekt der *ex vivo* Kultivierung ist jedoch im Hinblick auf eine adaptive Therapie mit hohen T-Zelldosen (1×10^8 Z/kgKG) zu bedenken. Der momentane Transduktions/Selektionsprozess würde auf alle Fälle eine exzessive *ex vivo* Expansion der Zellen erfordern, was mit einem Verlust der Funktionalität oder mit der Reduktion des T-Zellpools durch klonale Expansion bestimmter T-Zellen verbunden sein könnte. Die Optimierung der Transduktionseffizienz ist auf alle Fälle ein Aspekt, der weiter verfolgt werden muss: die Transduktion eines Großteils der Zellen würde zu einer verminderten Reduktion der Ausgangszellzahl durch die Selektion führen, so dass lediglich noch eine minimierte Expansion nötig wäre. Des weiteren muß über verbesserte bzw. veränderte Kultivierungsbedingungen nachgedacht werden, die in einer Reduktion der T-Zell-Veränderung resultieren würden, möglicherweise verbunden mit der Transduktion durch lentivirale Vektoren (4.1.4.3), die eine Verkürzung der *ex vivo* Proliferation dergestalt möglich machen, indem die Zellen erst nach dem Transduktions/Selektionsprozess zur Proliferation angeregt werden müssen.

Durchflusszytometrische Analysen von transduzierten Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen zeigten, dass sich das Verhältnis von CD4+/CD8+ Zellen aufgrund der

Transduktion, bzw. *ex vivo* Kultivierung leicht veränderte, indem der Anteil an CD8+ T-Zellen anstieg. Die Veränderung war jedoch nicht kontinuierlich in allen T-Zell Chargen zu detektieren und schien in Abhängigkeit von der Art der Stimulierung zu stehen. Die antiCD3/IL-2 Stimulierung führte im Gegensatz zu der antiCD3/CD28/IL-2 Aktivierung eher zu einer Verschiebung des CD4+/CD8+ Verhältnisses. Bei Maus-, bzw. Affen-T-Zellen war die Zunahme der CD8+ Zellen signifikant (persönliche Mitteilung G. Brandenburg, GSH, Frankfurt). Eine Auswirkung der Veränderung des CD4+/CD8+ Verhältnisses in einem *in vivo* Experiment ist nicht zu erwarten.

4.1.4.3 Lentivirale Vektoren zur Transduktion von T-Zellen: eine minimale Aktivierung der ruhenden Zellen ist ausreichend

Für den erfolgreichen gentherapeutischen Einsatz von T-Zellen hat die Erhaltung ihrer Funktionalität, im Sinne von Erkennung von - und Reaktion auf fremde (allo oder leukämische) Antigene, oberste Priorität. Der oncoretrovirale Transduktionsprozess erfordert neben der Aktivierung der T-Zellen auch die Stimulierung der Proliferation durch Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine, was zu einer Verminderung der T-Zell Funktionalität führen kann (Ferrand 2000, Sauce 2002 4.1.4.2). Der Infektionsmechanismus von Lentiviren erlaubt, im Gegensatz zu Oncoretroviren, einen Mitose-unabhängigen nukleären Import des Präintegrationskomplexes, so dass nicht-proliferierende Zellen infiziert werden können (Lewis 1992). In verschiedenen Studien wurde die Kapazität HIV-1 basierender Vektoren verschiedene nicht-proliferierende Zelltypen *in vitro* und *in vivo* zu transduzieren dargestellt (Vigna 2000). Frisch isolierte T-Zellen sind weder aktiviert, noch proliferieren sie, so dass die Verwendung von lentiviralen Vektoren eine potentielle Alternative zum oncoretroviralen Gentransfer bietet. Verschiedentlich wurde jedoch bereits gezeigt, dass T-Zellen, ähnlich wie verschiedene andere Zelltypen (so z. B. Monozyten), im nicht-aktivierten Zustand nicht effizient transduziert werden können (Dardalhon 2001). Im Vergleich zu dem Transduktionsprozess mit oncoretroviralen Vektoren reicht jedoch eine minimale Aktivierung der T-Zellen z. B. durch antiCD3 und antiCD28 Behandlung aus, um einen effizienten Gentransfer mit Hilfe von lentiviralen Vektoren zu erzielen (Korin 1998, Dardalhon 2001). Diese minimale Aktivierung könnte den Vorteil haben, dass zum einen der *Pool* an naiven T-Zellen, die die Fähigkeit haben neue Antigene zu erkennen, nur wenig verändert wird, indem keine „klonale Expansion“ bestimmter Zellen durch die Induktion der Proliferation austritt und zum anderen dass durch die minimale Aktivierung die Funktionalität der Zellen *per se* nicht verändert, bzw. vermindert wird. In einem anderen Ansatz wird verdeutlicht, dass durch Verwendung von IL-7, das den Zell-Zyklus Verlauf regulieren kann, die minimale Aktivierung von antiCD3/antiCD28 nicht notwendig ist, um die T-Zellen mit lentiviralen Vektoren zu transduzieren (Dardalhon 2001a).

Die Verwendung von lentiviralen Vektoren im Kontext der genetischen Veränderung von T-Zellen bietet eine vielversprechende Möglichkeit der ursprünglich isolierte Population an T-Zellen nur in geringem Maße in Bezug auf ihre Funktionalität und auch Zusammensetzung zu verändern, so dass über eine zukünftige Verwendung von lentiviralen Vektoren unbedingt nachgedacht werden sollte.

4.2 Weitere Möglichkeiten zur Eliminierung des GVHD-Risikos im Kontext einer DLI

Verschiedenste Ansätze werden zur Trennung von GVHD-Risiko und GVL-Effekt verfolgt: die späte Injektion von Spender T-Zellen (Kolb 1990, Johnson 1995), die Infusion von allogenen NK-Zellen (Zeis 1995, Zeis 1997) oder der selektive Transfer von T-Zell Untergruppen (Alyea 1998) sollen eine Verstärkung des GVL-Effekts erzielen, ohne eine GVHD zu induzieren. Die Unterscheidung von GVL und GVHD induzierenden T-Zell Untergruppen wurde bereits in verschiedenen präklinischen Modellen untersucht (Slavin 1990, Fowler 1996a, 1996b). Welche T-Zell Untergruppe für GVHD- oder GVL-Entwicklung verantwortlich ist, varriert von Modell zu Modell (Alyea 1998). Maus CD4⁺ und CD8⁺ Zellen kann man anhand ihres Zytokin-Sekretionsprofil in zwei Hauptuntergruppen unterteilen:

- *Th1 CD4⁺ und Tc1 CD8⁺ Zellen*, die primär IL-2 und IFN- γ sekretieren
- *Th2 CD4⁺ und Tc2 CD8⁺ Zellen*, die hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-10 sekretieren.

Es existieren kontroverse Daten, welche Zellen eine GVHD-Entwicklung begünstigen oder verhindern (Via 1993, Krenger 1995). In verschiedenen experimentellen Studien, die die Rolle von IL-2, TNF- α und IFN- γ in der Pathogenese der GVHD untersuchten, konnte gezeigt werden, dass Th1-induzierte inflammatorische Prozesse die Entwicklung einer aGVHD zu unterstützen scheinen (Via 1993, Mowat 1989). Ebenso wurde gezeigt, dass der Transfer allogener Th2-Typ CD4⁺ T-Zellen scheinbar ein geringes GVHD-induzierendes Potential birgt und eher eine GVHD protektive Aktivität ausübt (Fowler 1994). Die Daten einer aktuellen Maus-Studie zeigen, dass allogene CD4⁺ T-Zellen einen potenten antileukämischen Effekt ausüben: die Transfusion von Th1 polarisierten oder unmanipulierten CD4⁺ T-Zellen war mit der Entwicklung einer schweren GVHD verbunden, während die Transfusion hoher Zahlen an Th2 polarisierten CD4⁺ T-Zellen einen vielversprechenden GVL-Effekt auslöste, ohne einen parallelen Anstieg der GVHD-Mortalität (Zeis 2001). Weitere Ansätze, die die T-Zell spezifische T-Zell Rezeptor (TCR) Interaktion mit Wirts-MHC Molekülen durch Peptide (co-polymer-1 (GLAT) blockierten, resultierten in einer Reduktion der GVHD-Entwicklung (Blazar 1997).

Eine weitere Alternative könnte die Verwendung des photoaktiven Rhodamin-Derivats 4,5-Dibromorhodamin123 (TH9402), das selektiv in den Mitochondrien von aktivierten Zellen

verbleibt, bieten (Villeneuve 1999). Zellen, die TH9402 aufgenommen haben, werden nach Behandlung mit sichtbarem Licht (514 nm) durch die Oxidation der Mitochondrien eliminiert; der sogenannte Prozess des photodynamischen *purgings* (PDP). Zur Anwendung kam diese Technologie bereits um chronisch myeloische Leukämiezellen oder non-Hodgkin Lymphoma Zellen in autologen Knochenmarks-Transplantaten zu *purgen* (Vielleneuve 1999, Roy 2000). Der Ansatz für eine Trennung GVL-reaktiver von GVHD-reaktiven Zellen könnte folgendermaßen aussehen: TH9402 diffundiert sowohl in ruhende, als auch in teilende Zellen. Die ruhenden Zellen schleusen den Farbstoff aktiv über den *multidrug* Transporter (P-gp170, Mdr-1) aus, während in den aktivierten Zellen der Farbstoff aufgrund der Inaktivierung des P-gp170 Transporters verbleibt (Fontaine 2001). In einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR), in der T-Zellen mit Wirts-Antigenen aktiviert werden, könnten durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht nur die Wirts-reaktiven, aktivierten Zellen eliminiert werden, während die Tumor Antigen-spezifischen und Fremd Antigen-spezifischen Zellen intakt blieben. In einer ersten Untersuchung wurde gezeigt, dass die so selektierten T-Zellen *ex vivo* durchaus noch reaktiv gegenüber Tumor-Antigenen und Fremd-Antigenen waren und dass sie *in vivo* im Vergleich zu nicht PDP-behandelten T-Zellen zu einem GVL-Effekt führten, ohne eine GVHD-Reaktion auszulösen (Chen 2002).

Die genetische Modifikation von T-Zellen mit einem Suizidgen zur kontrollierten Eliminierung der Zellen im Rahmen einer GVHD-Entwicklung ist die bisher am weitest fortgeschrittene Methode, die auch zum Teil bereits in klinischen Studien zum Einsatz kam.

4.3 Retroviral transduzierte T-Zellen im aktuellen Zeitgeschehen

T-Zell Infusionen mit gentechnisch modifizierten Zellen zählen zum einen zu dem übergeordneten Begriff der Zelltherapie, die dazu dient geschädigte Gewebe und „Systeme“ zu ersetzen, zu reparieren oder deren biologische Funktion zu unterstützen (Bordignon 1999). Durch die gentechnische Modifikation des Genoms der T-Zellen kann diese Art der Therapie jedoch auch im weiteren Sinne zu den gentherapeutischen Strategien gezählt werden. Diese sind dadurch charakterisiert, dass die Integration eines Gens in bestimmte Zielzellen zur Expression eines Produkts führen soll, welches wiederum einen krankheitsauslösenden Defekt ausgleicht. Ein Suizidgen ist in dem Sinne jedoch kein „heilendes“ Gen, sondern kodiert für einen Kontrollfaktor.

Die größte Limitierung in der Gentherapie ist nach wie vor der effiziente Gentransfer in die Zellen. Ein optimaler gentherapeutischer Vektor sollte folgenden Kriterien entsprechen:

- einfache Produktion
- dauerhafte Expression des *targets*
- immunologisch inert

- spezifisches Gewebe-*targeting*

(eine detaillierte Auflistung ist in folgendem Review zu finden, Somia 2000).

Neben den nicht-viralen Methoden, die in einer recht ineffizienten Gentransfer-Rate und lediglich transienter Expression des Transgens resultieren sind die viralen Vektoren die zumeist verwendeten Gentransfervehikel (1.6.1.1). Man unterscheidet integrierende (retrovirale, lentivirale und adeno-assoziierte) und nicht-integrierende (adenovirale) Vektoren voneinander. In einer der ersten gentherapeutischen Studien (OTC-Studie, University of Pennsylvania) wurden den Patienten eskalierende Dosen an *second-generation* adenoviralen Vektoren (deletiert in den Genen *E1* und *E4*), bis hin zu 6×10^{13} rekombinanten Partikeln mit dem funktionalen OTC-Gen, appliziert. Ein Patient starb in Folge der Therapie, während andere Patienten „geheilt“ wurden. Ob die Dosis der applizierten adenoviralen Partikel *per se* zu hoch war, oder die Kombination mit Patienten-spezifischen Voraussetzungen zu dem Todesfall führte ist nicht geklärt (Somia 2000). Im Gegensatz dazu wurden in einer anderen gentherapeutischen Studie erstmals deutliche Erfolge erzielt. X-SCID Patienten (*X-linked severe combined immunodeficiency*) haben einen Blockade der NK- und T-Zell Differenzierung, die auf eine Mutation in der Sequenz des χ C-Zytokin-Rezeptors, der die Untereinheit verschiedener IL-Rezeptoren bildet, zurückzuführen ist. Hämatopoetische Stammzellen von Patienten wurden *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor, der für das χ C-Zytokin-Rezeptorgen kodierte, transduziert und den Patienten reinfundiert (Cavazzana-Calvo 2000). Bereits nach zehn Monaten wurden T- und NK-Zell Zahlen detektiert, die denen von gesunden, altersgleichen Personen entsprachen. Unglücklicherweise entwickelte einer der 10 behandelten Patienten (Patient Nr. 4) eine Leukämie (Marshall 2002). Aufgrund dieses Vorfalls wurden weiterführende Analysen des Patienten durchgeführt, um einen eventuellen Zusammenhang des gentherapeutischen Ansatzes und der Leukämieentwicklung herzustellen. In diesem speziellen Fall spielen scheinbar mehrere Faktoren eine Rolle:

- Prädisposition für die leukämische Erkrankung
- *Varizella zoster* Virus Infektion.

In Folge der Infektion mit dem *Varizella zoster* Virus wurde eine signifikant erhöhte Zahl der $\chi\delta$ T-Zell Untergruppe detektiert. Molekularbiologische Analysen zeigten, dass es sich dabei um *einen* T-Zellklon handelte, in dem der retrovirale Provirus in die kodierende Region des *LMO2* Gens, das in pädiatrischen ALL-Formen überexprimiert ist, integriert war. Momentan ist nicht geklärt, ob die Integration des Provirus in das *LMO2* Gen *per se* tatsächlich einziger auslösender Faktor der Leukämie-Entwicklung war, oder ob es sich um das Zusammenspiel mehrerer „negativer Faktoren“ handelt. Richtungsweisend für gentherapeutische Ansätze bzw. Gentransferansätze mit integrierenden Vektoren ist jedoch die Tatsache, dass die bisherige Annahme einer „zufälligen“ Integration von retroviralen (bzw. integrierenden) Vektoren in Frage gestellt werden muss. Bisher galt als Paradigma, dass $2,2 \times 10^7$ Integrationen nötig sind,

um einen mutagenen Vorgang auszulösen (Stocking 1993). Neuere Untersuchungen sowohl mit HIV-basierenden Vektoren als auch mit oncoretroviralen Vektoren zeigten, dass vermeintliche „*hot spots*“ in aktiv transkribierten Genen für die Integration der Vektoren existieren (Schröder 2002, Laufs 2002). Möglicherweise ist die potentielle Gefahr einer Insertionsmutagenese durch die Integration des proviralen Vektorgenoms bisher unterschätzt worden. Weiterführende Analysen sind ebenso erforderlich wie Ansätze zur gezielten Integration des retroviralen Vektors.

Bisher wurden keine malignen Neuerkrankungen im Kontext einer DLI mit gentechnisch transduzierten T-Zellen festgestellt. Eine Gefahr besteht jedoch auch in diesem Kontext: eine Insertionsmutagenese des retroviralen Suizidvektors könnte zu der Entwicklung einer T-Zell Leukämie führen. In einem solchen Fall würde die Existenz des Suizidgens von Nutzen sein. Die „Aktivierung“ des Suizidelements könnte eine rasche und spezifische Eliminierung der aberrant proliferierenden Zellen ermöglichen, vorausgesetzt, durch die Mutation ist nicht ein Protein betroffen, das an dem Apoptosesignaltransduktionsweg beteiligt ist. Integrationsanalysen der retroviralen Vektoren im Zielzellgenom sollten auf alle Fälle zukünftig vermehrt durchgeführt werden, um eine Risiko/Nutzen-Abwägung treffen zu können. Zusätzlich sollten jedoch auch Untersuchungen vorangetrieben werden, die eine spezifische Integration des Gentransfervektors in eine nicht-codierende Region des Zielzellgenoms möglich machen, so dass es zu keiner Insertionsmutagenese mit einer folgenden neoplastischen Entwicklung kommen kann.

Im Rahmen der Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen wurden in den letzten Jahren durch die Einführung der Gentherapie deutliche Fortschritte erzielt (X-SCID, verschiedene Krebsarten, Hämophilie, u.a.). Auf dem Gebiet der Leukämieerkrankungen wurde unter anderem gezeigt, dass eine zusätzliche Infusion von Spender T-Zellen einen therapeutischen Effekt haben kann, der durch die Entwicklung einer mehr oder minder schweren GVHD limitiert ist. Die Transduktion von T-Zellen mit Suizidgenen stellt eine effiziente Kombination der beiden Ansätze dar und ermöglicht zum einen eine sicherere DLI und zum anderen den Einsatz höherer möglicherweise therapeutisch wirksamerer Zelldosen, indem die Entwicklung einer GVHD durch Aktivierung des Suizidgens kontrolliert werden kann.

5. Zusammenfassung

Für viele pädiatrische Patienten mit Leukämie ist die Durchführung einer Hoch-Dosis-Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation oft die einzige Möglichkeit die Heilungsrate zu verbessern. Die Eliminierung der residualen leukämischen Blasten basiert einerseits auf der Konditionierung mit hoch-aggressiver Chemotherapie. Andererseits ist sie auf immunologische Reaktionen zwischen immunkompetenten Zellen, die entweder in dem Transplantat enthalten sind, oder aus diesem neu entstehen und den verbliebenen leukämischen Blasten zurückzuführen. Diese immunologische Interaktion wird auch als Graft-versus-Leukämie-Reaktion (GVL) bezeichnet und hauptsächlich von T- und NK-Zellen vermittelt. Trotz zunächst erfolgreicher allogener Transplantation erleidet ein beträchtlicher Anteil der Patienten ein Rezidiv. Während ein offenes Rezidiv oft nicht mehr behandelbar ist, können Patienten mit drohendem Rezidiv oder minimaler Resterkrankung (MRD) durch Infusion immunkompetenter Zellen des Spenders, sogenannte Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI), teilweise erfolgreich behandelt werden. Die Behandlung mit DLI ist limitiert durch die Graft-versus-host-disease (GVHD), eine mit zum Teil schweren Komplikationen verbundene Reaktion, die potentiell tödlich verlaufen kann. Die gentechnische Veränderung der alloreaktiven Zellen mit einem Suizidgen ermöglicht eine kontrollierte, spezifische Eliminierung dieser Zellen im Falle einer GVHD Entwicklung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene retrovirale Selektions/Suizid-Fusionsvektoren für die Transduktion von Spender T-Zellen im Kontext einer DLI entwickelt. Beide Selektions/Suizid-Fusionselemente wurden in einem für die Transduktion in T-Zellen optimierten retroviralen Vektor generiert. Die Selektionsmarker waren so gewählt, dass eine Anreicherung der Transgen-positiven Zellen über eine immunomagnetische Selektion möglich war. Ein Vektor kodierte für ein Fusionsmolekül aus dem zytoplasmatisch trunkeierten humanen CD34-Oberflächenmarker (tCD34) und der Zellzyklus-abhängigen GCV-hypersensitiven HSV-tk39 (Herpes-simplex Virus I Thymidin Kinase) Mutante. Durch GCV-Applikation konnte in den transduzierten, tCD34/HSV-tk39 exprimierenden Zellen spezifisch die Apoptose induziert werden. Der zweite Vektor wurde so konstruiert, dass ein Fusionsprotein aus dem humanen Δ LNGFR-Oberflächenmarker und der Zellzyklus-unabhängigen *death-effector-domain* (DED) des humanen FADD (*Fas-associated-protein with death domain*) Moleküls entstand. Über zwei zwischengeschaltete FKBP (*FK506-binding protein*) Domänen wurden die beiden Elemente miteinander fusioniert. In Δ LNGFR/Fv/Fv/DED-exprimierenden Zellen konnte die Apoptose durch die Applikation eines spezifisch an die beiden FKBP-Domänen bindenden synthetischen Substrats (AP20187), das die Dimerisierung des DED-Moleküls induzierte, ausgelöst werden. Durchflusszytometrische Analysen von transduzierten und selektierten humanen primären T-Zellen zeigten, dass beide Fusions-Transgene korrekt in den Zielzellen exprimiert wurden. Die spezifische Induktion der Apoptose durch Aktivierung des jeweiligen Suizidmoleküls wurde in

Funktionalitätstestungen nachgewiesen. Beide Fusionsmoleküle vermittelten eine effiziente Eliminierung der transduzierten Zellen (90 %-98 %). In vergleichenden Analysen wurde gezeigt, dass die beiden Suizidmechanismen einer unterschiedlichen Kinetik unterlagen. Während die DED-induzierte Apoptose sehr schnell auf die Applikation des Suizidaktivators folgte, vermittelte der HSV-tk39 Mechanismus eine deutlich langsamere aber etwas effizientere Eliminierung der Zellen. Erste Untersuchungen einer Kombination beider Fusionsmoleküle deuten auf einen additiven/synergistischen Effekt hin, der zu einer schnellen und effizienten Eliminierung der Zellen führt (≥ 99 %).

Zur Zeit stellt die Strategie der Suizidgen-transduzierten T-Zellen die am vielversprechendste Methode zur Kontrolle einer GVHD-Reaktion dar. Die hier entwickelten Vektoren ermöglichen eine effiziente, kontrollierte Eliminierung der Zellen und bieten Potential zur Weiterentwicklung einer optimierten Strategie.

6. Literaturverzeichnis

Aiuti A, Slavin A, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucci 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

Alyea EP, Soiffer RJ, Canning C, Neuberg D, Schlossman R, Pickett C, Collins H, Wang Y, Anderson KC, Ritz J (1998). Toxicity and efficacy of defined doses of CD4+ donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplantant. *Blood*; **91**: 3671

Amara JF, Clackson T, Rivera VM, Guo T, Keenan T, Natesan S, Pollock R, Yang W, Courage NL, Holt DA, Gilman M (1997). A versatile synthetic dimerizer for the regulation of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad Sci USA*; **94**: 10618-10623.

Amara JF, Courage NL, Gilman M (1999). Cell surface tagging and a suicide mechanism in a single chimeric human protein. *Hum Gene Ther*; **10**: 2651-2655

Anafi M, Gazit A, Zehavi A, Ben-Neriah Y, Levitzki A (1993). Tyrphostin induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase induces K562 to differentiate. *Blood*; **82**: 3524

Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, Can Bakkum DW, Gluckman E, Good RA, Jacobsen N, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O *et al.* (1990). Risk factors for chronic graft-versus-host-disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*; **75**: 2459-2464

Ayuk FA, Zander AR, Fehse B (2001). T lymphocytes as targets of gene transfer with moloney type retroviral vectors. *Curr Gene Ther*; **1**: 325-337

Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D, Beck JF (1999). Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias in MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerisms: a single center experience of 12 children. *Leukemia*; **13**: 2079-2086

Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, Stewart CG, Handgretinger R, Beck JF, Klingebiel T (2002). Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor of posttransplant outcome in children with ALL. *Leukemia*; **16**: 1668-1672

Barnes DW, Loutit JF (2001). Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow: II. 1957 *J Hematother Stem Cell Res*; **10**: 325-334

Baum C, Hegewisch –Becker S, Eckert HG, Stocking C, Ostertag W (1995). Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) in early hematopoietic cells. *J. Virol*; **69**: 7541-7547

Beck JF, Klingebiel T, Kreyenberg H, Schaudt A, Wölle W, Niethammer D, Bader P. (2002). Relapse of childhood ALL, AML, and MDS after allogeneic stem cell transplantation can be prevented by donor lymphocyte infusion in a critical stage of increasing mixed chimerism. *Klinische Päd.*; **214**: 201-205

Beelen DW, Ottinger HD, Elmaagacli A, Scheulen B, Basu O, Kremens B, Havers W, Grosse-Wilde H, Schaefer UW (1997). Transplantation of filgrastim-mobilized peripheral blood stem cells from HLA-identical sibling or alternative family donors in patients with hematologic malignancies: a prospective comparison on clinical outcome, immune reconstitution, and hematopoietic chimerism. *Blood*; **90**: 4725-4735

Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Meyer E, Eckert W, Debatin KM (1999). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; **96**: 8699-8704

Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Uckert W, Debatin KM (2000). Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Res.*; **60**: 3212-3217

Beltinger C, Uckert W, Debatin KM (2001). Suicide gene therapy for pediatric tumors. *J. Mol Med*; **78**: 598-612

Bishop JM (1987). Misguided cells: the genesis of human cancer. *Biol Bull*; **186**: 1-8

Bishop JM. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*; **64**: 235-248

Black ME, Newcomb TG, Wilson HM, Loeb LA (1996) Creation of drug specific herpes simplex virus type-1 thymidine kinase mutants for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3525-3529

Black ME, Kokoris MS, Sabo P (2001) Herpes simplex virus-1 thymidine kinase mutants created by semi-random sequence mutagenesis improve prodrug-mediated tumor cell killing. *Canc. Res.* **61**: 3022-3026.

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerisi M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, *et al.* (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*; **270**: 475-480.

Blazar BR, Korngold R, Valleria DA (1997). Recent advances in graft-versus-host disease prevention. *Immunol Rev.*; **157**: 79-109

Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggierei L, Ponzoni M, Rossigni S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* **276**: 1719-1723

Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Castrati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, *et al.* (1995): Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science*; **270**: 470-475.

Bordignon C, Bonini C, Verzeletti S, Nobili N, Maggioni D, Traversari C, Gievazzi R, Servida P, Zappone E, Benazzi E *et al.* (1995A) Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for in vivo modulation of donor anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum. Gene Ther.* **6**: 813-819

Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, DeVincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, Tura S (1999). Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica*; **84**: 1110-1149

- Borgmann A, Baumgarten E, Schmid H, Dopfer R, Ebell W, Gobel U, Niethammer D, Gadner H, Henze G (1997). Allogeneic bone marrow transplantation for a subset of children with acute lymphoblastic leukemia in third remission: a conceivable alternative. *Bone Marrow Transplant*; **20**: 939-944
- Brown J, Greaves MF, Molgaard HV (1991). The gene encoding the stem cell antigen CD34 is conserved in mouse and expressed in hematopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int. Immunol.* **3**: 175-184
- Bunnell BA, Muul LM, Donahue RE, Blaese RM, Morgan RA (1995). High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **92**: 7739-7743.
- Burmeister T, Thiel E (2001). Molecular genetics in acute and chronic leukemias. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*; **127**: 80-90
- Carlens S, Ringden O, Remberger M, Lonnqvist B, Hagglund H, Klaesson S, Mattsson J, Svahn BM, Winiarski J, Ljungman P, Aschan J (1998). Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant*; **22**: 755-761
- Carlens S, Remberger M, Aschan J, Ringden O (2001). The role of disease stage in response to donor lymphocyte infusions as treatment for leukemic relapse. *Biol Blood Marrow Transplant*; **7**: 31-38
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, LeDeist F, Fischer A (2000). Gene Therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*; **288**: 669-671
- Cavazzana-Calvo M, Andre-Schmutz I, Hacein-Bey-Abina S, Bensoussan D, Le Deist F, Fischer A (2002). Improving immune reconstitution while preserving graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation. *Semin Hematol*; **39**: 32-40
- Chalmers D, Ferrand C, Apperley JF, Melo JV, Ebeling S, Newton I, Duperrier A, Hagenbeek A, Garrett E, Tiberghien P, Garin M (2001). Elimination of the truncated message from the herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene. *Mol Ther*; **2**: 146-148
- Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ (2002). Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood*; **99**: 3083-3088
- Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA (1996). Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood* **87**: 479-490
- Ciceri F *et al.* (2001). Reinfusion of HSV-TK engineered donor lymphocytes after haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation provide early immune reconstitution without GVHD. *Blood*; **98**: 779a
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* **133**: 157-165

Civin CI, Banquerigo ML, Strass LC, Loken MR (1987). Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10 positive progenitor cells in normal human marrow. *Exp. Hematol.*; **15**: 10-17

Clackson T, Yang W, Rozamus LW, Hatada M, Amara JF, Rollins CT, Stevenson LF, Magari SR, Wood SA, Courage NL, Lu X, Cerasoli F Jr, Gilman M, Holt DA (1998). Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10437-10442

Cohen JL, Boyer O, Salomon B, Onclercq R, Charlotte F, Bruel S, Boissere G, Klatzmann D (1997). Prevention of graft-versus-host disease in mice using a suicide gene expressed in T lymphocytes. *Blood*; **89**: 4636-4645

Cohen JL, Boyer O, Thomas-Vaslin V, Klatzmann D (1999) Suicide gene mediated modulation of graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma*; **34**: 473-480

Coffin JM in Fields *et al.* (1996). Virology Volume 2. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA:1767-1847

Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL *et al.* (1997). Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.*; **15**: 433-444

Comoli P, Dilloo D, Hutchings M, Hoffman T, Heslop HE (1996). Measuring gene transfer efficiency. *Nat. Med.*; **2**: 1280-1281

Contassot E, Murphy W, Angonin R, Pavy JJ, Bittencourt MC, Robinet E, Reynolds CW, Cahn JY, Herve P, Tiberghien P (1998). In vivo alloreactive Potential of ex vivo expanded primary T lymphocytes. *Transplant*; **65**: 1365-1370

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991) Use of aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assay in culture. *Cancer Commun.* **3**: 207.

Dardalhon V, Noraz N, Pollok K, Rebouissou C, Boyer M, Bakker AQ, Spits H, Taylor N (1999). Green fluorescent protein as a selectable marker of fibronectin-facilitated retroviral gene transfer in primary human T lymphocytes. *Hum Gene Ther.* **10**: 5-14

Dardalhon V, Jaleco S, Reboussiou C *et al.* (2000). Highly efficient gene transfer in naive human T cells with a murine leukemia virus-based vector. *Blood*; **96**: 885-893

Dardalhon V, Jaleco S, Kinet S, *et al.* (2001a) Interleukin-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; **98**: 9277-9282

Dardalhon V, Herpers B, Noraz N *et al.* (2001) Lentivirus mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap. *Gene Ther.*; **8**: 190-198

Degreve B, Johansson M, De Clercq E, Karlsson A, Balzarini J (1998). Differential intracellular compartmentalization of herpetic thymidine kinase (TKs) in TK gene-transfected tumor cells : molecular characterization of the nuclear localization signal of herpes simplex virus type 1 TK. *J Virol*; **72**: 9535-9543

Degreve B, Esnouf R, De Clercq E, Balzarini J (1999). Characterization of multiple nuclear localization signals in herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Biochem Biophys Res Commun*; **264**: 338-342

- Dey B, Yang YG, Szot GL, Pearson DA, Sykes M (1998). IL-12 inhibits GVHD through a Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T cell activation and expansion. *Blood*; **91**: 3315-3322
- Di Ianni M, Terenzi A, Falzetti F, Bartoli A, DiFlorio S, Benedetti R, Venditti G, Alfonsi D, Deloanni M, Falini B, Tabilio A (2002). Homing and survival of thymidine kinase-transduced human T cells in NOD/SCID mice. *Cancer Gene Ther*; **9**: 756-761
- Donello JE, Loeb JE, Hope TJ (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol*; **72**: 5085-5092
- Dopfer R, Henze G, Bender-Gotze C, Ebell W, Ehninger G, Friedrich W, Gadner H, Klingebiel T, Peters C, Riehm H *et al.* (1991). Allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission after intensive primary and relapse therapy according to BFM- and CoALL-protocols: results of the German Cooperative Study. *Blood*; **78**: 2780-2784
- Douglas J, Kelly P, Evans JT, Garcia JV (1999). Efficient transduction of human lymphocytes and CD34+ cells via human immunodeficiency virus-based gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*; **10**: 935-945
- Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, Jacobs S, Suttorp M, Loffler H, Muller-Ruchholtz W, Schmitz N (1994). G-CSF mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft. *Br. J. Haematol*; **87**: 609-613
- Dreger P and Schmitz N (2001). Allogeneic transplantation of blood stem cells: Coming of age? *Ann. Hematol*; **80**: 127-136
- Drobyski WR (2000). Evolving strategies to address adverse transplant outcomes associated with T cell depletion. *J Hematother Stem Cell Res*; **9**: 327-337
- Duarte RF, Chen FE, Lowdell MW, Potter MN, Lamana ML, Prentice HG, Madrigal JA (2002). Functional impairment of human T-lymphocytes following PHA-induced expansion and retroviral transduction: implications for gene therapy. *Gene Therapy*; **9**: 1359-1368
- Ellison CA, Fischer JM, HayGlass KT, Gartner JG (1998). Murine graft-versus-host disease in an F1-hybrid model using IFN- γ gene knock-out donor. *J. Immunol*; **161**: 631-640
- Elmaagacil AH *et al.*, (1999). The risk of residual molecular and cytogenetic disease in patients with philadelphia-chromosome positive first chronic phase chronic myelogenous leukemia is reduced after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells compared with bone marrow. *Blood*; **94**: 384-389
- Epstein MA, Achong B (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts of Burkitt's lymphoma. *Lancet*; **1**: 702-703
- Evan GI and Vousden KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*; **411**: 342-348
- Eyrich M, Lang P, Lal S, Bader P, Handgretinger R, Klingebiel T, Niethammer D, Schlegel P (2001). A prospective analysis of immune reconstitution following transplantation of positively selected human leukocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol*; **11**: 422-432

- Faber S. *et al.* (1948). Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-Aminopteroyl-glutamic acid (Aminopterin). *New Engl. J. Med*; **238**: 787
- Fackler MJ, Krause DS, Smith OM, Civin CI, May WS (1995). Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood*; **85**: 3040-3047.
- Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z (1998). Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*; **91**: 3995-4019
- Fan L, Freeman KW, Khan T, Pham E, Spencer DM (1999). Improved artificial death switches based on caspases and FADD. *Hum. Gene Ther.* **10**: 2273-2285
- Fehse B, Uhde A, Fehse N, Eckert HG, Clausen J, Ruger R, Koch S, Ostertag W, Zander AR, Stockschlader M (1997). Selective immunoaffinity-based enrichment of CD34+ cells transduced with retroviral vectors containing an intracytoplasmically truncated version of the human low-affinity nerve growth factor receptor (deltaLNGFR) gene. *Hum Gene Ther*; **10**: 1815-1824
- Fehse B, Schade UM, Li Z, Uhde A, Koch S, Goller B, Ruger R, Fehse N, Stochschrader M, Zander AR (1998). Highly efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin. *Br. J. Haematol.* **102**: 566-574
- Fehse B, Richters A, Putimtseva-Scharf K, Klump H, Li Z, Ostertag W, Zander AR, Baum C (2000). CD34 splice-variant: an attractive selection of gene-modified cells. *Mol Ther*; **1**: 448-456
- Fehse B, Kustikova O, Li Z, Wahlers A, Beyer W, Chalmers D, Tiberghien P, Zander AR, Baum C (2002). A novel sort-suicide fusion gene vector for T cell manipulation. *Gene Ther.*, **9**: 1633-1638
- Feinstein E, Kimchi A, Wallace D, Boldin M, Varfolomeev E (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci*; **20**: 342-344
- Feinstein L, Sandmaier B, Maloney D, McSweeney PA, Maris M, Flowers C, Radich J, Little MT, Nash RA, Chauncey T, Woolfrey A, Georges GT, Kiem HP, Zaucha JM, Blume KG, Shizuru J, Niederwieser D, Storb R. (2001). Nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. Replacing high-dose cytotoxic therapy by the graft-versus-tumor effect. *Ann N Y Acad Sci*; **938**: 328-337.
- Ferrand C (2000). Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire. *Hum Gene Ther*; **11**: 1151-1164
- Ferrera JL and Deeg HJ (1991). Graft versus host disease. *N Engl J Med*; : 667-674
- Ferrera JLM *et al.* (1997). Graft-versus-host disease. New York: Marcell Decker
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*; **75**: 2417-2426
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA Driver SE Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; **391**
- Fliedner TM (1998). The role of blood stem cells in hematopoietic cell renewal. *Stem Cell*; **16** (Suppl.1): 13-29

- Fischer A, Hacein-Bey S, Cavazzana-Calvo M. (2002). Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*; **8**: 615-621
- Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C (2001) Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med*; **7**: 789-794
- Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE (1994). Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood*; **84**: 3540
- Fowler D, Beglio J, Nagel G, Eckhaus M, Gress R (1996a). Allospecific CD8. Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease. *J Immunol*; **157**: 4811
- Fowler D, Breglio J, Nagel G, Hirose C, Gress R (1996b). Allospecific CD4+ Th1/Th2 and CD8+ Tc1/Tc2 populations in murine GVL: Type I cells generate GVL and type II cells abrogate GVL. *Biol Blood Marrow Transplant*; **2**: 118
- Franz T, Hilberg F, Seliger B, Stocjng C, Ostertag W (1986). Retroviral mutants efficiently expressed in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3292-3296.
- Garin M, Garrett E, Tiberghien P, Apperley JF, Chalmers D, Melo JV, Ferrand C (2001). Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood*; **97**: 122-129
- Glass B, Majolino I, Dreger P, Scime R, Santoro A, Vasta S, Suttorp M, Haferlach T, Schmitz N (1997). Allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation in a murine model: evidence for an improved graft-versus-leukemia effect. *Blood*; **90**: 1694-1700
- Gootenberg JE, Ruscetti FW, Mier JW, Gazdar A, Gallo RC (1981). Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. *J. Exp. Med.* **154**: 1403-1418.
- 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** :59-72.
- Greaves MF (1996). Infant leukemia biology, aetiology and treatment. *Leukemia*; **10**: 372-377
- Groce CM *et al.* (1987). Role of chromosomal translocation in human neoplasia. *Cell*; **49**: 155
- Hanahan D and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57
- Hamann A and Rebstock S (1993). Migration of activated lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*; **184**: 109-124
- Handgretinger R, Lang P, Schumm M, Taylor G, Neu S, Koscielniak E, Niethammer D, Klingebiel T (1998). Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+ progenitor cells highly purified by magnetic-activated cell sorting. *Bone Marrow Transplant*; **21**: 987-993
- Handgretinger R, Lang P, Ihm K, Schumm M, Geiselhart A, Koscielniak E, Hero B, Klingebiel T, Niethammer D (2002). Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34+ progenitor cells ; purging efficiency, hematopoietic reconstitution and long-term outcome in children with high risk neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant*; **29**: 731-736

- 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.
- Harada M, Nagafuji k, Fujisaki T, Kubota A, Mizuno S, Takenaka K, Miyamoto T, Ohno Y, Gondo H, Kurpiwa M, Okamura T, Inaba S, Niho Y (1996). G-CSF induced mobilization of peripheral blood stem cells from healthy adults for allogeneic transplantation. *J. Hematother*; **5**: 63-71
- Hasenburg A, Tong XW, Rojas-Martinez A, Nyberg-Hoffman C, Kieback CC, Kaplan AL, Kaufman RH, Ramyz I, Aguilar-Cordova E, Kieback DG (1999). Thymidine kinase (TK) gene therapy of solid tumors: valacyclovir facilitates outpatient treatment. *Anticancer Res*; **19**: 2163-2165
- Havenga M, Hoogerbrugge P, Valerio D, vanEs HH (1997). Retroviral stem cell gene therapy. *Stem Cells*; **15**: 162-179
- Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T (1995). The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 12240-12244
- Hildinger M, Abel KI, Ostertag W, Baum C (1999). Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol*; **73**: 4083-4089
- Hoffbrand AV *et al.* (1997). Roche Grundkurs Hämatologie, Ex Libris Roche, Band 5, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin-Wien
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*; **75**: 555-562
- Howard BD, Kalthoff H, Fong TC (1999). Ablation of tumor cells in vivo by direct injection of HSV-thymidine kinase retroviral vector and ganciclovir therapy. *Ann Y Acad Sci*; **880**: 352-365
- Huang ZM and Yen TS (1995). Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol*; **7**: 3864-3869
- Johnson BD, Truitt RL (1995). Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance and allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease. *Blood*; **85**: 3302
- Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF (1985). Identification of a membrane glycoprotein associated with hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Res*; **9**: 191-198
- Kersey J (1997). Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukaemia. *Blood*; **90**: 4243-4251
- Kinsella TM and Nolan GP (1996). Episomal vectors rapidly and stable produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum. Gene Ther.* ; **7**: 1405-1413.
- Klimatcheva E, Rosenblatt JD, Planelles V (1999). Lentiviral vectors and gene therapy. *Frontiers in Biosciences* **4**, **June**1: d481-496

Koehl U, Zimmermann S, Esser R, Soerensen J, Grüttner HP, Duchscherer M, Seifried E, Klingebiel T, Schwabe D (2002). Autologous transplantation of CD133 selected hematopoietic progenitor cells in a pediatric patient with relapsed leukemia. *Bone Marrow Transplant*; **29**: 927-930

Koehl U, Beck O, Esser R, Seifried E, Klingebiel T, Schwabe D, Seidl C (2002a). Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: The Frankfurt experience. *Leukemia, im Druck*

Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim N, Wilmanns W (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukaemia in marrow transplant patients. *Blood*; **76**: 2462-2465

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobson N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, Rhee FV, Mittermüller J, Witte TD, Holler E, Ansari H (1995). Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*; **86**: 2041

Körbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giralt S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB *et al.* (1995). Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukaemia and lymphoma: Potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood*; **85**: 1655-1658

Körbling M, Fliedner TM (1996). The evolution of clinical peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*; **17**: 4-11

Korin YD and Zack JA (1998). Progression of the G1b phase of the cellcycle is required for completion of juman immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol*; **72**: 3161-3168

Korkoris MS, Sabo P, Adman ET, Black ME (1999). Enhancement of tumor ablation by a selected HSV-1 thymidine kinase mutant. *Gene Therapy*; **6**: 1415-1426

Kotani H, Newton PB 3rd, Zhang S, Chiang YL, Otto E, Weaver L, Blese RM, Anderson WF, McGarrity GJ (1994). Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*; **5**: 19-28.

Krenger W, Snyder KM, Byon JCH, Falzarano G, Ferrara JLM (1995). Polarized type 2 alloreactive CD4+ and CD8+ donor T cells fail to induce experimental acute graft versus-host disease. *J. Immunol*; **155**: 585

Krenger W, Hill GR, Ferrara JL (1997). Cytokine cascades in acute graft-versus –host disease. *Transplantation*; **64**: 553-558

Kühlcke K, Fehse B, Schilz A, Loges S, Lindemann C, Ayuk F, Lehmann F, Stute F, Fauser AA, Zander AR, Eckert HG (2002). Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Molecular Therapy*; **5**: 473-478

Lamana M, Segovia JC, Guenechea G, Bueren JA (2001). Systematic analysis fo clinically applicable conditions leading to a high efficiency of transductionand transgene expression in human T cells. *J. Gene Med.* **3**: 32-41.

- Lang P, Schumm M, Taylor G, Klingebiel T, Neu S, Geiselhart A, Kuci S, Niethammer D, Handgretinger R (1999). Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+ progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. *Bone Marrow Transplant*; **24**: 583-589.
- Laufs S, Gentner B, Nagy KZ, Jauch A, Benner A, Naundorf S, Kuehlcke K, Schiedlmeier B, Ho AD, Zeller WJ, Fruehauf S (2002). Retroviral vector integration occurs into preferred genomic targets of human bone marrow repopulating cells. *Blood*; prepublished in november
- Lewis P, Hensel M, Emerman M (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J*; **11**:3053-3058
- Li Z, Fehse B, Schiedlmeier B, Dullmann J, Frank O, Zander AR, Ostertag W, Baum C (2002) Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296**: 497
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibáñez C (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J*; **16**: 4999-5005
- Link CJ Jr, Burt RK, Traynor AF, Drobyski WR, Seregina T, Levy JP, Gordon L, Rosen ST, Burns WH, Camitta B, Caspar J, *et al.* (1998). Adoptive immunotherapy for leukemia : donor lymphocytes transduced with the herpes-si-plex thymidine kinase gene for remission induction. *Hum. Gene Ther.*; **9**: 115-134
- Link CJ, Seregina T, Traynor A, Burt RK (2000) Cellular suicide therapy for malignant disease. *Stem Cells*; **18**: 220-226
- Litvinova E, Maury S, Boyer O, Bruel S, Benard L, Boisserie G, Klatzmann D, Cohen JL (2002). Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease. *Blood*; **100**: 2020-2025
- Look AT (1997). Oncogenic transcription factor in human acute leukemias. *Science*; **278**: 1059-1064
- Lyons RM, Forry-Schaudies S, Otto E, Wey C, Patil-Koota V, Kaloss M, McGarrity GJ, Chiang YL (1995). An improved retroviral vector encoding the herpes simplex virus thymidine kinase gene increases anti-tumour efficacy in vivo. *Cancer Gene Ther.* **2**: 273-280
- MacCorkle RA, Freeman KW, Spencer DMI (1998). Synthetic activation of caspases: artificial death switches. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*; **95**: 3655-3660
- Majka M, Ratajczak J, Lee B, Honczarenko M, Douglas R, Kowalska MA, Silberstein L, Gewirtz AM, Ratajczak MZ (2000). Expression, regulation and function of AC133, a putative cell surface marker of primitive human hematopoietic cells. *Folia Histochem Cytobiol.*; **38**: 53-63
- Marshall E (2002). Gene Therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science*; **298**: 34-35.
- Martinez-Climent JA (1997). Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia*; **11**: 1999-2021
- Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M (1965). Adoptive immunotherapy of acute leukaemia: experimental and clinical results. *Cancer Res.*; **25**:1525-1531

- Maurice M, Verhoyen E, Salmon P, Trono D, Russell J, Cosset L (2002). Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood*; **99**: 2342-2350
- Mavilio F, Ferrari G, Rossigni S, Nobili N, Bovini C, Castrati G, Traversari C, Bordignon C (1994) Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood*; **83**: 1988-1997
- Mavilio F (1997). Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector mediated gene transfer. *Blood*; **83**: 1988-1997
- McCormick F (2001). Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nature Review* **1**: 130-141
- McFall RC, Sery TW, Makadon M (1977). Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res.* **37**: 1003-1010
- Meakin SO and Shooter EM (1992). The nerve growth factor family of receptors. *Trends in Neurosciences*; **15**: 323-331
- Medin JA und Larlsson S (1997). Viral vectors for gene therapy of hematopoietic cells. *Immunotechnology*; **3**:3-19
- Meijer E, Slaper-Cortenbach IC, Thijsen SF, Dekker AW, Verdonck LF (2002). Increased incidence of EBV-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic stem cell transplantation from matched unrelated donors due to a change of T cell depletion technique. *Bone Marrow Transplant*; **29**: 335-339
- Mikala G, Xie J, Berencsi G, Kiss C, Marton I, Domjan G, Valyi-Nagy I (1999). Human herpesvirus 8 in hematologic diseases. *Pathol Oncol Res*; **5**: 73-79
- Miller DG, Adam MA, Miller AD (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol.*; **10**:4239-4242.
- Miller AD, Garcia V, Suhr N, Carmel ML, Wilson C, Eiden MV (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukaemia virus. *J. Virol.*; **65**: 2220-2224
- Miller AD (1992). Retroviral vectors. *Curr.Top Microbiol. Immunol*; **158**: 1-24
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Golden JT, Bray RA, Walzer EK, Buck DW (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*; **90**:5013-5021
- Moolten FL, Wells JM (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.*; **46**: 5276-5281.
- Moritz T, Patel VP, Williams DA (1994). Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. *J. Clin. Invest.*; **93**: 1451-1457.
- Movassagh M, Desmyter C, Baillou C, Chapel-Fernandes S, Guigon M, Klatzmann D, Lemoine FM (1998). High level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors and an improved clinically applicable protocol. *Hum Gene Ther*; **9**: 225-234

Movassagh M, Boyer O, Burland MC, Leclercq V, Klatzmann D, Lemoine FM (2000). Retrovirus-mediated gene transfer into T cells: 95% transduction efficiency without further in vitro selection. *Hum. Gene Ther.*; **11**: 1189-1200.

Mowat A (1989). Antibodies to IFN-gamma prevent immunological mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reactions. *Immunology*; **68**: 18

Mulligan RC (1993). The basic science of gene therapy. *Science*; **260**: 926-932

Murphy WJ, Welniak LA, Taub DD, Wiltout RH, Taylor PA, Valleria DA, Kopf M, Young H, Longo DL, Blazar BR (1998). Differential effects of the absence of interferon- γ and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J. Clin. Invest*; **102**: 1742-1748

Murphy WJ, Blazar BR (1999). New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Curr. Opin Immun.*; **11**: 509-515

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Thang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996). Flice, a novel FADD homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**: 817-827

Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumour cell populations. *Science*; **194**: 23-28

Olive C, Cheung C, Falk MC (1998). T cell engraftment in lymphoid tissues of human peripheral blood lymphocyte reconstituted SCID mice with or without prior activation of cells. *Immunol Cell Biol*; **6**: 520-525

Onodera M, Nelson DM, Yachie A, Jagadeesh GJ, Bunnell BA, Morgan RA, Blaese RM (1998). Development of improved adenosine deaminase retroviral vectors. *J. Virol.*; **72**: 1769-1774

Packer RJ, Raffel C, Villablanca JG, Tonn JC, Burdach SE, Burger K, LaFond D, McComb JG, Cogen PH, Vezina G, Kapcala LP (2000). Treatment of progressive or recurrent pediatric malignant supratentorial brain tumors with herpes simplex virus thymidine kinase gene vector producer cells followed by intravenous ganciclovir administration. *J. Neurosurg.*; **92**: 249-254

Parkman R. (1998). Chronic graft-versus host disease. *Curr Opin Hematol*; **5**: 22-25

Pawluik R., Kay R., Lansdorp P., Humphries R.K. (1994). Selection of retrovirally transduced hematopoietic cells using CD24 as a marker of gene transfer. *Blood*; **84**: 2868-2877

Pollok KE, Hanenberg H, Nobilit TW, Scj 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

Pui CH, Kane JR, Crist WM (1995). Biology and treatment of infant leukemia. *Leukemia*; **9**: 762-769

Qasim W, Thrasher AJ, Buddle J, Kinnon C, Black ME, Gaspar HB (2002). T cell transduction and suicide with the enhanced mutant thymidine kinase. *Gene Ther.* **9**: 824-827

Rabbitts TH (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*; **372**: 143-149

- Reaman GH, Sposto R, Sensel MG, Lange BJ, Feusner JH, Heereman NA *et al.* (1999). Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukaemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *J. Clin. Oncol*; **17**: 445-455
- Reardon JE (1989). Herpes simplex virus type I and human DNA polymerase interactions with 2'-deoxy-guanosine 5'-triphosphate analogous: kinetics of incorporation into DNA and induction of inhibition. *J. Biol. Chem.* **264**: 19039-19044.
- Renschler MF, Bhatt RR, Dower WJ, Levy R (1994). Synthetic peptide ligands of antigen binding receptor induce programmed cell death in human B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; **91**: 3623
- Riddell SR and Greenberg PD (1990). The use of anti CD3 and anti CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*; **128**: 189-201
- Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH (2002). T-cell therapy of leukemia. *Cancer Control*; **9**: 114-122
- Riss TL and Moravec RA (1992). Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and cytotoxicity assay. *Hematol. Oncol*; **7**: 243
- Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.*; **12**: 2099-2108.
- Rodriguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptro. *Neuron*; **4**: 487-492
- Rodriguez-Tébar A, Dechant G, Gotz R, Barde YA (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J*; **11**: 917-922
- Rols MP, Delteil C, Golzio M, Dumond P, Cross S, Teissie J (1998). In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotech*; **16**: 168-171
- Rowley JD, (1998) The critical role of chromosomal translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet*; **32**: 495-519
- Roy DC, Dallaire N, Moreau B *et al.* (2000). Photodynamic therapy (PDT) of B-lineage non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*; **96**(suppl1): 185a
- Ruggeri L, Capanni M, Martelli MF, Velardi A (2001). Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr Opin Hematol*; **8**: 355-359
- Ruggieri L., Aiuti A., Salomoni M., Zappone E., Ferarri G. Bordignon C. (1997). Cell-surface marking of CD34+-restricted phenotypes of human hematopoietic progenitor cells by retrovirus mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.*; **8**: 1611-1623
- Sauce D, Bodinier M, Garin M, Petracca B, Tonnelier N, Duperrier A, Melo JV, Apperley JF, Ferrand C, Herve P, Lang F, Tiberghien P, Robinet E (2002). Retrovirus mediated gene transfer in primary T lymphocytes impairs anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms. *Blood*; **99**: 1165-1173
- 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

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

Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM (1978). Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Br. Med. J*; **2**: 1529

Serody JS, Cook DN, Kirby SL, Reap E, Shea TC, Frelinger JA (1999). Murine T lymphocytes incapable of producing macrophage inhibitory protein –1 are impaired in causing graft-versus-host disease across a class I but not class II major histocompatibility complex barrier. *Blood*; **93**: 43-40

Shiobara S, Nakao S, Ueda M, Yamazi H, Takahashi S, Asano S, Yabe H, Kato S, Imoto S, Maruta A, Yoshida T, Gonso H, Morishima Y, Kodera Y (2000). Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation: indications and dose escalation. *Ther. Apher*; **5**: 40-45

Shore SK, Nabissa PM, Reddy EP (1993). Ribozyme mediated cleavage of the BCR-ABL oncogene transcript: In vitro cleavage of RNA and in vivo loss of P210 protein kinase activity. *Oncogene*; **8**: 3183

Simmons L, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B (1992). Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J. Immun.*; **148**: 267-271

Slavin S, Ackerstein A, Naparstek E, Or R, Weiss L (1990). The graft-versus-leukemia (GVL) phenomenon: Is GVL separable from GVHD? *Bone Marrow Transplant*; **6**: 155

Somia N, Verma IM (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Rev Genetics*; **1**: 91-99

Sorensen PH, Chen CS, Smith FO, Arthur DC, Domer PH, Bernstein ID, Korsmeyer SJ, Hammond GD, Kersey JH (1994). Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukaemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. *J. Clin. Invest*; **93**: 429-437

Spencer DM, Wandless TJ, Schreiber SL, Crabtree GR (1993) Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* **262**: 1019-1024.

Spencer DM, Belshaw PJ, Chen L, Ho SN, Randazzo F, Crabtree GR, Schreiber SL (1996). Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr. Biol.*; **6**: 839-847

Springett GM, Moen RC, Anderson S, Blasé RM, Anderson WF (1989). Infection efficiency of T lymphocytes with amphotropic retroviral vectors is cell cycle dependent. *J Virol*; **63**: 3865-3869

St Clair MH, Lambe CU, Furman PA (1987). Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Antimicrob Agents*; **31**: 844-849

Stein CA, Cheng YC (1993). Antisense oligonucleotides as therapeutic agents-is the bullet really magical. *Science*; **261**: 1004-1012

Stocking C, Bergholz U, Friel j, Klingler K, Wagener T, Starke C, Kitamura T, Miyajima A, Ostertag W (1993). Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors*; **8**: 197-209

- Storb R, Weiden PL, Graham TC, Lerner KG, Thomas ED (1977). Marrow grafts between related dogs homozygous and identical for DLA antigens. *Transplant Proc.*; **9**: 281-283
- Strout MP and Caligiura MA (1997). Developments in catogeneics and oncogenesis in acute leukemia. *Curr Opin Oncol*; **9**: 8-17
- Subramanian A, Ranganathan P, Diamond SL (1999). Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofectin of nondividing mammalian cells. *Nat. Biotech*; **17**: 973-877
- Sutherland DR and Keating A (1992). CD34: Structure, biology and cotential clinical applications *J. Hematother*; **1**: 115-129
- Takatsuki, Uchiyama T, Sagawa K, Hattori T (1977). Lymphoma and immunglobulin abnormalities, with spezial reference to M proteinemia. *Nippon Rinsho*; **35**: 3757-3767
- Temin HM (1990). Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *J. Med. Virol*; **21**: 13-17
- Thomis DC, Markt S, Bonini C, Traversari C, Gilman M, Bordignon C, Clackson T (2000). A fas based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood*; **97**: 1249-1257
- Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look T, Lahti J, Kidd VJ (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med*; **6**: 529-535
- Tiberghien P, Reynolds CW, Keller J, Spence S, Deschasseaux M, Certoux JM, Contassot E, Murphy WJ, Lyons R, Chiang Y, *et al.* (1994). Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood* **84**: 1333-1341
- Tiberghien P, Cahn CY, Brion A, Deconinck E, Racadot E, Herve P, Milpied N, Lioure B, Gluckman E, Bordignon C, Jacob W, Chiang Y, Marcus S, Reynolds C, Longo D (1997). Use of donor T lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase in allogeneic bone marrow transplantation a phase I-II study. *Hum. Gene Ther.***8**: 615-624
- Tiberghien P, Ferrand C, Lioure B, Milpied N, Angonin R, Deconinck E, Certoux JM, Robinet E, Saas P, Petracca B, Juttner C, Reynolds CW, Longo DL, Hervé P, Cahn JY (2001). Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells aith a Tcell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood*; **97**: 63-71
- Uckun FM, Sensel MG, Sather HN, Gayon PS, Arthur DC, Lange BJ, Steinherz PG, Kraft P, Hutchinson R, Nachman JB, Reaman GH, Heerema NA (1998). Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*; **91**: 735-746
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes & Dev*; **13**: 3191-3197
- VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK (2001). Viral vector-mediated gene therapy for hemophilia. *Curr. Gene Ther*; **3**: 301-315
- Verzeletti S, Bovini C, Markt S, Nobili N, Ciceri F, Traversari C, Bordignon C (1998). Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow up and improved new vectors. *Hum. Gene Ther.* **9**:2243-2251

- Via CS, Finkelman FD (1993). Critical role of interleukin-2 in the development of acute graft-versus-host disease. *Int Immunology*; **5**: 565
- Vigna E and Naldini L (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med*; **2**: 308-316
- Villeneuve L (1999). Ex vivo photodynamic purging in chronic myelogenous leukemia and other neoplasias with rhodamine derivatives. *Biotechnol Appl Biochem*; **30**: 1-17
- Vossen J (1998). Allogeneic bone marrow transplantation: relation between chimerism and immunity. *Verh K Acad Geneesk Belg*; **60**: 111-143
- Wachsman W, Golde DW, Chen IS (1986). HTLV and human leukemia: Perspectives. *Semin. Hematol*; **23**: 245
- Weaver CH, Buckner CD, Longin K, Appelbaum FR, Rowley S, Lilleby K, Miser J, Storb R, Hansen JA, Bensinger W (1993): Syngeneic transplantation with peripheral mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*; **82**: 1981-1984
- Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R (1979). Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts. *N. Engl. J. Med.*; **300**: 1068-1073
- Williams D, Ragab AH, McDougal JS (1985). HTLV-I antibodies in childhood leukaemia. *JAMA*; **253**: 2496
- Yang N *et al.* (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*; **87**: 9568-9572
- Young JL Jr, Ries LG, Silverberg E, Horn JW, Miller RW (1986). Cancer incidence, survival and mortality for children younger than age 15 years. *Cancer* **58**: 589
- Zecca M, Prete A, Santoro N, Caselli D, Maccario R, Danesino C, DeSaint Basile G, Locatelli F (2002). Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood*; **100**: 1192-1200
- Zeis M, Uharek L, Glass B, Gaska T, Gassmann W, Loeffler H, Mueller-Ruchholtz W (1995). Allogeneic NK cells as potent antileukemic effector cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*; **59**: 1734
- Zeis M, Uharek L, Glass B, Steinmann J, Dreger P, Gassmann W, Schmitz N (1997). Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukemia (GVL) effect in mice. *British J Haematol*; **757**
- Zeis M, Uharek L, Hartung G, Glass B, Steinmann J, Schmitz N (2001). Graft-vs-leukemia activity and graft-vs-host disease induced by allogeneic Th1- and Th2-type CD4+ T cells in mice. *Hemat J*; **2**: 136-144
- Zimmermann S, *et al.* (2002). Four-color flow cytometric analysis for measuring cytotoxic activity of NK cells and T cells against leukemic blasts: simultaneous detection of effector, proliferation, surface marker changes and killing efficiency. (submitted)

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

7. Abkürzungsverzeichnis

ACV	Acyclovir
Ag	Antigen
aGVHD	akute GVHD
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BSD	Blutspendedienst
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cGVHD	chronische GVHD
CIP	<i>Calf Intestine Phosphatase</i>
CLL	Chronisch lymphatische Leukämia
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalovirus
CTL	zytotoxische T-Zellen
CR	komplette Remission
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DLI	<i>Donor-lymphocyte infusion</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
<i>env</i>	Hüllprotein, envelop
FACS	Durchflusszytometer
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FKBP	FK506-bindendes Protein
g	Gramm
G418	Geneticin

<i>gag</i>	gruppenspezifisches Antigen
GALV	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GCV	Ganciclovir
GMP	<i>good manufactory practice</i>
GVHD	<i>graft-versus-host disease</i>
GVL	<i>graft-versus-leukemia</i>
GVT	<i>graft-versus-tumor</i>
HR	Hoch-Risiko
hrs	Stunden
HBS	Hepes buffered Saline
HBSS	Hank´s gepufferte Salzlösung
HBV	Hepatitis-B Virus
HHV	humanes Herpesvirus 8
HLA	humane Leukozytenantigene
hu	human
HSV	Herpes simplex virus I
HTLV	<i>human T-cell lymphotropic virus</i>
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
KIR	<i>killer inhibitory receptor</i>
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LNGFR	<i>low affinity nerve growth factor receptor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
mAg	<i>minor Histokompatibilitätsantigene</i>
MDS	<i>myelodysplastic syndrome</i>
MFD	<i>matched family donor</i>
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
MMFD	<i>mismatched family donor</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPSV	<i>murine-proliferating-sarcoma virus</i>
MR	Mittel-Risiko
MRD	minimale Resterkrankung
MUD	<i>matched unrelated donor</i>
MW	Molekulargewicht
NeoR	Neomycinphosphotransferase
NK	natürliche Killerzellen
NOD	<i>nonobese diabetic</i>
OCT	<i>Ornithine Transcarbamylase</i>
PBS	<i>Primer binding site</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBSCT	Transplantation peripherer Blut-Stammzellen
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDP	photodynamisches <i>purging</i>
PHA	Phythämagglutinin A
PI	Propidiumiodid
PK-C	Phosphokinase-C
<i>pol</i>	retrovirales Gen, das die Proteine reverse Transkriptase und Integrase codiert
PPT	Polypurin-Trakt
PS	Phosphatidylserin
RCR	replikationskompetente Retroviren
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
rT	reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
sa	Spleiß-Akzeptor

SCID	<i>sever combined immunodeficiency</i>
<i>sd</i>	Spleiß-Donor
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
SR	Standard-Risiko
SV40	simian virus 40
SZT	Stammzelltransplantation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBI	Ganzkörperbestrahlung
TCD	T-Zell depletiert
TCR	T-Zell Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TK	Thymidinkinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
TU	<i>transducing units</i>
U	<i>units</i>
ü/N	über Nacht
ü/T	über Tag
V	Volt
Vs.	versus
WP	Western Blot
WPRE	<i>Woodchuck-hepatitis-virus</i> <i>posttranscriptional regulatory element</i>
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Daten aus dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Koehl U, Zimmermann S, Esser R, Junker K, Soerensen J, Gruettner HP, Henschler R, Seifried E, Martin H, Grez M, Klingebiel T, Schwabe D; CD34- and CD133 selection: From purging of stem cell grafts to purification of gene modified T-cells. *Bone Marrow Transplant*, im Druck (2002)

Junker K, Koehl U, Zimmermann S, Schwabe D, Stein S, Klingebiel T, Grez M; Kinetics of cell death in T-lymphocytes genetically modified with two novel suicide fusion genes. *Gene Therapy*, im Druck (2002)

Kongressbeiträge:

Koehl U, Junker K, Zimmermann S, Esser R, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. Clinical scale transduced T cells equipped with two different suicide genes for immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation. Dezember 2002, *American society of hematology*; Philadelphia, USA

Junker K, Koehl U, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. Comparison of two different suicide systems in human primary T-lymphocytes for donor lymphocyte infusion in pediatric leukemia patients. Juni 2002 *American society of Gene-Therapy*, Boston, USA

Junker K, Koehl U, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. Donor T-lymphocytes transduced with a highly efficient suicide and selection system for donor lymphocyte infusion in pediatric patients with acute leukaemia. November 2001, *European society of Gene-Therapy, Antalya, Türkei*

Junker K, Koehl U, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. *Ex vivo* modification of T-lymphocytes with a highly efficient suicide mechanism for donor lymphocyte infusion (DLI) in pediatric leukemia (ALL) patients. Oktober 2001, *International symposium on Transplantation and Gene-Therapy*, Idar-Oberstein

Junker K, Koehl U, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. Development of a highly efficient suicide mechanism for delayed donor lymphocyte infusion in pediatric leukemia patients. Juni 2001, *European Hematology Association*, Frankfurt

Junker K, Koehl U, Beck O, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. Development of an adoptive gene therapy for pediatric leukemia patients based on gene-transduced allogeneic T-lymphocytes. Juni 2001, *Kind-Philipp-Tagung*, Wilsede

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie der Klinik für Kinderheilkunde III der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. T. Klingebiel und der Arbeitsgruppe Dr. M. Grez am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. T. Dingermann möchte ich herzlich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main danken.

Herrn Prof. Dr. T. Klingebiel danke ich sehr für sein Interesse an diesem Projekt und insbesondere für die Bereitschaft das Zweitgutachten dieser Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Grez für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme der Betreuung im Georg-Speyer Haus. Seine fachliche Unterstützung sowie seine stetige Diskussionsbereitschaft waren für die Durchführung dieser Arbeit unverzichtbar.

Frau Dr. U. Koehl möchte ich ganz besonders danken. Zum einen haben Ihre Diskussionsbereitschaft und ihre kreativen Ideen sowohl aus medizinischer, als auch aus naturwissenschaftlicher Sicht diese Arbeit maßgeblich vorangetrieben. Zum anderen haben ihre Herzlichkeit und ihre Persönlichkeit eine ganz besondere Atmosphäre geschaffen.

Herrn PD. Dr. D. Schwabe danke ich sehr für seine kritische Betrachtung des Themas vor allem im Hinblick auf eine medizinische Umsetzung.

Herrn Dr. S. Stein danke ich für seine praktischen Ratschläge im Laboralltag und bei der Durchsicht der Veröffentlichung und dieser Arbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. M. Grez ebenso wie den Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen des Georg-Speyer Hauses danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hierbei Christian Herder, Silke Schüle, Dr. Daniela Hildebrand und Hana Kunkel, die durch ihren Humor und ihre Freundschaft immer wieder motiviert haben und eine über den Laboralltag hinausgehende freundschaftliche Atmosphäre geschaffen haben; nicht zuletzt durch schöne Videoabende und die ein oder andere Flasche Sekt.

Ich danke weiterhin allen Mitgliedern der KMT-Abteilung der pädiatrischen Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie der Klinik für Kinderheilkunde III für die fachliche Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima. Im Besonderen möchte ich mich bei Stefanie Zimmermann für ihre Diskussionsbereitschaft, ihre Ausdauer im Erklären medizinischer Zusammenhänge und ihre Kooperation bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt all den Menschen, die mich während der Höhen und Tiefen dieser Arbeit ertragen haben. Allen voran meinem Mann André, der mich immer wieder motiviert hat und der mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat; meinen Eltern, die mir die Möglichkeit gegeben haben diesen Weg zu gehen und die immer für mich da sind, meiner Schwester, die immer ein offenes Ohr für mich hat sowie meiner gesamten Familie. Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Freunden danken, die immer wieder für nicht-wissenschaftliche Abwechslung gesorgt haben.

Mein Dank gilt außerdem der Stiftung „Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e.V.“, ohne deren finanzielle Unterstützung die Durchführung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Erklärung

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

Frankfurt am Main, den.....

.....

Kristina Christ

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Kristina Christ, geb. Junker
Geburtsdatum: 08.07.1972
Geburtsort: Marburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

SCHULAUSSBILDUNG

1978 – 1982 Grundschole Marbach
1982 – 1991 Gymnasium Martin-Luther-Schole, Marburg

BERUFSAUSSBILDUNG

1991 – 1994 Ausbildung zur Biologielaborantin, Behringwerke AG;
Marburg
06/94 – 10/94 Angestellt als Biologielaborantin in der Abteilung
Mikrobiologische Diagnostika, Behringwerke AG;
Marburg

HOCHSCHULSTUDIUM

1994 – 1998 Biologie-Studium an der Philipps-Universität Marburg
1998 – 1999 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe PD Dr. B. Reinhold-
Hurek am Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie in Marburg
02/98 – 05/98 Praktikum an der Université Paris Sud (Orsay) in der
Arbeitsgruppe von Dr. S. Séror
1999 – 2002 Promotion an der Klinik für Kinderheilkunde III der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
in der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie
und Hämostaseologie unter der Leitung von Prof. Dr. T.
Klingebiel in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. M.
Greß im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main