

**Entwicklung von lentiviralen Vektoren für den
Gentransfer in ruhende Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Katja Lützenkirchen
aus Hilden

Frankfurt am Main, 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1. 1. Gentherapie	1
1. 1. 1. Nicht virale Methoden der Gentherapie	3
1. 1. 2. Virale Vektorsysteme	5
1. 1. 2. 1. Adenoviren (AV).....	5
1. 1. 2. 2. Adeno-assoziierte Viren (AAV)	7
1. 1. 2. 3. Herpes-simplex Viren (HSV)	8
1. 1. 2. 4. Retrovirale Vektoren	9
1. 2. Lentiviren.....	11
1. 2. 1. Morphologie der Lentiviren	11
1. 2. 2. Genomaufbau des HIV-1.....	12
1. 2. 3. Replikationszyklus der Lentiviren.....	16
1. 2. 3. 1. Anbindung und Eintritt in die Zelle.....	17
1. 2. 3. 2. Reverse Transkription.....	18
1. 2. 3. 4. Integration.....	20
1. 2. 3. 5. Transkription und virale Proteinsynthese	21
1. 2. 3. 6. Virusassemblierung und Freisetzung.....	21
1. 2. 4. Lentivirale Vektoren.....	22
1. 2. 4. 1. Anwendung lentiviraler Vektoren	22
1. 2. 4. 2. Entwicklung HIV-1 basierender Vektoren	24
1. 2. 5. Verpackungszelllinien für lentivirale Vektoren	27
1. 2. 6. Die humanen hämatopoetischen Stammzellen als Zielzellen einer lentiviralen somatischen Gentherapie	29
1. 3. Chronische Granulomatose.....	31
1. 3. 1. Klinische und biochemische Aspekte der chronischen Granulomatose.....	31
1. 3. 2. NADPH-Oxidase.....	33
1. 3. 2. 1. Die Komponenten der Leukozyten NADPH-Oxidase.....	34
1. 3. 2. 2. Aktivierung der NADPH-Oxidase.....	36
1. 3. 2. 3. Behandlungsstrategien der chronischen Granulomatose	38
1. 4. Ziel der Arbeit.....	40

2. Materialien	42
2. 1. Geräte	42
2. 2. Chemikalien	43
2. 3. Material zur Klonierung und biochemische Nachweise	44
2. 3. 1. Enzyme	44
2. 3. 2. Ausgangsvektoren und Plasmide	44
2. 3. 3. Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	44
2. 3. 4. Kits und Säulen	45
2. 4. Material für die Zellkultur	45
2. 4. 1. Medien und Zusätze	45
2. 4. 2. Zytokine	45
2. 4. 3. Antikörper	46
2. 4. 4. Zelllinien	46
2. 4. 4. 1. Adhärente Zellen	46
2. 4. 4. 2. Suspensionszellen	46
3. Methoden	47
3. 1. Molekularbiologische Arbeitsmethoden	47
3. 1. 1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	47
3. 1. 2. Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl ₂ -Methode	47
3. 1. 3. Transformation kompetenter Bakterienzellen	48
3. 1. 4. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	48
3. 1. 4. 1. Mini-Plasmid-Präparation mittels alkalischer Lyse	48
3. 1. 4. 2. Maxi-Plasmid-Präparation mittels Cäsiumchlorid-Gradienten	49
3. 1. 4. 3. Maxi-Plasmid-Präparation mit kommerziellen System	51
3. 1. 5. Aufreinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA	51
3. 1. 5. 1. Präzipitation von DNA	51
3. 1. 5. 2. PCI-Extraktion von DNA	51
3. 1. 5. 3. Quantifizierung von DNA	52
3. 1. 5. 4. Reinigung von DNA aus Agarosegelen	52

3. 1. 6. Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäure	52
3. 1. 6. 1. Restriktionsendonukleolytischer Verdau von DNA	52
3. 1. 6. 2. Dephosphorylierung freier DNA-Enden.....	53
3. 1. 6. 3. Generierung glatter DNA-Enden („blunt end“).....	53
3. 1. 6. 4. Ligation von DNA-Fragmenten.....	53
3. 1. 6. 5. Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	54
3. 1. 6. 6. Synthese linearer DNA-Fragmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
3. 2. Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	55
3. 2. 1. Kultivierung von Zelllinien	55
3. 2. 2. Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen zur Virusproduktion.....	56
3. 2. 3. Methoden zur Konzentrierung lentiviraler Partikel aus Zellkulturüberstand.....	57
3. 2. 3. 1. Ultrafiltration	57
3. 2. 3. 2. Ultrazentrifugation.....	57
3. 2. 3. 3. Sedimentieren von Viruspartikeln bei niedriger Geschwindigkeit.....	58
3. 2. 3. 4. Anionenaustauschchromatographie.....	58
3. 2. 4. Transduktion von Zellen mit lentiviralem Virusüberstand	59
3. 2. 5. Methoden zur Titerbestimmung	60
3. 2. 5. 1. Endpunktverdünnung mittels visueller Auswertung	60
3. 2. 5. 2. Quantifizierung der viralen RNA mittels TaqMan-PCR.....	61
3. 2. 6. Durchflußzytometrie (FACS, „Fluorescence Activated Cell Sorting“)	62
3. 2. 6. 1. Funktionsprinzip des Durchflußzytometers.....	62
3. 2. 6. 2. FACS-Markierung.....	63
3. 2. 7. Arbeitsmethoden mit hämatologischen CD34 ⁺ -Stammzellen.....	64
3. 2. 7. 1. Präparation und Kultur von hämatopoetischen Stammzellen.....	64
3. 2. 7. 2. Transduktion von CD34 ⁺ -Zellen	66
3. 2. 7. 3. Differenzierungskulturen in semisoliden Medien	67
3. 2. 7. 4. FACS-Analyse transduzierter CD34 ⁺ -Zellen	68
3. 2. 8. Analyse von gp91-exprimierenden Zellen	68
3. 2. 8. 1. Chemilumineszenz-Assay.....	68
3. 2. 8. 2. Zytochrom c-Assay.....	69
3. 2. 8. 3. FACS-Analyse gp91 ^{phox} exprimierender Zellen.....	70
3. 2. 8. 4. Nachweis der gp91 ^{phox} -Expression durch Westernblot-Analyse.....	70
3. 2. 8. 5. Quantitative Proteinbestimmung	71
3. 2. 8. 6. Semiquantitativer Nachweis der Integration von Transgenen durch PCR.....	72

4. Ergebnisse.....	73
4. 1. Etablierung eines Protokolls für die Transduktion hämatopoetischer Stammzellen mit lentiviralem Virusüberstand.....	73
4. 1. 1. Konstruktion der lentiviralen Vektoren pSIN-GFP, pRRL-CMV-GFP-WPRE-SIN und pRRL-CMV-IRES-GFP-WPRE-SIN.....	73
4. 1. 2. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Produktion von lentiviralen Partikeln mit hohem Titer.....	76
4. 1. 2. 1. Auswirkung von Natriumbutyrat und unterschiedlicher Mengen Plasmid auf den Virustiter	76
4. 1. 2. 2. Einfluß unterschiedlicher serumfreier Medien auf den Virustiter	79
4. 1. 2. 3. Konzentrierung infektiöser Viruspartikel durch Ultrazentrifugation	80
4. 1. 2. 4. Anreicherung von Viruspartikeln mit Anionenaustauschchromatographie.....	82
4. 1. 2. 5. Vergleich von Ultrazentrifugation, Fractoflow® und Ultrafiltration als Methoden zur Anreicherung von Viruspartikeln.....	84
4. 1. 2. 6. Einfluß von Medienkomponenten auf die Konzentrierung von Virusüberstand.....	88
4. 1. 2. 7. Austestung weiterer Varianten der Viruskonzentrierung	91
4. 1. 3. Transduktion von CD34 ⁺ -Zellen mit konzentriertem Virusüberstand	96
4. 1. 3. 1. Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen mit ultrazentrifugiertem Virusüberstand.....	96
4. 1. 3. 2. Transduktion von CD34 ⁺ -Zellen mit konzentriertem Virusüberstand nach Anionenaustauschchromatographie.....	99
4. 1. 3. 3. Transduktion von hämatopoetischen Vorläuferzellen mit konzentriertem Virusüberstand nach „Low Speed“-Zentrifugation	102
4. 1. 3. 4. Vergleich verschiedener Methoden zur Konzentrierung von Viruspartikeln in Bezug auf die Transduktionseffizienz von CD34 ⁺ -Zellen.....	105
4. 2. Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität durch Transduktion mit lentiviralen gp91^{phox}-Vektoren.....	112
4. 2. 1. Konstruktion der lentiviralen Vektoren pSIN2-CMV-gp91 und pSIN2-CMV-gp91-WPRE.....	113
4. 2. 2. Semiquantitativer Integrationsnachweis des gp91 ^{phox} -Transgens	115
4. 2. 3. Westernblot Analyse der Expression des gp91 ^{phox} -Proteins	117
4. 2. 4. Analyse der Expression mittels FACS	119
4. 2. 5. Funktionelle Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität.....	121
4. 2. 5. 1. Chemilumineszenz-Assay der lentiviral transduzierten Modellzelllinie ...	121
4. 2. 5. 2. Untersuchung transduzierter Zellen im Zytochrom c-Assay.....	125

5. Diskussion	130
5. 1. Entwicklung eines lentiviralen Transduktionsprotokolls für CD34⁺-Zellen	133
5. 1. 1. Konstruktion lentiviraler Vektoren	133
5. 1. 2. Methoden zur Generierung von Virusüberstand mit hohem Titer	136
5. 1. 3. Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen	144
5. 2. Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität.....	151
5. 2. 1. Klonierung lentiviraler gp91 ^{phox} -Vektoren.....	151
5. 2. 2. Molekularbiologische Untersuchungen der lentiviralen Vektoren	152
5. 2. 3. Funktionelle Untersuchungen zur Rekonstitution der NADPH-Oxidase.....	155
6. Zusammenfassung	159
7. Literatur	161

Abkürzungsverzeichnis

(Erläuterungen in englisch sind kursiv dargestellt)

δ	Dichte
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromole
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired Immunodeficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
Bp	Basenpaare
CAEV	<i>caprine arthritis encephalitis virus</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFC	<i>colony forming cell</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CGD	<i>chronic granulomatous disease</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalusvirus
cPPT	<i>central polypurine tract</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EIAV	<i>equine infectious anemia virus</i>
et al.	et alias, lateinisch – und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-adenin-nukleotid
Flt3	<i>Fms-related receptor tyrosine kinase 3</i>
FIV	<i>feline immunodeficiency virus</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gravitationskonstante
g	Gramm
G	<i>granulocyte</i>

GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM	<i>granulocyte macrophage</i>
gp	Glycoprotein
GTP	Guanosin-Triphosphat
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	<i>histocompatibility antigens</i>
HSA	Humanserum-Albumin
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
HSV	Herpes-Simplex Virus
HSV-AV	Herpes-Simplex Virus Amplikonvektor
HSV-RV	Herpes-Simplex Virus rekombinanter Vektor
HTLV	<i>human T-cell lymphotropic virus I</i>
IL-x	Interleukin
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
IU	<i>infectious units</i>
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Mol
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min.	Minuten
ml	Milliliter
MLV	<i>murine leukemia virus</i>
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mV	Millivolt
NaBut	Natriumbutyrat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
ng	Nanogramm
NLS(-Sequenz)	<i>nuclear localization site</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NOD/SCID	<i>non obese diabetic/severe combine immunodeficiency disease</i>
PB	<i>primer binding site</i>

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	pH-Wert,
phox	<i>phagocyte oxidase</i>
PIC	Präintegrationskomplex
pmol	Picomol
PNS	<i>peripheral nervous system</i>
POD	Peroxidase
PPT	<i>polypurine tract</i>
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RRE	<i>rev responsive element</i>
RSV	Rous Sarkom Virus
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor
SCF	<i>stem cell factor</i>
SD	Spleißdonor
SIN	<i>self inactivating</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TPO	Thrombopoetin
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
V	Volt
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoproteine G</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WHV	<i>woodchuck hepatitis virus</i>
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
X-CGD	<i>x-linked chronic granulomatous disease</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Mit der Entwicklung der rekombinanten DNA Technologie wurden auch in der Medizin große Fortschritte gemacht. Durch diese Methoden wurde es möglich, die molekularen Ursachen von vielen Erkrankungen zu klären. Viele dieser Verfahren werden derzeit benutzt oder diskutiert, um Nukleinsäuren in Zellen eines Rezipienten, Spenders oder artifiziellen Systemen einzuschleusen, um Erkrankungen zu diagnostizieren, zu lindern oder zu heilen. Die Techniken zum Transfer von Genen wurden unter anderem mit der Absicht entwickelt, Patienten mit monogenen Erbkrankungen durch Übertragung intakter Gensequenzen in die entsprechenden Körperzellen, eine kausale, effiziente, spezifische und nebenwirkungsarme Behandlung zu ermöglichen (Baum und Ostertag, 1994). Das Fortschreiten der Forschung in der molekularen Genetik, führte zu der Erkenntnis, daß die Gentherapie auch neue Therapiemöglichkeiten für multifaktorielle Erkrankungen wie Hypertonie, Herzerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten bietet.

1. 1. Gentherapie

Die Gentherapie ist eine vielversprechende neue Methode zur Behandlung genetischer, metabolischer und neurologischer Erkrankungen, sowie Krebs und AIDS. Das primäre Ziel der Gentherapie ist es, ein spezifisches Gen in eine bestimmte Zelle einzuschleusen und es dort so zu exprimieren, daß ein therapeutischer Effekt erzielt wird (Klimatcheva et al., 1999). Die in den letzten zwei Jahrzehnten entwickelten Strategien werden in virale und nicht virale Methoden unterschieden. Der erste klinische Gentransfer zur Behandlung von Adenosin Desaminase (ADA), einer genetischen Erkrankung, wurde im September 1990 gestartet (Anderson, 1992). Seit dieser Zeit sind eine ganze Reihe von klinischen Studien weltweit hinzu gekommen, die sich hinsichtlich der verwendeten Werkzeuge, der zu therapierenden Erkrankungen, der transferierten Gene und der Wege der Verabreichung unterscheiden. Nach Amerika (310 registrierte Studien, Stand 25. Mai 2000) gehört Europa mit 97 erfaßten Studien zu den in der Entwicklung von gentherapeutischen Protokollen aktivsten Kontinenten. In Deutschland werden 2,1 % der weltweit veröffentlichten Studien durchgeführt (<http://www.wiley.com/wileychi/genmed>, Stand 25. Mai 2000). Von den registrierten klinischen Versuchen beinhalten rund 66 % die Therapie von Krebs, etwa 13 % der Studien widmen sich monogenetischen Erkrankungen, 9 % sind Markerstudien zur Erprobung von

Funktionalität und Effekten neuer Methoden und circa 8 % der klinischen Protokolle beinhalten die Behandlung von Infektionskrankheiten (<http://www.wiley.com/wileychi/genmed>, Stand 25. Mai 2000). In nachstehender Tabelle sind einige monogenetische Erkrankungen, die derzeit in Gentherapie-Studien untersucht werden, aufgelistet.

Tab. 1-1: Erkrankungen die auf einen monogenetischen Defekt zurückzuführen und derzeit in Gentherapieversuchen untersucht werden (<http://www.wiley.com/wileychi/genmed>, Stand 25. Mai 2000). (SCID – „severe combined immunodeficiency“; ADA – Adenosin-Desaminase)

Krankheit	Defektes Genprodukt	Betroffener Zelltyp
Schwere kombinierte Immundefizienz (ADA-SCID), (X-linked SCID)	Adenosin-Desaminase γ Zytokin-Rezeptor	Lymphozyten
Chronische Granulomatose (CGD)	Flavozytochrom <i>b</i> , NADPH-Oxidase	Neutrophile Granulozyten
Zystische Fibrose (Mucoviszidose)	Transmembranregulator	Atemwege
Familiäre Hypercholesterinämie	LDL-Rezeptor	Hepatozyten
Morbus Gaucher	Glucocerebrosidase	Makrophagen
Hämophilie A/B	Faktor VIII / IX	Hepatozyten
Mucopolysaccharidose	β -Glucuronidase	Mesenchymale und neuronale Zellen
Leukozyten-Adhäsions Defizienz	CD8 β	Monozyten
Purine Nukleosid-Phosphorylase Defizienz	Purine Nukleosid-Phosphorylase	T- und B-Zellen

Rund 68 % der registrierten Studien befinden sich in der klinischen Phase I, daß heißt die Therapeutika werden nur einem kleinem Patientenkollektiv (bis 20 Personen) verabreicht. In dieser Phase werden erstmals die Sicherheit, der Dosierungsrahmen und eventuell auftretende Nebeneffekte untersucht. Etwa 23 % der Studien liegen in einem Bereich zwischen klinische Phase I und II. Phase II bedeutet eine erweiterte Erprobung (100 – 300 Patienten) der zu testenden Behandlungsmethode, um die Effizienz und Sicherheit eingehender zu prüfen. Etwa 9 % der Studien sind in der klinischen Phase II und nur 0,5 % in der klinischen Phase III. In dieser Phase wird eine große Gruppe (1000 – 3000 Personen) hinsichtlich der Effektivität, Nebenwirkungen und im Vergleich mit herkömmlichen Methoden untersucht. Darüber hinaus werden die Informationen gesammelt, die eine sichere Anwendung der zu testenden Substanz oder Behandlung erlaubt. Die oben erwähnte Definition in klinische Phasen beziehen sich auf Angaben der FDA (Food and Drug Administration, USA; <http://clinicaltrials.gov/>).

Die Verabreichung genetischen Materials erfolgt hauptsächlich intratumoral, intravenös oder *ex vivo* im Rahmen einer Knochenmarktransplantation. Als Therapeutika werden Gene mittels Vektoren in die entsprechenden Zellen eingebracht. Die am häufigsten verwendeten Gene sind Zytokine, Antigene, Suizidgene, Marker, Tumorsuppressoren, Rezeptoren und intakte Genkopien bei monogenetischen Defekten. Bei den behandelten Zellen handelt es sich in 82 % der registrierten Studien um autologes Material, während rund 7 % allogene sind. Seltener werden syngene oder xenogene Zellen als Zielzellen eingesetzt (<http://www.wiley.com/wileychi/genmed>, Stand 25. Mai 2000).

Um therapeutische Gene in einen Organismus einzubringen, werden sie meist in Vektoren integriert. Diese Vektoren werden dann mit nicht viralen oder viralen Methoden in Zellen oder Gewebe eingebracht. Bei den klinischen Studien überwiegen die viralen Methoden (etwa 70 %) vor den nicht viralen Methoden (<http://www.wiley.com/wileychi/genmed>, Stand 25. Mai 2000). Lentivirale Vektoren, wie die in dieser Arbeit verwendeten, sind derzeit noch nicht Gegenstand von klinischen Studien. Im folgenden werden zunächst die nicht viralen Methoden und anschließend die gebräuchlichsten viralen Techniken erläutert. Daran anschließend werden die Lentiviren sowie die daraus abgeleiteten Vektoren eingehender vorgestellt.

1. 1. 1. Nicht virale Methoden der Gentherapie

Der Erfolg der Gentherapie ist abhängig von der Entwicklung von Vektoren oder Vehikeln, die selektiv und effizient Gene in Zielzellen einschleusen können, ohne toxische Effekte hervorzurufen. Virale Vektoren können Zellen mit hoher Effizienz transduzieren. Aber im Hinblick auf Sicherheitsaspekte bei der Verwendung von Viren im Menschen, sind nicht virale Systeme eine attraktive Alternative. Die Vorteile solcher nicht viralen Vektoren sind die Einfachheit der Anwendung und Produktion, sowie das geringere Risiko einer spezifischen Immunantwort auf Fremdinformationen. In viralen Vektoren sind teilweise noch genetische Informationen für virale Proteine vorhanden, die eine immunologische Reaktion auslösen können. Diese Sequenzen sind häufig essentiell für die Replikation und Infektiosität des Virus. Die Gefahr, durch das Transgen eine immunologische Reaktion zu verursachen, ist jedoch bei beiden Vektortypen gegeben. Eine Reihe von verschiedenen Systemen sind entwickelt und im Hinblick auf die Transduktionseffizienz optimiert worden.

Die einfachste Anwendung eines nicht viralen Systems, ist die direkte Applikation von nackter Plasmid-DNA. Diese Methode wurde zu einer neuen Klasse von Therapeutika, den sogenannten DNA-Vakzinen entwickelt (Ulmer, 1993). Diese Vakzine beinhalten Plasmide, die z. B. für ein virales Antigen kodieren und durch die Expression dieses Fremdproteins eine gewünschte antivirale Immunantwort hervorrufen. Sie werden hauptsächlich zur Impfung von Tieren verwendet. Eine weitere Anwendung ist die gezielte Expression von pharmakologisch aktiven Molekülen wie Erythropoetin oder Leptin (Li und Huang, 2000). Ein anderer aktiver Forschungsbereich sind die „Tumor-Vakzine“ (Condon et al., 1996). Eine Antitumorimmunität kann erreicht werden durch die Verwendung von inhibitorischen Genen oder von Genen, deren Sequenz Zytokine kodieren. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen wurden physikalische Methoden wie „Gene-Gun“ (Yang et al., 1990) und Elektroporation (Rols M. P. et al., 1998) entwickelt. Mit letzterer Methode konnte nach intramuskulärer Injektion *in vivo* beeindruckende Ergebnisse erzielt werden (Rizzuto et al., 1999).

Während eine Injektion mit nackter DNA direkt in Gewebe möglich ist, werden für andere Formen der Verabreichung Vektoren oder Vehikel zum Transport benötigt. Darunter sind auch kationische Lipide oder Polymersysteme, mit denen die DNA komplexiert wird. Diese werden zwar auch in klinischen Studien angewandt, sind jedoch bislang im Hinblick auf die Effizienz den viralen Systemen unterlegen. Die Ineffizienz beruht mitunter auf der relativ geringen Dauer der Genexpression. Der limitierende Faktor ist hier der Transport in den Zellkern, weshalb in letzter Zeit unter anderem NLS-Sequenzen („nuclear localization signal“) in die Vektoren eingebaut werden (Subramanian et al., 1999). Eine neuere Strategie ist die Anwendung von chimären RNA/DNA Nukleotiden, die gezielt durch Rekrutierung des endogenen DNA-Reparaturmechanismus die Genomsequenz verändern (Cole-Strauss et al., 1996). Der nicht virale Gentransfer steht erst am Anfang seiner Entwicklung. Damit die Effizienz dieser Systeme gesteigert werden kann, müssen die zellulären und *in vivo* Barrieren des Transfers besser untersucht werden.

Die nicht viralen Vektorsysteme eignen sich unter anderem für lokale und transiente Therapien wie beispielsweise in Tumoren. Mit diesen Vehikeln können auch pharmakologisch aktive Substanzen oder Antigene exprimiert werden, die dann eine gezielte immunologische Reaktion hervorrufen. Für eine langfristig Expression des Transgens, wie sie beispielsweise für eine Therapie von angeborenen Gendefekten erforderlich ist, sind derzeit virale Vektoren den nicht-viralen Systemen überlegen.

1. 1. 2. Virale Vektorsysteme

Die nicht viralen Vektorsysteme sind noch nicht so weit erforscht und entwickelt, daß sie virale Vektoren ersetzen können. Jedes virale Vektorsysteme ist charakterisiert durch eine Reihe gegebener Eigenschaften, die die Verwendung in der Gentherapie beeinflussen. So ist für bestimmte Krankheiten eine lang andauernde beziehungsweise lebenslange Expression einer kleinen Anzahl von Zielzellen ausreichend, wie beispielsweise bei genetischen Defekten. Andererseits kann auch eine hohe, jedoch transiente Expression erforderlich sein, wie es bei Infektionskrankheiten oder Inhibition von Tumorwachstum der Fall ist. Es gibt auch Bereiche in der Gentherapie, die auf eine zuverlässige Regulation der Expression hinarbeitet. Dies ist bei der Behandlung von Diabetes, die abhängig ist von der Glucosekonzentration im Blut, und bei Anämien, bei der die Hämatokritwerte entscheidend sind, der Fall. Im nachfolgenden werden die wichtigsten viralen Vektoren kurz vorgestellt. Auf die lentiviralen Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wird im anschließenden Kapitel ausführlich eingegangen.

1. 1. 2. 1. Adenoviren (AV)

Adenoviren sind große DNA-Viren ohne Hüllmembran und mit einem doppelsträngigem linearem Genom von bis zu 37 kb (Modrow und Falke, 1997). Aufgrund spezifischer Eigenschaften sind sie zu populären Werkzeugen der Gentherapie geworden. Diese Viren können eine große Auswahl an teilenden und ruhenden Zellen infizieren und leicht mit einem hohen Titer gewonnen werden. Außerdem sind die Typen von Viren, die zur Konstruktion von Vektoren verwendet werden, gut charakterisiert und können bis zu 37 kb genetisches Material aufnehmen. Da Adenoviren nur selten in das Wirtsgenom integrieren, eignen sie sich für Anwendungen, die eine transiente Expression erfordern (Harui et al., 1999). Als Hybride von Adeno-/Retroviren oder Adeno-/Adeno-assoziierte Viren kann eine Integration erreicht werden, um eine Langzeitexpression zu erzielen (Recchia et al., 1999; Lieber et al., 1999).

Im natürlichen Lebenszyklus der Adenoviren gelangt das Genom, nach Eintritt in die Zelle und der durch virale Proteine vermittelten Lyse der Endosomen, in den Zellkern (Kay et al., 2001). Dort werden episomal zunächst die frühen („early“) Gene transkribiert, die für regulatorische Peptide (E1-4) kodieren. Erst später werden die Strukturproteine (L1-5), für das Capsid und das Nukleocapsid abgelesen (siehe Abb. 1-1) (Modrow und Falke, 1997). In

den Vektoren der ersten Generation wurden Expressionskassetten als Substitute in die E1 und/oder E3 Region eingefügt. Die Produkte der E1 Region sind essentiell für die Virusvermehrung und müssen deshalb *in trans*¹ durch Helfersysteme zugefügt werden. Die von der E3 Region kodierten Produkte interagieren mit dem Abwehrmechanismus des Wirtes, sind aber für die virale Replikation nicht notwendig. In den Vektoren der zweiten Generation wurden dann auch Deletionen in den Genen der Region E2 und E4 eingeführt und damit die Klonierungskapazität erhöht. Mit dieser Art Vektoren wurden auch klinische Studien durchgeführt, die zum Tod eines Patienten führten (Hollon, 2000). Dabei wurde eine sehr hohe Anzahl Partikel pro Kilogramm Körpergewicht eines E1/E4 deletierten Adenovirus appliziert, die letztendlich zu einem multiplen Organversagen führte. Die neueste Entwicklung sind Vektoren, die nur noch die ITR („inverted terminal repeat“) und das Verpackungssignal ψ („psi“) enthalten. Trotz der aufwendigen Produktion der Viren (Danthinne und Imperiale, 2000), können Titer von 10^{13} Partikel pro ml erreicht werden (Kay et al., 2001). Damit ist dieses System in Bezug auf den Titer am effektivsten. Die hohe Antigenität des adenoviralen Virion und die Toxizität der enthaltenen Pentonproteine bleiben trotz der sehr fortgeschrittenen Entwicklung als Komplikationsfaktoren erhalten (Costantini et al., 2000).

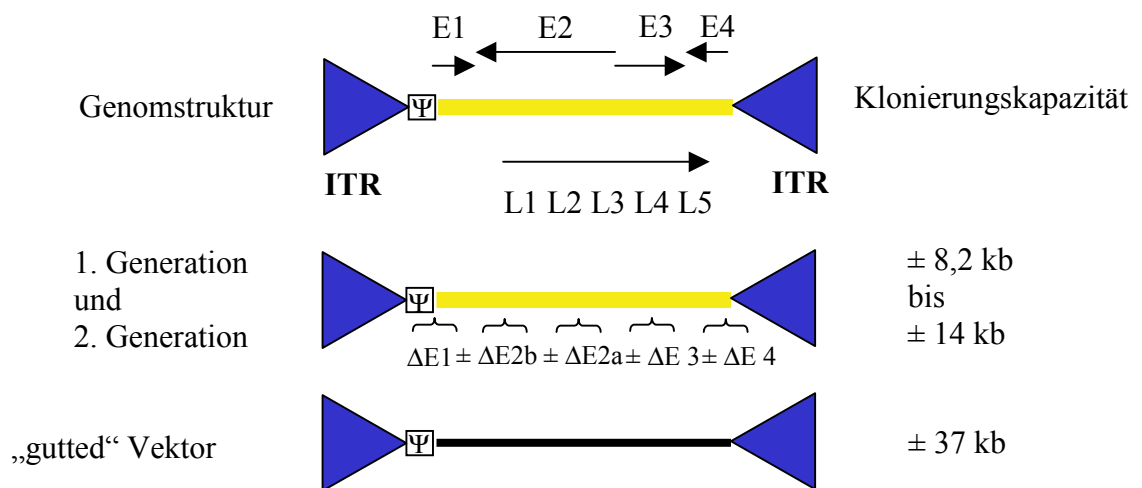


Abb. 1-1: Genomorganisation von Adenoviren und Struktur von Vektoren der ersten und zweiten Generation, sowie „ausgeräumten“ Vektoren. Oben ist die native Struktur des Virus dargestellt mit den als Pfeil dargestellten frühen (E1-4) und späten (L1-5) Transkriptionseinheiten. Für die Vektoren der ersten und zweiten Generation sind die Orte der Deletionen angegeben. Mehrfach deletierte („guttet“) Vektoren enthalten keine Strukturgene mehr, sondern nur regulatorische, cis-aktive² Sequenzen. (Nach Costantini et al., 2000).

¹ *Trans*-aktiv – bedeutet, daß das Genprodukte (Proteine) auf DNA-Regionen wirkt, die nicht unbedingt dem DNA-Molekül entsprechen, aus denen sie hervorgegangen sind.

² *Cis*-aktiv – Sequenz-Bereich, der nur auf dem gleichen DNA-Molekül wirksam ist

1. 1. 2. 2. Adeno-assoziierte Viren (AAV)

Die adeno-assoziierten Viren (AAV) wurden als Kontamination einer Adenoviren Präparation entdeckt. Die AAV bestehen aus einem nicht-pathogenen, kleinen Virion, das ein Einzelstrang DNA-Genom enthält (Costantini et al., 2000). Das virale Genom umfaßt zwei Gene (siehe Abb. 1-2), die jeweils mehrere Polypeptide hervorbringen: *rep* wird benötigt für die virale Replikation, während *cap* für die Strukturproteine kodiert (Kay et al., 2001). Diese beiden Gene werden flankiert von viralen ITRs, die eine Länge von 145 Nukleotiden haben. Jeder Partikel enthält ein Plus- oder Minusstrang Genom. Die Klonierungskapazität von AAV liegt bei rund 5 kb, welches die größte Limitierung dieser Vektoren darstellt.

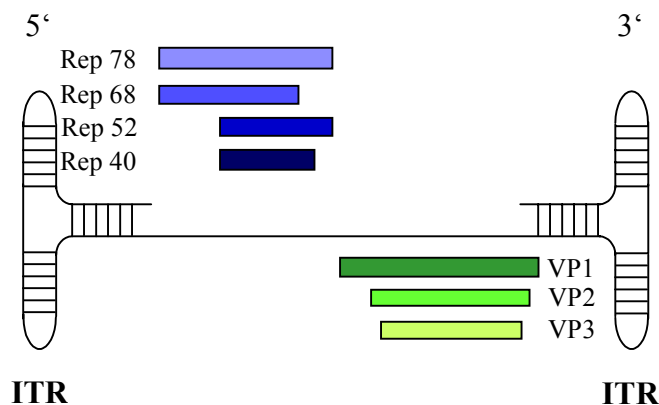


Abb. 1-2: Struktur eines adeno-assoziierten Virus. Die viralen Proteine für die Replikation (*Rep*) und Hülle (*VP*) werden von den ITRs flankiert. Die ITRs sind in Kombination mit Produkten der *rep*-Region verantwortlich für die ortsspezifische Integration. Die Genprodukte sind farblich dargestellt (nach Brenner, 1995).

Das Wildtyp-Virus hat bei Präsenz von *rep* die Möglichkeit in eine spezifische Region von Chromosom 19 zu integrieren. Diese Eigenschaft geht mit der Entfernung von *rep* verloren (Kay et al., 2001). Zur Produktion von AAV Vektoren werden separate Plasmide mit der therapeutischen Genkassette, den *rep/cap*-Genen verwendet und Helfer-Adenoviren oder ein drittes Plasmid mit den essentiellen adenoviralen Genen zugegeben (Matsushita et al., 1998; Xiao et al., 1998). Die Produktion von großen Mengen an Virus ist sehr laborintensiv, wird jedoch durch die jüngsten Fortschritte in der Entwicklung von Verpackungszelllinien und chromatographischen Reinigungsverfahren zunehmend vereinfacht (Hauswirth et al., 2000; Clark et al., 1999).

Für AAV-Vektoren konnte eine Transduktion von Zellen zum einen durch episomale Transgen-Expression und zum anderen durch zufällige chromosomale Integration nachgewiesen werden (Kay et al., 2001). Seit dem die Vektoren keine viralen kodierenden Sequenzen mehr enthalten, konnten toxische oder entzündliche Reaktion nicht mehr beobachtet werden, mit Ausnahme der Generierung von neutralisierenden Antikörpern, die

möglicherweise eine Readministration limitieren. Durch *in vivo* Verabreichung konnten die Vektoren in verschiedene Organe (z. B. ZNS, Leber, Lunge und Muskel) transferiert werden und es konnte eine Transduktion von nicht-teilenden Zellen nachgewiesen werden (Kay et al., 2001). Derzeit werden AAV in klinischen Versuchen zur Behandlung von zystischer Fibrose, Hämophilie und Muskeldystrophien erprobt, bei denen sich frühe Anzeichen für den Gentransfer und die Expression des Faktor IX abzeichnen (Kay et al., 2001). Diese Vektoren sind für die Behandlung verschiedener Krankheiten sehr nützlich und es werden sehr wahrscheinlich neue klinische Versuche folgen.

1. 1. 2. 3. Herpes-simplex Viren (HSV)

Herpesviren sind neurotrophe Viren, die in der natürlichen Infektion eine Vorliebe für Neuronen des peripheren Nervensystems zeigen (Fink et al., 2000). Das Herpes-simplex Virus Typ-1 (HSV) ist ein weitverbreiteter, human pathogener Virus, der primär Erkältungsbeschwerden auslöst, aber gelegentlich auch Enzephalitis und andere lebensbedrohliche Zustände bei geschwächtem Immunsystem hervorrufen kann. Das mit einer Hüllmembran umgebene Virus enthält ein 152 kb umfassendes doppelsträngiges DNA-Genom, das für insgesamt 84 Gene kodiert (Costantini et al., 2000). Bei einer natürlichen Infektion wird nach Eintritt in die Zelle das Capsid zum Kern transportiert und hier die DNA durch die Kernporen in den Nukleus transportiert (Fink et al., 2000). Die virale DNA verbleibt dort in zirkulärer, episomaler Form, wird repliziert und geht in eine Latenz über oder wird je nach Zusammensetzung degradiert (Costantini et al., 2000).

Aufgrund ihrer Eigenschaft, nach einer primär Infektion in einem Zustand der Latenz zu persistieren, wurden zwei Typen von Vektoren, die rekombinanten Virusvektoren (HSV-RV) und die Amplikonvektoren (HSV-AV), entwickelt. Die HSV-RV enthalten das volle virale Genom, das in einem oder mehreren Genen mutiert wurde. Damit wird die Toxizität herabgesetzt und gleichzeitig Raum für Transgene von etwa 30 kb geschaffen. Die replikationsdefekten Viren sind so konstruiert, daß sie minimale Toxizität zeigen. Dafür wurden an mehreren Stellen frühe Gene, die für transaktivierende Faktoren kodieren, und andere virale Gene eliminiert (Krisky et al., 1998). Die Anwendung dieser HSV-RV ist bis jetzt jedoch eingeschränkt aufgrund der fehlenden Erfahrung in Patienten, Schwierigkeiten bezüglich der lang andauernden Expression in bestimmten Geweben, wie beispielsweise im

Gehirn, und des Vektor-Targeting, da die Anheftung an und der Eintritt in die Zelle ein sehr komplexer Vorgang ist.

Die HSV-AV sind eine Alternative zu den rekombinanten, replikationsdefekten Vektoren. Diese ungefähr 15 kb großen Vehikel bestehen aus einem Plasmid das minimal einen HSV *ori* („origin of replication“) und ein Verpackungssignal *pac* enthält. Das Standard Amplikon-System benötigt Funktionen von Helfer-HSV, um Partikel produzieren und Vektor-Konkatamere in Genomlänge verpacken zu können. Der Vektor kann frei von Helfer HSV verpackt werden durch die Kotransfektion von HSV-Genomen mit deletierten *pac* Signalen unter Verwendung von Cosmiden oder BAC-Plasmiden („bacterial artificial chromosoms“). Das System ist zwar nahezu frei von Helferviren, aber solange die Vektoren und die Hilfsplasmide gleiche Sequenzen tragen, besteht immer die Möglichkeit durch Rekombination replikationskompetente Viren zu erzeugen (Kay et al., 2001).

Eine Reihe von HSV-Vektoren wurden schon erfolgreich im Tiermodell zur Behandlung von Krebs, PNS-Erkrankungen, verschiedenen Hirnerkrankungen, Spinal-Nerv-Verletzung und Schmerzbehandlungen eingesetzt (Kay et al., 2001). Derzeit ist nur ein Protokoll in der klinischen Phase registriert (<http://www.wiley.com/wileychi/genmed>, Stand 25. Mai 2000). Die Ergebnisse der Tierversuche werden jedoch zu weiteren klinischen Untersuchungen führen. Jedoch muß der Vektor und das Produktionssystem noch weiter verbessert werden.

1. 1. 2. 4. Retrovirale Vektoren

Die allgemein als retrovirale Vektoren bezeichneten Gentransfer-Vehikel leiten sich von der Unterfamilie der Onkoretroviren ab. Die Familie der Retroviren umfaßt jedoch neben den Onkoretroviren noch zwei weitere Unterfamilien, die Lentiviren und die Spumaviren. Spricht man im Zusammenhang mit Genterapie von Retroviren, sind Onkoretroviren gemeint, während Vektoren mit lentiviralem Ursprung als Lentiviren bezeichnet werden.

Retroviren sind mit einer Lipidmembran umhüllte Partikel, die ein Homodimer einer linearen, einzelsträngigen RNA mit positiv Orientierung als Genom von 7 – 11 kb enthalten. Nach dem Eintritt in die Zelle wird das RNA-Genom revers transkribiert zu einer doppelsträngigen DNA, die in das Zellchromatin integrieren kann. Das Genom besteht aus den Genen *gag*, *pol*

und *env*, die für die Strukturproteine, Nukleinsäure Polymerase/Integrase und die Oberflächen-Glycoproteine kodieren. Flankiert werden diese Informationen von den sogenannten LTRs („long terminal repeat“). Die LTRs und benachbarte Sequenzen sind *cis*-aktive Regionen, die wichtige Funktionen der viralen Expression, Verpackung, reversen Transkription und Integration in das Wirtsgenom beinhalten. Für Vektoren werden die viralen Gene durch exogene DNA ersetzt. Die für eine effektive Produktion, reverse Transkription und Integration notwendigen viralen Proteine werden von separaten Konstrukten exprimiert. Diese können cotransfiziert oder durch sogenannte Verpackungszelllinien bereit gestellt werden. In diesen Zelllinien sind die zur Produktion infektiöser Partikel notwendigen Plasmide stabil integriert worden (Coffin et al., 1996).

Retrovirale Vektoren gehören derzeit zu den effizientesten Werkzeugen, um Gene in Säugetierzellen einzubringen. Aus diesem Grund ist unter anderem dieser Typ von Vektor auch in den ersten klinischen Untersuchungen zur Behandlung von angeborenen genetisch bedingten Erkrankungen (Blaese et al., 1990, Anderson, 1995) und Krebs (Rosenberg et al., 1990, Osanto et al., 1993, Nabel et al., 1996) angewendet worden. Die gebräuchlichsten retroviralen Vektoren basieren auf dem amphiotrophen Moloney murinen Leukämie Virus (MLV) (Romano et al., 1999). Aufgrund ihrer Eigenschaften, wie zum Beispiel das große Wirtsspektrum des amphiotrophen MLV, die Möglichkeit der Produktion in relativ hohen Titern ($10^6 - 10^7$ infektiöse Einheiten / ml) und die lang anhaltende Transgen-Expression nach Integration in das Wirtsgenom, sind diese Vektoren besonders geeignet für die *in vitro* Zelltransduktion.

1. 2. Lentiviren

Die Lentiviren sind eine von drei Unterfamilien der Retroviridae. Neben den Lentiviren unterscheidet man noch in Onkoretroviren und Spumaviren. In jeder der Subfamilien gibt es Vertreter, die humane Zellen infizieren können und teilweise ein breites Spektrum an pathogenem Potential aufweisen. Dieses Spektrum reicht von keiner Erkrankung (Spumaviren) über Krebs (HTLV) bis hin zu Immundefizienzen (HIV) und neurologischen Defekten (HIV, HTLV). Lentiviren sind prinzipiell immer assoziiert mit chronischen Erkrankungen des Immunsystems und des zentralen Nervensystems (Tang et al., 1999; Modrow und Falke, 1997).

Der grobe Partikelbau, die grundlegende Genomorganisation und die Fähigkeit das einzelsträngige RNA-Genom in doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese in das Genom der infizierten Zelle zu integrieren, sind bei verschiedenen Vertretern der Retroviren ähnlich. Die Biologie der Retroviren wird deshalb im folgenden am Beispiel des Lentivirus HIV-1 beschrieben.

1. 2. 1. Morphologie der Lentiviren

Die infektiösen Partikel der Retroviren haben einen Durchmesser von etwa 100 nm und einen sehr ähnlichen Aufbau. Die das Capsid umgebende Hüllmembran, die auch „Envelope“ genannt wird, leitet sich von der Plasmamembran einer Zelle ab. In dieser Hüllmembran eingebettet ist das Transmembranprotein gp41, das extern nicht kovalent assoziiert ist mit dem Glycoprotein gp120. Mit der Innenseite der Hüllmembran sind die Matrixproteine p17 über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste verbunden. Im Inneren des Viruspartikel befindet sich das Viruscapsid, das auch als „Core“ bezeichnet wird und je nach Virustyp eine ikosaedrische oder konische Form aufweist. Das Capsid der Lentiviren ist konisch und besteht aus dem Capsidprotein p24. Im „Core“ befinden sich zwei lineare einzelsträngige RNA-Genome, die nicht miteinander verbunden sind. Die RNA wird vom Nukleocapsidprotein p7 komplexiert. Sogenannte Linkproteine (p6) bilden die Verbindung vom „Core“ zur Hülle. Im Capsid befinden sich außer dem Virusgenom noch die Enzymmoleküle Reverse Transkriptase (RT), Integrase und Protease (Modrow und Falke, 1997).

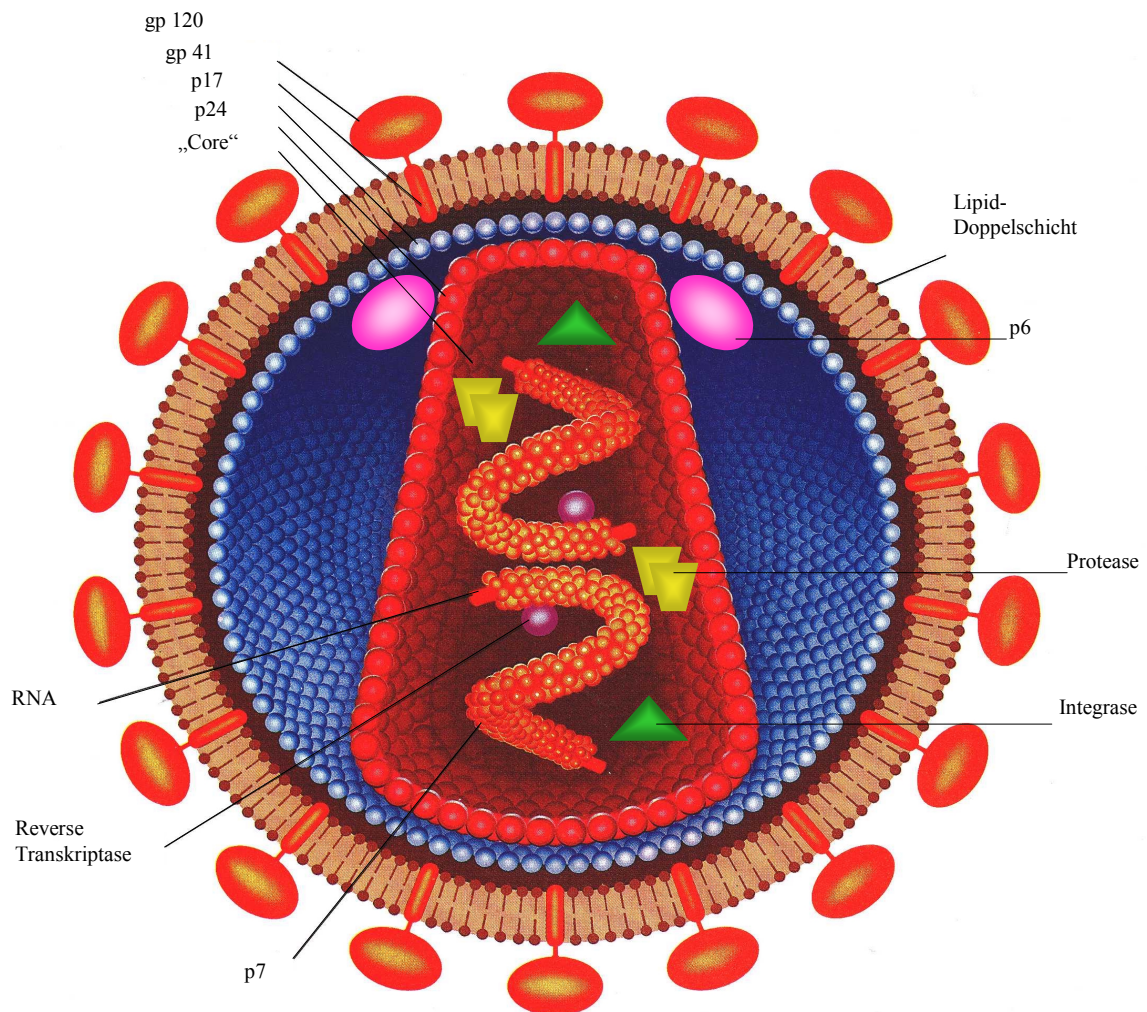
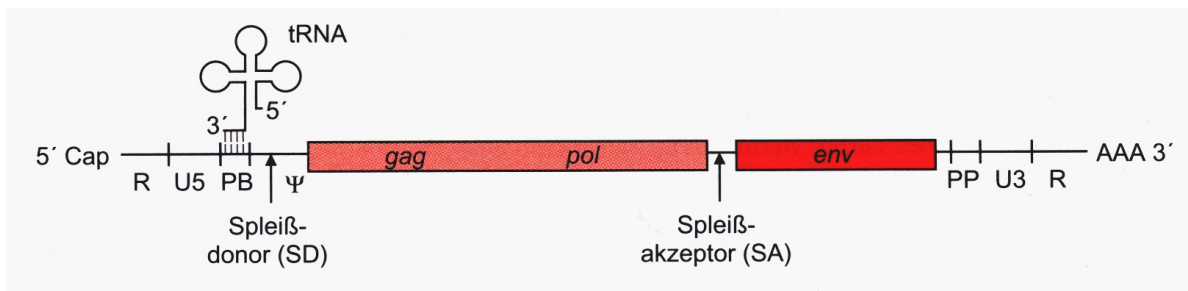


Abb. 1-3: Aufbau eines Retroviruspartikel am Beispiel des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1). Erläuterungen siehe obigen Text. (Nach Darnell, Lodish und Baltimore, 1994).

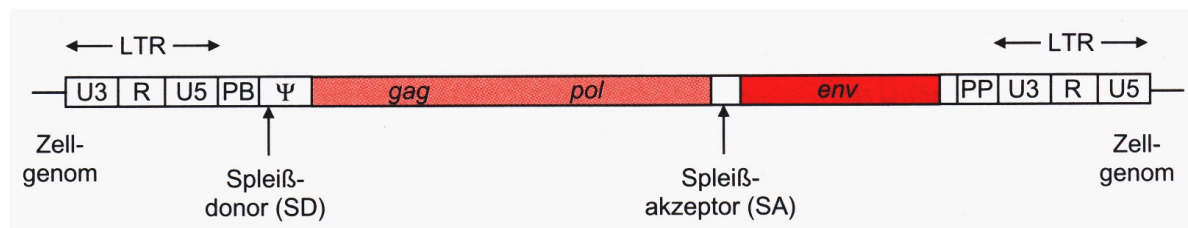
1. 2. 2. Genomaufbau des HIV-1

Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA mit einer 5'Cap-Struktur und einer 3' Polyadenylierung, den Charakteristika einer eukaryontischen mRNA. Je nach Virustyp hat das Genom eine Länge von etwa 7 kb (MLV), 9,2 kb (HIV) oder 12 kb (HSRV, humanes Spumaretrovirus). Die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* sind allen Retroviren gemeinsam. Lentiviren besitzen darüber hinaus eine Fülle von regulatorischen (*tat*, *rev*) und akzessorischen (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) Genen. (Modrow und Falke, 1997)

A. RNA-Genom des infektiösen Viruspartikel



B. Integrierte Provirus-DNA



C. Genomaufbau des humanen Immundefizienzvirus

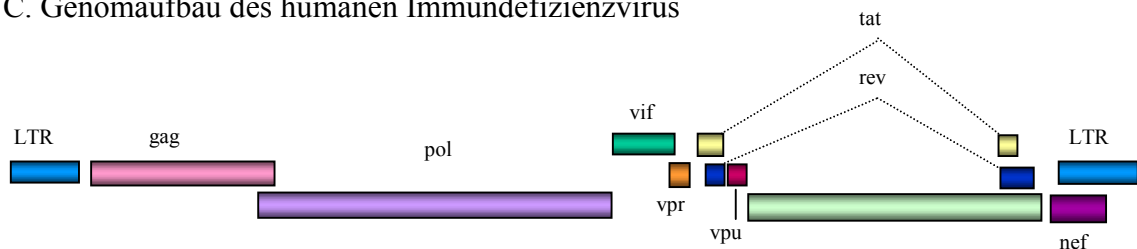


Abb. 1-4: Genomorganisation der humanen Retroviren. A) Allgemeines Schema des RNA-Genom von Retroviren. B) Allgemeine Darstellung der integrierten Provirus-DNA von Retroviren. C) Genomaufbau des HIV-1. (Aus und nach Modrow und Falke, 1997).

Das *gag*-Gen wird ungespleißt translatiert und erst nachträglich in Matrixprotein, Capsidprotein und Nukleocapsidprotein sowie diverse zusätzliche Polypeptide gespalten. Das Matrixprotein p17 ist essentiell für den Viruszusammenbau und die Infektion nicht-teilender Zellen (Gallay et al., 1995 & 1996). Das Capsidprotein p24 bildet den hydrophoben „Core“ und ist wichtig für die Assemblierung und die Reifung des Virus. Das Nukleocapsidprotein p7 komplexiert stöchiometrisch die RNA und bleibt im Virion eng mit ihr assoziiert. Die Funktion der kleinen, zusätzlichen Polypeptide ist weitgehend unbekannt (Klimatcheva, 1999).

Die für die Virusreplikation notwendigen Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase werden vom *pol*-Gen codiert. Die Protease schneidet während der Virusreifung die als Polyproteine translatierten Produkte der *pol*- und *gag*-Gene in ihre Bestandteile. Die

Reverse Transkriptase enthält die drei verschiedenen Aktivitäten einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase und die einer RNase (RNaseH). Die als Endonuclease und Ligase aktive Integrase gewährleistet eine Integration in das Wirtsgenom (Modrow und Falke, 1997; Coffin, Hughes und Varmus 1997).

Für die Bindung an und den Eintritt in die Wirtszelle ist das vom *env*-Gen codierte Glycoprotein gp160 notwendig. Dieses wird beim Zusammenbau in die transmembrane Komponente gp41, die eine Fusion des Partikel mit der Zellmembran des Wirtes gewährleistet, und gp120, die spezifisch zelluläre Rezeptoren bindet, zerlegt (Klimatcheva, 1999).

Die nach der viralen Integration als erstes exprimierten Gene sind die regulatorisch wirksamen *tat*, *rev* und das akzessorische *nef* (Klimatcheva, 1999). Die ersten beiden sind essentiell. Der von *rev* („regulator of viral expression“) codierte Regulator der Expression von viralen Proteinen, das *Rev*-Protein, interagiert mit einer als RRE („rev responsive element“) bezeichneten, regulatorisch wirksamen RNA-Sequenz. Diese hat eine ausgeprägte Sekundärstruktur. Durch Bindung des Adapterproteins wird die RNA in einer ungespleißten beziehungsweise einfach gespleißten Form für einen Export aus dem Kern in das Zytosol markiert. Der Regulator enthält auch sogenannte NES Sequenzen („nuclear export signal“), die eine Wechselwirkung mit den Kernporen erlauben (Berchtshold et al., 1995; Dillon et al., 1990; Le et al., 1990; Olson et al., 1991). Der Export ungespleißter mRNA ist Voraussetzung für die Translation der Strukturgene *gag*, *pol* und *env*, sowie der Produktion von RNA-Genomen für die neu entstehenden Viruspartikel (Klimatcheva et al., 1999). Die Erhöhung der Transkription erfolgt durch *Tat* („transactivator of transcription“) hauptsächlich auf Ebene der Elongation. Durch Bindung von *Tat* an TAR („transcriptional activator responsive element“), wie RRE eine RNA Sekundärstruktur, können weitere, zelluläre Proteine an die integrierte virale DNA gebunden werden. Dieser Komplex induziert die Phosphorylierung und damit die Aktivierung zellulärer PolymeraseII, was zur Steigerung der Transkriptionsrate führt.

Die akzessorischen Proteine *Vif*, *Vpr*, *Vpu* und *Nef* sind für die Virusreplikation *in vitro* nicht essentiell.

Die Infektiosität der Virionen in primären T-Zellen und nicht permissiven Zelllinien wird durch *Vif* („viral infectivity factor“) gesteigert. Dieser Faktor ist membranassoziiert und colokalisiert mit dem *Gag*-Protein.

Vpr („viral protein R“) agiert als schwacher Transaktivator (Ogawa et al., 1989; Cohen et al., 1995). Nachgewiesen wurde auch eine Beteiligung an der Infektion ruhender Zellen, da dieses Protein sogenannte NLS Sequenzen aufweist (Brukinsky et al. 1997). Diese ermöglichen den aktiven Transfer des Präintegrationskomplexes (PIC, „preintegration complex“) aus DNA und Proteinen in den Kern. Ferner wurde im Zusammenhang mit diesem Protein eine Blockierung des Zellzykluses in der G2-Phase und Apoptose beobachtet (He et al., 1995; Poon, 1998).

Das Protein *Vpu* („viral protein unique“) wird nur von HIV-1 codiert. Dieses Polypeptid fördert die Degradierung von CD4-Oberflächenmolekülen („cluster of differentiation“) im endoplasmatischen Reticulum und fördert dadurch den Transport der *Env*-Proteine an die Zellmembran. Außerdem bewirkt es die Abnahme von MHC-I („major histocompatibility complex“) Molekülen auf der Oberfläche der Zellen, und verhindert somit eine Erkennung durch zytotoxische T-Zellen (Klimbait et al., 1990; Göttlicher et al., 1989).

Das vierte akzessorische Protein *Nef* („negativ factor“) führt ebenfalls zur Degradierung der CD4-Moleküle und der Abnahme von MHC-I Molekülen auf der Zelloberfläche. Dadurch wird die Infektiosität der viralen Partikel auf Ebene der proviralen DNA-Synthese gefördert (Klimatcheva et al., 1999).

Diese komplexen codierenden Regionen werden 5' und 3' flankiert von regulatorisch, *cis*-aktiven Sequenzen, die für die reverse Transkription und Integration wichtig sind. Die sogenannte R-Region liegt am 5' Ende nach der Cap-Struktur und am 3' Ende vor dem polyA-Schwanz. Diese Region markiert 5' den Start der mRNA. An die R-Region schließt sich die U5-Region an, die wichtige Sequenzen für die Integration enthält. Darauf folgend kommt der PB-Bereich („primr binding“), der an der Initiierung der Minusstrang Synthese beteiligt ist. Zwischen der PB-Sequenz und dem *gag* Start befindet sich die „Leader“-Sequenz. Diese enthält eine Spleißdonor-Stelle (SD), sowie die Ψ -Region, die ein Verpackungssignal für ungespleißte Genomkopien in neue Partikel ist. Am 3' Ende befindet sich eine U3-Region, die Promotoren und *cis*-aktive Elemente für den integrierten Provirus enthält. Dieser Region vorgeschaltet ist der Polypurintrakt, welcher für die Plusstrang-Synthese notwendig ist. In 3' Richtung hinter der U3-Region befindet sich nochmals die R-

Region, der der polyA-Schwanz folgt. Nach der reversen Transkription wird das virale Genom als doppelsträngige DNA integriert. In diesem Provirus flankieren die Genen die sogenannte LTRs, die sich aus der Sequenzfolge von U5-R-U3 zusammensetzen (Modrow und Falke, 1997).

1. 2. 3. Replikationszyklus der Lentiviren

Die Replikation der Lentiviren beginnt mit der Anbindung eines parentalen Virus an definierte Rezeptoren auf einer für den Virus empfänglichen Zelle. Die Wechselwirkung der Rezeptoren mit Teilen der viralen Hüllproteinen führt zur Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran und dem Eintritt des „Core“ in das Zytoplasma. In der folgenden reversen Transkription entsteht eine doppelsträngige DNA Kopie des Virusgenoms. Diese Kopie wird in den Zellkern transportiert und integriert dort in die chromosomale DNA. Das entstandene Provirus wird dann durch die zelluläre DNA-abhängigen RNA Polymerase II transkribiert. In Folge der Transkription entstehen zunächst nur gespleißte mRNA-Produkte, die im Zytoplasma translatiert werden. Diese regulatorisch wirksamen Peptide können dann wieder in den Zellkern gelangen, wo sie eine verstärkte Transkription und eine Bildung ungespleißter und einfach gespleißter mRNA Produkte bewirken. Diese dienen nach dem Transport in das Zytoplasma zur Transkription der mRNA der Strukturproteine und der akzessorischen Proteine. Die viralen Proteine und die als neue Virusgenome dienenden Kopien ungespleißter mRNA lagern sich zusammen und gelangen an die Zellmembran. Hier werden unreife Partikel durch Ausknospung freigesetzt. Danach entstehen infektiöse Partikel durch Reifung (Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

Der schematische Ablauf des lentiviralen Replikationszyklus ist in Abbildung 1-5 dargestellt. In den folgenden Abschnitten werden die Einzelschritte der Replikation von HIV-1 erläutert.

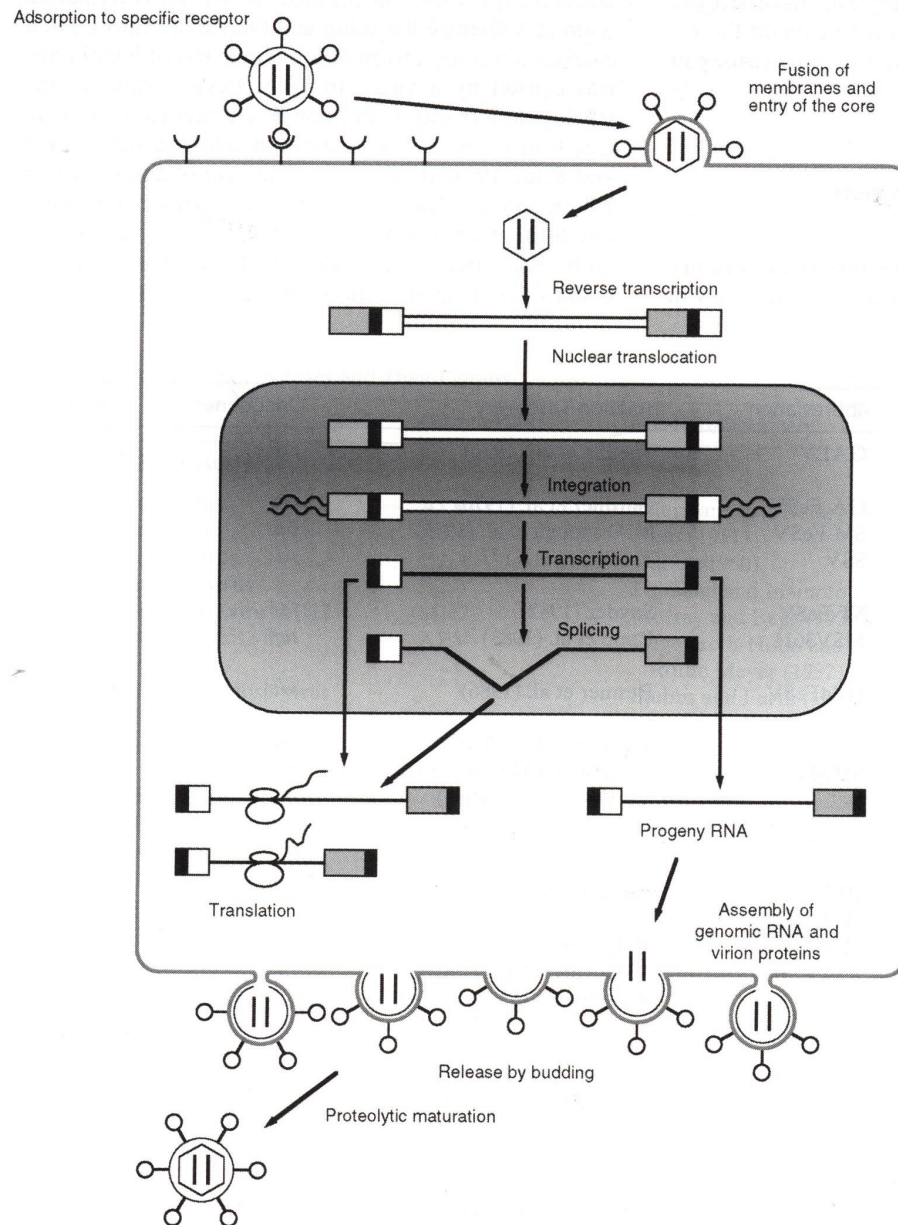


Abb. 1-5: Lentiviraler Replikationszyklus. (Aus Coffin, Hughes und Varmus, 1997)

1. 2. 3. 1. Anbindung und Eintritt in die Zelle

Die Bindung an die Zielzelle erfolgt über die Wechselwirkung der viralen Hüllproteine mit spezifischen Rezeptoren auf der Zellmembran, die das Ziel für den Virus definieren. In Primaten infizieren Lentiviren Helfer-T-Lymphozyten, Makrophagen, Mikroglia, dendritische und Langerhanszellen durch Interaktion mit CD4-Rezeptoren und einem von mehreren Chemokinrezeptoren. Am häufigsten wurden Wechselwirkungen mit den CCR5- und CXCR4-Rezeptoren beobachtet (Zaitseva et al., 1997; Bell, 1998). CD4 ist der primäre Rezeptor für den Eintritt in die Zelle, aber es wird noch ein sekundärer Rezeptor benötigt (Dalglish et al., 1984). Durch diesen Corezeptor ist ein Tropismus der Viren gegeben. Dieser

äußert sich beispielsweise durch die präferentielle Infektion von T-Lymphozyten (T-trop), wenn der Rezeptor für C-C Chemokine (CCR5) involviert ist, oder die bevorzugte Infektion von Makrophagen/Monozyten (M-trop), wenn der CXC-Chemokinrezeptor (CXCR4) beteiligt ist (Tang et al., 1999). Das extern liegende Hüllprotein gp120 und das transmembrane gp41 bilden oligomere Strukturen. Die Interaktion von CD4 mit gp120 bewirkt bei diesem eine Konformationsänderung, bei der eine Bindungsstelle für einen Chemokinrezeptor generiert wird (Trkola et al., 1996; Wu, 1996). Hierbei ist die hypervariable Region V3 die Schlüsselstelle für die Bindung und Selektion des Chemokinrezeptors (Tizzuto, 1998). Die durch diese Wechselwirkungen bedingten Konformationsänderungen führen auch zur Demaskierung der Ektodomäne von gp41. Dieser Vorgang führt dann unwiderruflich zur Verschmelzung von Virushülle und Zellmembran. Die Folge ist dann die Freisetzung des „Core“ in das Zytoplasma.

1. 2. 3. 2. Reverse Transkription

Die reverse Transkription beginnt, wenn das Virus-„Core“ in das Zytoplasma entlassen wird. Durch eine komplexe Reihe von Schritten wird mittels Reverser Transkriptase (RT) eine lineare doppelsträngige virale DNA generiert.

Der erste Schritt, die Minusstrang-DNA Synthese, wird durch Benutzen einer als Primer-RNA bezeichneten tRNA initiiert, die mit ihrem 3' Ende an die Primer-Bindungsstelle (PBS) am 5' Ende des Virusgenoms bindet. Die Minusstrang-DNA Synthese läuft bis zum 5' Ende des viralen RNA-Genoms. Das entstandene DNA-Intermediat hat eine Länge von 100 – 150 bp und wird auch als Minusstrang „strong stop“ DNA (-sssDNA) bezeichnet. Dann wird durch die RNaseH Aktivität der RT die RNA des Hybridstückes aus RNA und -sssDNA degradiert. Der nächste Schritt ist der Erststrang-Transfer, bei dem die -sssDNA an das 3' Ende des RNA-Genom gebunden wird. Die Bindung erfolgt an die komplementäre R-Region, die sich an beiden Enden befindet. Nach dem Transfer erfolgt die Vollendung der Minusstrang-Synthese, die mit dem Abbau der viralen RNA-Vorlage durch die RNaseH-Aktivität einher geht. Dieser Abbau ist jedoch nicht vollständig. Das RNA-Genom enthält einen kurzen Polypurintrakt (PPT) der resistent gegen die RNaseH ist. Diese Stelle dient als Start für die Plusstrang-DNA-Synthese. Vom PPT ausgehend wird zunächst die als Plusstrang strong stop DNA (+sssDNA) hergestellt. Sie umfaßt die U3, R und U5 Region der

5' LTR sowie die PBS des entstehenden Provirus. Durch die RNaseH werden die noch verbliebenen RNA-Fragmente der Primer-RNA und des PPT abgebaut. Die Anheftung der komplementären Primer-Bindungsstellen der –sssDNA an die der +sssDNA wird als Zweitstrang Transfer bezeichnet. Die Synthese des Plus- und Minusstranges wird komplettiert, indem jeder Strang als entsprechende Vorlage für den anderen Strang dient (Coffin, Hughes und Varmus, 1997). Diese Vorgänge sind in Abbildung 1-6 schematisch dargestellt.

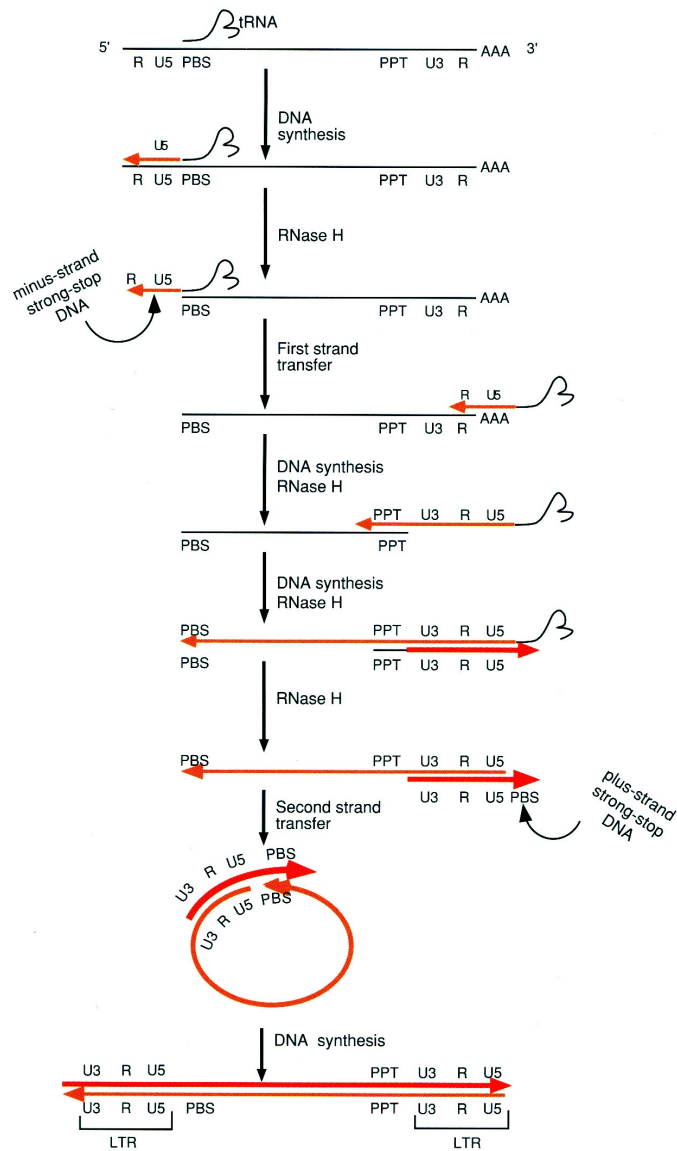


Abb. 1-6: Prozeß der reversen Transkription. (Aus Coffin, Hughes und Varmus, 1997)

1. 2. 3. 4. Integration

Die Integration von Retroviren im allgemeinen wird *in vitro* durch einen großen Nukleoproteinkomplex, der als Präintegrationskomplex (PIC) bezeichnet wird, vermittelt. Retroviren, die nicht zu den Lentiviren zählen, brauchen die mit einer Zellteilung verbundene Auflösung der Kernmembran, um in Kernkompartimente vorzudringen. Lentiviren können aktiv unter Energieverbrauch in den Kern eingeschleust werden. Der HIV-1-PIC umfaßt eine stark kondensierte Form der viralen Nukleinsäure und einige virale Proteine (Matrixprotein, RT, Integrase und Vpr) (Bukrinsky et al., 1997; Gallay et al., 1996 & 1995). Capsid und Nukleocapsid dissoziieren während des als „uncoating“ bezeichneten Prozesses im Zytoplasma. Der Kernimport wird durch die mit NLS („nuclear localization site“) abgekürzten Signalsequenzen vermittelt, die Bestandteil des Matrixproteins, der Integrase und des *Vpr*-Protein sind. Diese Sequenzen können mit Proteinen der Kernporen wechselwirken und bedienen sich somit der zellulären Importmaschinerie (Klimatcheva et al., 1999).

Darüber hinaus sind noch *cis*-aktive Sequenzen bekannt, die eine Rolle beim Import der revers transkribierten Virus-DNA eine Rolle spielen. Charneau et al. (1994) fanden heraus, daß es bei dem komplexen Vorgang der reversen Transkription an einer zentralen Kopie des Polypurintraktes (cPPT) zu einer weiteren Initiation und Termination bei der Plusstrang-Synthese kommt bei der ein Plusstrang Überhang entsteht, der zentrale DNA „flap“. Dieser agiert als eine *cis*-Determinante bei dem Import von HIV-1-DNA in den Kern. Die virale lineare DNA von Wildtypviren wird vollständig in den Kern importiert, wo sie in das Wirtsgenom integriert oder zirkularisiert vorliegt. Im Gegensatz dazu wird mutierte virale DNA, welcher der „flap“ infolge von Mutationen im cPPT fehlt, in den infizierten Zellen als nicht integrierte lineare DNA in Nachbarschaft zur Kernmembran akkumuliert. Dieser Importdefekt kann durch Reinsertion der korrekten Sequenz wieder behoben werden und führt so in HIV-1 Vektoren zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz, die dem Wildtypvirus entspricht (Zennou et al., 2000).

Im Zellkern beginnt dann die Integration durch die virale Integrase. Diese entfernt an den 3' Enden zwei Nukleotide, so daß 3' freie OH-Gruppen und 5' überstehende Enden entstehen. Im nächsten Integrase-katalysierten Schritt wird die zelluläre DNA an willkürlichen Stellen geschnitten. Hierbei entstehen an gegenüberliegenden Strängen 5' überstehende Enden, die je nach Virustyp vier bis sechs Basen umfassen. Die 3' Enden des Virusgenoms werden dann durch das virale Enzym mit 5' Enden der zellulären DNA verbunden. Im Anschluß werden

die 5' überstehenden, viralen Enden entfernt, die einzelsträngigen Übergänge durch das zelluläre Reparatursystem aufgefüllt und durch die Ligase zu Doppelsträngen geschlossen. Nachdem das Provirus integriert ist, kann mit der Transkription und Synthese viraler Proteine begonnen werden (Modrow und Falke, 1997; Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

1. 2. 3. 5. Transkription und virale Proteinsynthese

Zu den frühen Transkripten zählen die durch zweifaches Spleißen entstandenen Proteine *Tat*, *Rev* und *Nef*. Die Akkumulation von *Tat* und *Rev* führt zur Entstehung der späteren Transkripte. *Tat* führt als Transaktivator zu einer gesteigerten Transkriptionsrate, während *Rev* zu einer Anhäufung von einfach- und ungespleißten RNAs im Zytosol führt (Klimatcheva et al., 1999). Das Resultat ist die Translation von Strukturproteinen und akzessorischen Polypeptiden. Ungespleißte RNA-Kopien dienen als neue Virusgenome. Diese lagern sich mit Proteinkomponenten zusammen und werden an die Zytoplasmamembran transportiert. Die Hüllproteine entstehen im endoplasmatischen Reticulum, während die übrigen Proteine an freien Ribosomen entstehen. An der Membran kommt es dann zum Zusammenbau und der Freisetzung neuer Viruspartikel (Modrow und Falke, 1997).

1. 2. 3. 6. Virusassemblierung und Freisetzung

Die translatierten Produkte der Gene *gag* und *gag-pol* werden aminoterminal myristyliert und durch zelluläre Faktoren an die Zellmembran transportiert. Hier findet die Morphogenese der neuen Viruspartikel statt. Die Nukleocapsidproteine interagieren mit der im Virusgenom enthaltenen Signalsequenz Ψ und markieren sie so für die Verpackung. Durch den Kontakt mit der RNA stülpen sich Membranteile aus und bilden Vesikel, die sich abschnüren. Das leicht saure Milieu in den unreifen Partikeln sorgt für eine optimale Aktivität der Protease, die sich zunächst autokatalytisch aus dem Polyprotein herausschneidet. Darauf folgt die Prozessierung der anderen Vorläuferproteine. Gleichzeitig finden Umlagerungen statt, die eine Ausbildung des konischen Capsids erlauben. Am Ende der Reifung entstehen die fertigen, infektiösen Partikel (Modrow und Falke, 1997).

1. 2. 4. Lentivirale Vektoren

1. 2. 4. 1. Anwendung lentiviraler Vektoren

Für die Anwendung von lentiviralen Vektoren im Rahmen einer Gentherapie bei humanen Erkrankungen gibt es vielfältige Möglichkeiten. Zum einen ist bei der Verwendung von pseudotypisierten Partikeln das Wirtsspektrum nahezu unbegrenzt. Zum anderen sind ruhende Zellen häufig relevante Ziele der Gentherapie, die nur durch lentivirale Vektoren transduziert³ werden können. Darüber hinaus wird die Stabilität des Transgens durch die chromosomale Integration gewährleistet. Lentivirale Vektoren bieten für eine Fülle von genetisch bedingten metabolischen Erkrankungen, viralen Infekten und Krebs eine Möglichkeit der Behandlung. So können beispielsweise angeborene genetische Defekte wie zystische Fibrose, klassische Phenylketonurie und Morbus Gaucher durch lentivirale Vektoren therapiert werden, da es sich hier um Einzelgendefekte handelt (Klimatcheva et al., 1999). Ein HIV-1 basierendes Konstrukt wurde bereits erfolgreich zur Behandlung von zystischer Fibrose im Tiermodell getestet (Goldmann et al., 1997). Bei bestimmten Typen von Krebserkrankungen könnten lentivirale Partikel hilfreich sein, da es Tumorzellen gibt, die aufgrund von Hypoxie oder fehlender Vaskularisierung eine beschränkte oder gar keine Proliferation zeigen. Es wurden auch Gentherapieversuche vorgeschlagen, die Antisense-RNA, Ribozyme und transdominante Proteine gegen HIV-Replikation beinhalten.

In der nachstehenden Tabelle sind Beispiele für Gentherapien mittels Lentiviren aufgelistet.

³ Transduktion – auch Infektion. Einbringen von Fremd-DNA, beispielsweise mit Retroviren, die durch Integration ins Chromosom praktisch zu einer Persistenz führt.

Tabelle 1-2: Fehlfunktionen und lentivirale Vektoren, Ziele und Werkzeuge für die Gentherapie (Klimatcheva et al., 1999). (SCID – "severe combined immunodeficiency", CGD – "chronic granulomatous disease", SIV – "simian immunodeficiency virus", FIV – "feline immunodeficiency virus").

Funktionsstörung	Zielzelle	Basis des verwendeten lentiviralen Vektors	Ref.
I. Angeboren			
Zystische Fibrose	Atemwegsepithelien	Humane Zellen: HIV-1	1
Retinitis pigmentosa	Retinale Photorezeptorzellen	Humane Zellen: HIV-1	2
Hämatopoetische Störungen: Sichelzellanämie, β -Thalassämie; lysosomale Speicherstörung: Mucopolysaccharidose; SCID; CGD	Vorläufer der roten Blutzellen, Makrophagen, Lymphozyten	Humane Zellen: HIV-1, HIV-1/HIV-2, HIV-2, HIV-1/SIV, FIV	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13
Morbus Gaucher	Knochenmarkzellen, Makrophagen	Humane Zellen: HIV-1/HIV-2, HIV-1/SIV, FIV	3, 6, 7
Familiäre Hypercholesterinämie	Leberzellen	Rattenzellen: HIV-1	10
II. Erworben			
HIV-Infektion	Meist T-Lymphozyten und Makrophagen	Humane Zellen: HIV-1/HIV-2, HIV-1/SIV, FIV	3, 6, 7
Neurodegenerative Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson)	Hirngewebe, Neuronen, Gliazellen	Nagerzellen: HIV-1, HIV-1/SIV; Humane Zelle: FIV	3, 11, 12, 7
Kardiovaskuläre Erkrankungen	Endothelzellen, Herzmuskelzellen	Humane Zellen: HIV-1	12
Krebs	Krebszellen verschiedener Gewebe (Leber, Hirn)	Verschiedene Vektoren (s. o.)	s. o.

1. Goldman M. J., Lee P. S., Yang J. S. und Wilson J. M. ; 1997
2. Miyoshi H., Takahaschi M., Gage F. H. und Verma I. M.; 1997
3. White S. M. et al.; 1999
4. Akkina R. K., Walton R. M.; Chen M. L., Li Q. X., Planelles V. und Chen L. S.; 1996
5. Poeschla E. M., Gilbert J., Li X., Huang S., Ho A. und Wong-Staal F.; 1998
6. Corbeau P., Kraus G. und Wong-Staal F.; 1998
7. Poeschla E. M., Wong-Staal F. und Looney D. J.; 1998
8. Sutton R. E., Wu H. T., Rigg R., Bohnlein E. und Brown P. O.; 1998
9. Johnston J. und Power C.; 1999
10. Kafri T., Blömer U., Peterson D. A., Gage F. H. und Verma I. M.; 1997
11. Naldini L. et al.; 1996
12. Mochizuki H. et al.; 1998
13. Saulnier S. O. et al., 2000

1. 2. 4. 2. Entwicklung HIV-1 basierender Vektoren

Vektoren, die sich vom humanen Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) ableiten, wurden ursprünglich nicht für die Gentherapie, sondern für Studien über die Infektiosität dieser Partikel entwickelt (Page et al., 1990; Landau et al., 1991). Bei diesen ersten Vektoren wurde die *env*-Region weiträumig deletiert, und an diese Stelle ein Transgen eingebaut. Unterschiedlichste *Env*-Proteine wurden dann zur Pseudotypisierung cotransfiziert⁴. In nachfolgenden Experimenten (Bamerine et al., 1994; Planelles, 1995) wurden 2 Plasmidsysteme zum Studium des viralen Wirtsspektrums benutzt, und in diesem Zusammenhang die biologischen Konsequenzen auf die HIV-1 Integration untersucht. Buchschacher und Panganiban (1992) entwickelten ein 2 Plasmidsystem, in dem erstmals die genetische Information des Virus aufgeteilt wurde. Das Verpackungskonstrukt war in der *Env*-Region deletiert, während das Transgenkonstrukt alle notwendigen, cis-aktiven Sequenzen enthielt. Eine Lösung für das generelle Problem der Gentherapie, der geringe Titer an Viruspartikeln, wurde durch die Pseudotypisierung mit Protein G des Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV-G) gefunden (Akkina et al., 1996; Reiser et al., 1996). Dieses Glycoprotein ermöglicht den Eintritt in die Zielzelle mittels rezeptorvermittelter Endozytose. Die mit VSV-G pseudotypisierten Viren sind so stabil, daß sie eine Konzentrierung zum Beispiel mittels Ultrazentrifugation erlauben (Roberts et al., 1999).

Mit dem fortschreitenden Wissen über die Rolle von *cis*- und *trans*-aktiven Sequenzen wurde die zweite Generation von HIV-basierenden Vektoren konstruiert, mit dem Ziel, Vehikel für den Gentransfer zu schaffen (Parolin et al., 1994). Parolin und Kollegen (1994) entwickelten dazu ein Verpackungssystem, bei dem die Strukturgene auf zwei Plasmide aufgeteilt wurden. Auf dem ersten Verpackungskonstrukt befanden sich die Gene *gag*, *pol*, *tat* und *vif* unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Cytomegalievirus), während das zweite Konstrukt für *Env* und *Rev* codierte, ebenfalls durch einen CMV-Promotor angetrieben wurde. In beiden Plasmiden wurde das Verpackungssignal Ψ deletiert und die 3' LTR durch die Polyadenylierungssequenz des Simian Virus 40 (SV40) ersetzt. Der Transfervektor für das Transgen enthielt alle cis-aktiven Sequenzen, die für eine effiziente Transduktion notwendig waren. Der Resistenzmarker Neomycin Phosphotransferase (neoR) stand unter der Kontrolle einer LTR des ecotrophen Maus Leukämie Virus (MLV). Naldini et al. (1996) entwickelten ein ähnliches System, das drei Konstrukte verwendet: (1) Verpackungskonstrukt, (2) „Envelope“-Konstrukt, (3) Transfervektor.

⁴ Transfektion – Transfer nackter DNA in Zellen. (Modrow und Falke, 1997)

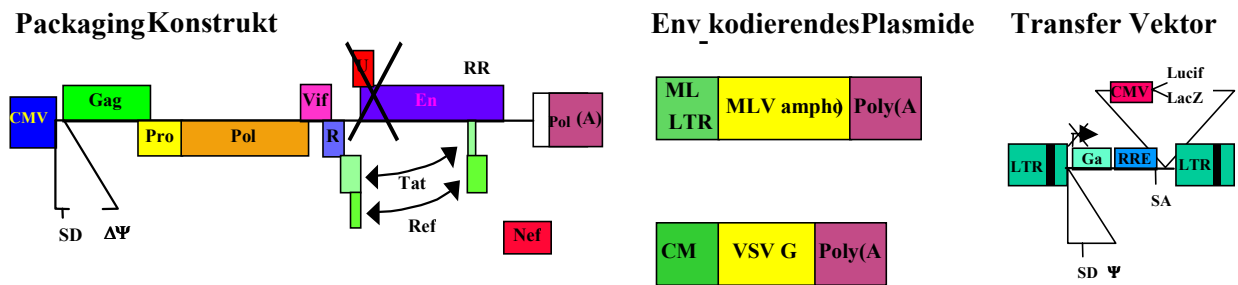


Abb. 1-7: Schema des 3-Plasmid Systems von Naldini et al. (1996).

Mit Hilfe dieser Vektoren konnten wachstumsarretierte Zellen, mit Ausnahme von ruhenden T-Zellen, erfolgreich infiziert werden, wobei die MLV pseudotypisierter Viren eine signifikant niedrigere Effizienz bei der Transduktion zeigten. Kafri et al. (1994) entwickelten diese Konstrukte weiter. Aus dem Verpackungsplasmid wurden die Informationen für *Vpr* und *Vif* entfernt, während im Transfervektor das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) als ein neues Markergen verwendet wurde.

Auch eine Reihe von anderen Arbeitsgruppen (Zuffrey et al., 1997; Uchida et al., 1998; Mochizuki et al., 1998) entdeckten pseudotypisierte HIV-1 Vektoren als Werkzeuge für den Gentransfer. Eine Anwendung in der Gentherapie ist jedoch immer verknüpft mit der Frage nach der Sicherheit. Kim und Mitarbeiter (1998) untersuchten vor diesem Hintergrund die Notwendigkeit der akzessorischen Proteine *Tat*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu* und *Nef* für die effiziente Produktion von Viruspartikeln. Sie konnten belegen, daß bis auf *Tat* alle anderen Proteine, die häufig auch mit Pathologien verbunden sind, für die *in vitro* Produktion von Viren nicht notwendig sind. Auch *Tat* ist nicht essentiell, wenn man die U3 Region der 5' LTR durch einen konstitutiv aktiven Promotor ersetzt. Trotz der weitreichenden Deletionen blieben die Partikel für teilende und nicht teilende Zellen infektiös. Ende 1998 stellten Dull und Zuffrey eine sogenannte dritte Generation von Vektoren vor. Die Systeme der zweiten Generation beschränkten das Verpackungskonstrukt auf die Gene von *gag*, *pol*, *tat* und *rev*. In der Folgegeneration wurden selbst-inaktivierende Transgenvektoren entwickelt. Bei diesen Vektoren wurde die U3 Region der 3' LTR deletiert, womit im revers transkribierten Provirus keine Promotor- und „Enhancer“-Strukturen mehr enthalten sind. Das bedeutet, daß nach erfolgreicher Integration nur ein Minimum viraler Strukturen transkribiert und translatiert wird, nämlich das durch einen internen Promotor getriebenen Transgen, sowie die folgenden viralen Sequenzen bis zum polyA-Signal. Somit können die Möglichkeiten einer Immunantwort weiter reduziert werden. In der 5' LTR wurden Teilstücke der U3 Region durch ähnliche Sequenzen aus dem CMV oder dem Rous Sarkoma Virus (RSV) ersetzt. Wobei die Variante mit den RSV-Sequenzen die höheren Titer erreichte. Das somit neu

geschaffene Transfervehikel war damit auch unabhängig von *Tat*. Denn dieses benötigt für seine Aktivität das in der U3 Region enthaltene TAR-Element, daß nun deletiert war. Zufferey et al. (1999) konnten dann durch Einbau des postranskriptionell regulierend wirkenden Element des Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus (WPRE) eine Erhöhung der Expression von lentiviral eingeführten Transgenen zeigen. Das WPRE ist eine RNA-Sequenz mit ausgeprägter Sekundärstruktur, die den Export von einfach- und ungespleißter Provirus-RNA in das Zytosol fördert. Dabei ist dieses Element im Gegensatz zum lentiviralen RRE nicht auf ein Adapterprotein (*Rev*) angewiesen, sondern kann direkt mit der zellulären Exportmaschinerie wechselwirken. Dabei konnte Zufferey (1999) zeigen, daß dieses Elemente seine Wirkung am besten in *cis*-Position, hinter dem über einen internen Promotor getriebenen Transgen entfaltet.

Die oben beschriebenen Erkenntnisse sind in die Entwicklung eines lentiviralen Vektorsystems für die Gentherapie der chronischen Granulomatose mit eingeflossen. Dem Bestreben größtmöglicher Sicherheit wurde auf vielfältige Art und Weise Rechnung getragen. Die Notwendigkeit von mehrfachen korrekten Rekombinationsereignissen reduziert die Möglichkeit der Generierung replikationskompetenter Viren. Durch Eliminierung der akzessorischen Proteine wurde das eventuelle Auftreten pathologischer Effekte vermieden. Um die Gefahr einer immunologischen Reaktion durch virale Sequenzen zu reduzieren, wurden die viralen Promotor- und „Enhancer“-Sequenzen entfernt. Das Transgen wird nur durch den internen Promotor angetrieben. Die Gefahr der Aktivierung von Onkogenen durch Insertionsmutagenese bleibt trotzdem bestehen. Moderne Vektorsysteme enthalten nur die notwendigen Sequenzen für eine effiziente Produktion und Integration von Viruspartikeln. Diese können nur einmal eine Zelle infizieren und in die chromosomale DNA integrieren. Die essentiellen Informationen für die Generierung von Nachkommen wurden eliminiert.

Diese Entwicklungen waren stets mit Kritik begleitet worden, da das natürliche humane Immundefizienz Virus in der Regel einen tödlichen Krankheitsverlauf nach sich zieht. Aus diesem Grund sind eine Reihe von anderen Systemen entwickelt worden. So wurden auch Vektoren, basierend auf dem weniger pathogenen HIV-2, entwickelt (Poeschla et al., 1998). Durch sogenannte RNA-Pseudotypen soll das Risiko von homologer Rekombination verringert werden. Hierbei wird heterologe RNA in retrovirale Partikel verpackt (Rizv et al., 1993; Embretson et al., 1987; Corbeau et al., 1998; White et al., 1999; Marthas et al., 1990 & 1993). Auch das feline Immundefizienz Virus (FIV) dient als Grundlage für einen Vektor, da es als Nichtprimaten Virus ein geringes pathogenes Potential für den Menschen trägt. Aber auch andere Nichtprimaten Viren, wie CAEV („caprine arthritis encephalitis virus“) (Mselli-Lakhal et al., 1998) oder EIAV („equine infectious anemia virus“) (Mitchell et al., 1998), werden für die Entwicklung von Transgenvektoren verwendet.

1. 2. 5. Verpackungszelllinien für lentivirale Vektoren

Neben den lentiviralen Vektoren sind auch Verpackungszelllinien zu einem wichtigen Werkzeug des Gentransfers in eukaryontischen Zellen geworden. Sie sind unverzichtbar für die Entwicklung von humanen Gentherapieprotokollen, da transiente Transfektionen nur schwer den stringenten Standards für klinische Versuche zu unterwerfen sind. Dazu birgt die transiente Koftransfektion eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Rekombination unter den eingesetzten Plasmiden, wodurch auch die biologische Sicherheit durch fortschrittliches Vektordesign beeinträchtigt wird (Farson et al., 2001).

Es wurden eine Reihe von Versuchen unternommen, stabile Verpackungszelllinien für HIV abgeleitete Vektoren zu generieren. Hierbei wurden auch zunehmend induzierbare regulatorische Elemente eingesetzt, um die Expression von toxischen Komponenten zu limitieren (Carroll et al., 1994; Yu et al., 1996; Srinivasakumar et al., 1997; Kaul et al., 1998; Kafri et al., 1999). Durch diese Studien, die nicht zu einer Zelllinie mit befriedigender Vektorpartikel-Produktion, Stabilität und biologischer Sicherheit führten, konnten jedoch verschiedene Methoden zur Generierung einer Verpackungszelllinien verglichen werden (Farson et al., 2001). Die aufgezeigten Ansätze führten zu effizienteren und sichereren Verpackungszelllinien, die zusammen mit der fortschreitenden Optimierung im Vektordesign ein weiterer Schritt in Richtung einer möglichen Anwendung für humane Gentherapie-Protokolle bedeuten.

Einige Proteine, die für die Assemblierung von lentiviralen Vektoren notwendig sind, wirken toxisch auf die Zellen in denen sie überexprimiert werden. Dazu gehören VSV-G (Burns et al., 1993), HIV-1 *Vpr* (Bartz et al., 1996), *Tat* (Li et al., 1995), *Rev* (Miyazaki et al., 1995) und Protease (Konvalinka et al., 1995). Um eine sichere und effiziente Produktion an Vektorpartikeln zu ermöglichen, wurde in den neuesten Verpackungszelllinien die Expression der Verpackungs- und Hüllproteine unter die Kontrolle eines tetracyclinabhängigen Systems gestellt. Dieses System wurde von Gossen und Bujard 1995 entwickelt. Hierbei handelt es sich um ein klassisches Operon-Modell. In Anwesenheit von Tetracyclin oder eines Derivates kann der Repressor an den Operator binden und es findet keine Expression des zu regulierenden Gens statt. Wird dem Medium diese Komponente entzogen gibt der Repressor den Operator frei und das gewünschte Gen kann abgelesen, also exprimiert werden.

Eine der jüngsten Verpackungszelllinien, *Lentikat2.54*, wurde von Farson und Mitarbeitern (2001) entwickelt. Um diese Zelllinie zu generieren, wurde ein Verpackungskonstrukt, das die

Sequenzen der HIV-1 *gag-pol*, *tat* und *rev* Gene enthält, stabil in 293G Zellen (Ory et al., 1996) integriert. 293G Zellen exprimieren einen chimären, tetracyclinabhängigen Transaktivator und exprimieren somit tetracyclinabhängig VSV-G. Die Expression der HIV-1 Gene des Verpackungskonstrukts werden ebenfalls über Tetracyclin kontrolliert. Werden die Zellen also in Gegenwart von Tetracyclin oder eines Derivates kultiviert, wird die Expression der HIV-1 und der VSV abgeleiteten Proteine unterdrückt. Durch transiente Transfektion eines Transgenvektors wurden Zellklone für die Produktion lentiviraler Vektoren generiert. Die mehrfache Infektion von *Lentikat2.54* Zellen führte zu virusproduzierenden Zellklonen, die im Titer und in der Transduktionseffizienz vergleichbar oder besser waren, als bei der Generierung von Viruspartikeln mittels transienter Transfektion.

Eine weitere Zelllinie zur stabilen Produktion von lentiviralen Vektoren haben Xu et al. (2001) entwickelt. Sie generierten eine stabile Zelllinie, die Tetracyclin-reguliert hohe Titer von selbst-inaktivierenden (SIN) lentiviralen Vektoren produziert. Die Vorgehensweise zur Herstellung der Verpackungszelllinie SODk1 war ähnlich wie bei *Lentikat2.54*. Auch hier sind ein Hüllproteinkonstrukt und ein Verpackungskonstrukt zunächst so umkonstruiert worden, daß die für die Produktion von Viruspartikeln relevanten Informationen tetracyclinabhängig exprimiert wurden. Zur Generierung von Zellklonen, die dauerhaft SIN Vektor Partikel produzieren, mußten diese umkonstruiert werden. Bei den ursprünglich entwickelten SIN-Vektoren (Zuffrey et al., 1998) wurden die Promotor/“Enhancer“-Sequenzen aus der 3' LTR deletiert. Das führte nach dem einmaligem Zyklus von Transkription, Translation und reverser Transkription dazu, daß das integrierte Provirus keine viralen Promotorsequenzen mehr enthielt. Die Expression des Transgens wurde durch einen internen Promotor getrieben. Bei der Herstellung eines Produktionsklons muß dieser Zyklus jedoch zweimal durchlaufen werden. Zunächst wird die Verpackungszelllinie transient transfiziert und anschließend die Zielzelle mit dem Vektorpartikel infiziert. Ohne eine Promotorsequenz in der 3' LTR können jedoch keine Vektorgenome für die Viruspartikel gebildet werden. Deshalb ersetzten Xu und seine Mitarbeiter (2001) die viralen Promotor/Enhancer Strukturen im Transgenvektor durch ein „*tet-responsive*“ Element in die 3' LTR. Nach einmaligem Durchlauf des Zyklus Transkription, Translation und reverse Transkription enthält das Provirus nun in der 5' LTR einen tetracyclinabhängigen Promotor. Da die Zielzellen jedoch nicht den essentiellen tetracyclinabhängigen Transaktivator exprimieren, kann das Transgen nur abgelesen werden, wenn es über einen internen Promotor verfügt. Somit werden 5' vom internen Promotor liegende Sequenzen nicht mehr abgelesen.

1. 2. 6. Die humanen hämatopoetischen Stammzellen als Zielzellen einer lentiviralen somatischen Gentherapie

Die Anforderungen, die an eine erfolgreiche Gentherapie am Menschen zu stellen sind, umfassen mehrere Punkte. Neben einem effizienten und sicheren Gentransfersystem müssen auch geeignete Zielzellen zur Verfügung stehen. Diese Zellen müssen für eine *in vitro* Gentherapie dem Körper entnehmbar, *in vitro* kultivierbar und modifizierbar sowie funktionsfähig wieder retransplantierbar sein. Nach erfolgtem Gentransfer und Retransplantation sollten diese Zellen das eingeführte Gen an die Nachkommen weitergeben und der Erfolg der Gentherapie im Idealfall lebenslang anhalten. Diese Voraussetzungen werden von Zellen aus dem Knochenmark erfüllt (Koch-Brandt, 1993).

Unter den Zellen im Knochenmark gibt es eine sehr kleine Population, die eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Blutzellbildung (Hämatopoese) spielt. Diese Subpopulation ist aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zusammengesetzt, die die einzigartige Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung besitzen. Dies gewährleistet eine lebenslange kontinuierliche Bildung von Blutzellen aller hämatopoetischer Linien. Aufgrund dieser Eigenschaften sind diese Zellen ein ideales Ziel für die Gentherapie von angeborenen und erworbenen Erkrankungen des hämatopoetischen System, wie Chronische Granulomatose (CGD) oder dem erworbenen Immundefizienz-Syndrom (AIDS) (Nakauchi, 1998). Die pluripotente hämatopoetische Stammzelle und die aus ihr hervorgehenden Zelltypen sind in Abbildung 1-8 dargestellt.

Die Entwicklung von Gentherapie-Strategien zur Korrektur von hämatopoetischen und genetischen Defekten wird durch den bislang ineffizienten Gentransfer in HSCs mit Vektoren erschwert, die sich aus Onkoretroviren ableiten (Woods, 2000). Diese Viren können nur integrieren, wenn sich die Zellen teilen, da sie die Kernmembran nicht passieren können. Für lentivirale Vektoren konnte jedoch gezeigt werden, daß sie ruhende hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen transduzieren können (Sutton, 1999; Uchida, 1998). Auch die langfristige Ansiedlung und Repopulierung von transduzierten CD34⁺-Zellen in subletal bestrahlten NOD/SCID („nonobese diabetic“) Mäusen konnte mit Lentiviren gezeigt werden (Miyoshi, 1999). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß auch pluripotente Stammzellen transduziert werden, die zu einer langfristigen Expression fähig sind. Woods und seine Mitarbeiter (2000) konnten transduzierte humane CD34⁺-Zellen in NOD/SCID Mäusen als Zweitempfänger nachweisen. Diese Mäuse wurden mit Stammzellen aus dem Knochenmark von Erstempfängern behandelt, also bestrahlten Mäusen, denen humane, transduzierte HSCs retransplantiert wurden.

1. 3. Chronische Granulomatose

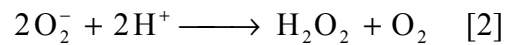
Die chronische Granulomatose (CGD – „chronic granulomatous disease“) ist eine angeborene Störung in der Abwehr von eindringenden Mikroorganismen. Dieser genetische Defekt betrifft Zellen des hämatopoetischen Systems, weshalb diese Erkrankung ein gutes Modell für eine Gentherapie mit HSCs als Zielzellen ist. Eine gestörte Produktion an antimikrobiell wirksamen Oxid-Verbindungen führt zu häufig auftretenden und teilweise lebensbedrohlichen Bakterien- und Pilzinfektionen (Curnutte, 1993). Kennzeichnend für alle Formen von CGD ist die fehlende Superoxid-Produktion in Phagozyten, jedoch sind die genetischen Ursachen und die Pathologie des Defektes sehr heterogen. Dieses Immundefizienz-Syndrom tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 : 250.000 auf und betrifft zu zwei Drittel Jungen (Roos et al., 1996). Weibliche Träger der X-chromosomal gebundenen CGD zeigen nur wenige oder gar keine Symptome, obwohl sie in Einzelfällen nur fünf bis zehn Prozent der Anzahl Oxidase-positiver Neutrophilen aufweisen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß eine lang andauernde Korrektur des Defektes durch Einbringen einer funktionellen Genkopie in einen kleinen Teil der Phagozyten einen erheblichen klinischen Nutzen haben könnte. Die für die Krankheit charakteristischen Infektionen betreffen Organe wie Lunge, Magen-Darm-Trakt, Haut und die in unmittelbarer Nachbarschaft befindlichen Lymphknoten. Die Infektionen können sich auch auf Leber, Knochen und Nieren ausbreiten (Curnutte, 1993). Die ersten Symptome von CGD treten häufig schon während dem ersten Lebensjahr auf, und erkrankte Patienten haben eine reduzierte Lebenserwartung (Curnutte und Babior, 1987).

1. 3. 1. Klinische und biochemische Aspekte der chronischen Granulomatose

Werden phagozytierende Leukozyten (Eosinophile, Neutrophile, Monozyten und Makrophagen) äußeren Reizen, wie opsonisierten Partikeln oder weiteren löslichen Substanzen ausgesetzt, so steigt der Sauerstoffverbrauch um das 4 – 100fache, je nach Stimulus und Meßmethode (Smith und Curnutte, 1991; Curnutte und Barbior, 1987). Dieser als „respiratory burst“ bezeichnete Vorgang wird von dem Flavoenzym NADPH-Oxidase katalysiert. Dieses Enzym überträgt Elektronen von NADPH (Nictotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduzierte Form) auf molekularen Sauerstoff (siehe Reaktion 1).



Die gebildeten Sauerstoffradikale reagieren spontan oder katalysiert durch das Enzym Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid (siehe Reaktion 2).



Das Superoxid kann durch Myeloperoxidase, welche in Neutrophilen vorkommt, zu hypochloriger Säure umgesetzt werden. Alle drei der hauptsächlich generierten Oxid-Verbindungen – O_2^- , H_2O_2 und HOCl – werden zur Abtötung von Mikroorganismen verwendet. Der Ablauf der Phagozytose, Degranulation und der Bildung von Sauerstoffradikalen ist schematisch in Abbildung 1-9 dargestellt.

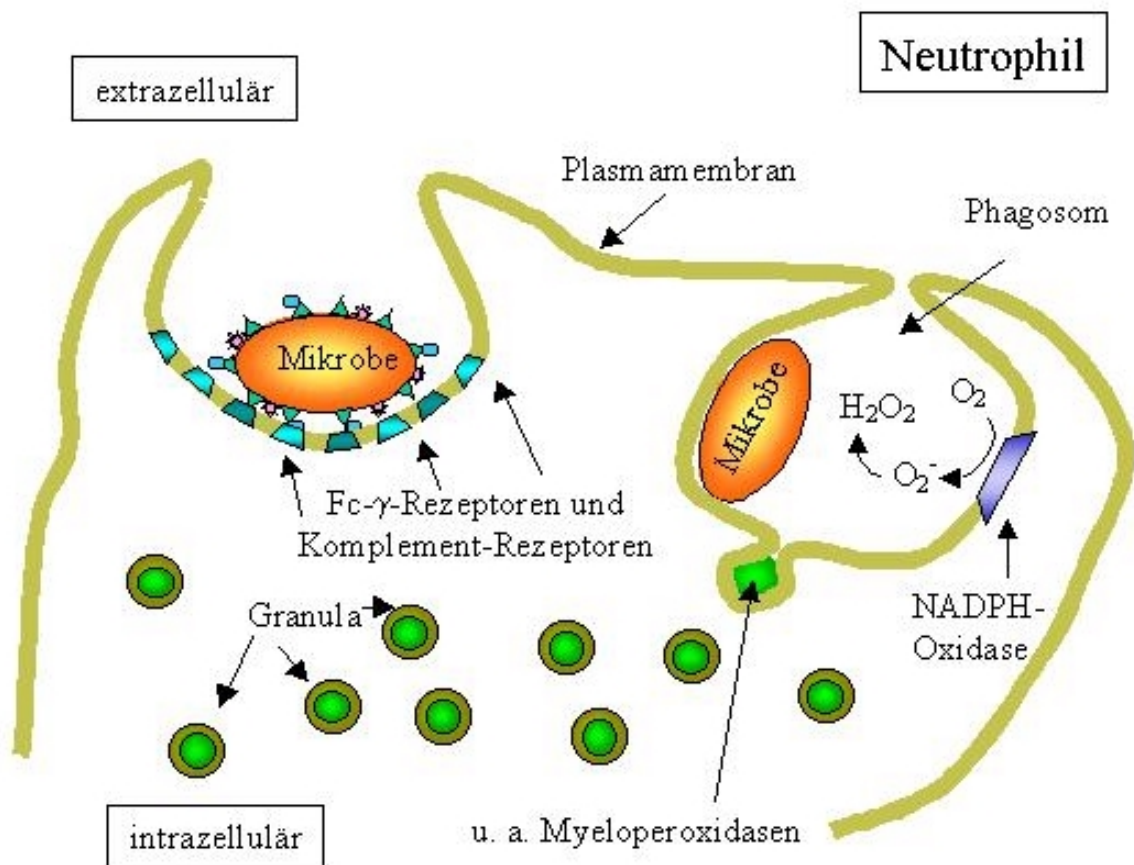


Abb. 1-9: Schematische Darstellung von Phagozytose, Degranulation und Sauerstoffradikalbildung (nach Roos, 1991). Die von IgG-Antikörpern und Komplementfragmenten erkannten Mikroorganismen binden an spezifische Rezeptoren der Plasmamembran von Phagozyten. Die Anheftung induziert die Phagozytose und führt zur Fusion von intrazellulären Granula mit der Membran. Außerdem wird die NADPH-Oxidase aktiviert, was zur Bildung von Sauerstoffradikalen und Wasserstoffperoxid führt. Die in den Granula unter anderem enthaltene Myeloperoxidase katalysiert die Umsetzung zu hypochloriger Säure. Alle drei Oxidationsmittel führen zur Abtötung von Mikroorganismen. (Weiter Erläuterungen siehe 1. 3. 2. ff).

Die spezifische Immunabwehr entwickelt sich in CGD-Patienten normal und auch die Anzahl der Zellen für die unspezifische Immunabwehr (phagozytierende Leukozyten) ist unauffällig. Ebenso verläuft die Freisetzung von antimikrobiell wirksamen Proteinen aus zellulären Granula normal (Babior und Curnutte, 1987). Die biochemische Ursache der CGD ist die Unfähigkeit, reaktiven Sauerstoff im Phagosom zu bilden, was auf einen genetischen Defekt der in terminal differenzierten Phagozyten gebildeten NADPH-Oxidase zurückzuführen ist.

1. 3. 2. NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidasen sind eine Gruppe von Plasmamembran-assoziierten Enzymen, die in einer Reihe von Zellen mesodermalen Ursprungs zu finden sind. Am eingehendsten ist die Leukozyten NADPH-Oxidase untersucht worden, die in Phagozyten und B-Lymphozyten zu finden ist (Babior, 1999). Dieses Enzym nimmt Elektronen von NADPH an der zytosolischen Seite auf und gibt sie an molekularen Sauerstoff an der Außenseite der Membran, entweder außerhalb der Zelle oder in ein Phagosom, ab. Das gebildete Sauerstoffradikal wird zu weiteren antimikrobiell wirksamen Substanzen (H_2O_2 , HOCl usw.) umgesetzt oder wirkt direkt auf eingedrungene Mikroorganismen. In ruhenden Phagozyten sind die Komponenten der Oxidase in membranständige Untereinheiten und zytosolische Bestandteile unterteilt. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung von zum Beispiel opsonisierten Mikroorganismen an Zelloberflächen-Rezeptoren, die zur Assemblierung des Komplexes führen (siehe Abb. 1.3.-1). Den enzymatisch aktiven Teil bildet ein Heterodimer aus zwei integralen Membranproteinen, das Zytochrom b_{558} . Dieses befindet sich in der ruhenden Zelle in spezifischen Granula und sekretorischen Vesikeln, die bei einer Aktivierung mit der Plasmamembran fusionieren. Zur gleichen Zeit kommt es zur Translokation der zytosolischen Komponenten an die Membran, und die enzymatische Aktivität wird induziert (Roos et al., 1996).

1. 3. 2. 1. Die Komponenten der Leukozyten NADPH-Oxidase

Forschungen über einen Zeitraum von 40 Jahren haben gezeigt, daß die Leukozytenoxidase fünf Komponenten umfaßt: p40^{phox} („phagocyte oxidase“), p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox} und gp91^{phox}. Im ruhenden Zustand der Zelle liegen p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} als Komplex im Zytosol vor, während p22^{phox} und gp91^{phox} in Membranen von sekretorischen Vesikeln und spezifischen Granula lokalisiert sind. Dort liegen sie als heterodimeres Flavohämprotein vor, das als Zytochrom *b*₅₅₈ bekannt ist. Diese Verteilung der Komponenten auf unterschiedliche zelluläre Kompartimente sorgt dafür, daß die NADPH-Oxidase in ruhenden Zellen inaktiv ist.

Zytochrom *b*₅₅₈ ist die membrangebundene Komponente der NADPH-Oxidase. Sie besteht aus jeweils einer Untereinheit gp91^{phox} und p22^{phox} (Wallach und Segal, 1996) und enthält darüber hinaus ein FAD und zwei Hämgruppen (Nisimoto et al., 1995). In seiner reduzierten Form zeigt dieser Komplex einen charakteristischen „Peak“ bei einer Wellenlänge von 558 nm, anhand dessen man ein Gehalt von 2 – 5 pmol Zytochrom *b*₅₅₈ pro 10⁶ Neutrophilen ermittelt hat (Borregaard et al., 1983). Der reduzierte Komplex hat ein sehr niedriges Redoxpotential von – 245 mV und erlaubt deshalb die direkte Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid. Die größere Untereinheit gp91^{phox} ist lokalisiert auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms. Bei 65 % der CGD Patienten ist dieses Gen mutiert, weshalb diese Form X-Chromosom gebundene CGD beziehungsweise X-CGD genannt wird. Die kleinere, nicht kovalent gebundene Untereinheit, das p22^{phox}, ist autosomal auf Chromosom 16 kodiert. Weiterhin konnte eine nicht essentielle Komponente, das *Rap1A*, identifiziert werden. Dieses kleine (22 kD) Guaninnukleotide bindende Protein (G-Protein) gehört zur *Ras*-Familie. Es reguliert, wie *Ras*, die Zellproliferation und agiert als ein Antagonist der *Ras*-abhängigen Transformation (Zhang et al., 1992). Gabig et al. (1995) schlugen ein Modell vor, in dem *Rap1A* eine Funktion als eine Art finaler Aktivierungs-Schalter ausübt, die eine direkte physikalische Wechselwirkung mit dem Flavozytochrom beinhaltet. Maly et al. (1994) konnten zeigen, daß Phorbol-induzierte Superoxidproduktion inhibiert wird, wenn Rap1A in der GTP-gebundenen oder GDP-gebundenen Konformation blockiert wird. Diese Beobachtungen lassen vermuten, das *Rap1A* durch Hydrolyse von GTP beziehungsweise der Umsetzung von GDP (Guanidin-Diphosphat) in GTP (Guanidin-Triphosphat) auch eine Veränderung in der Oxidase von Phase 1 zu 2 beziehungsweise umgekehrt bewirkt (Babior, 1999). Jedoch ist der Ablauf dieser Vorgänge noch weitgehend unbekannt.

Die im Zytosol als Komplex vorliegenden Komponenten der NADPH-Oxidase umfassen p47^{phox}, p67^{phox} und p40^{phox}, sowie das Guaninnukleotid bindende Protein *Rac2*. Die Untereinheit p47^{phox} ist hauptsächlich für den Transport des Komplexes vom Zytosol an die Membran während der Aktivierung der Oxidase verantwortlich. Ohne diese Untereinheit, die vor dem Transport mehrfach phosphoryliert wird, kann p67^{phox} sowie p40^{phox} nicht an die Membran transportiert werden. Die Untereinheit p67^{phox} ist für die Aktivität essentiell. Dieses Protein fördert den Elektronentransport zum FAD (Flavin-adenin-dinukleotid) im Zytochrom *b₅₅₈* in Abwesenheit von p47^{phox} (Cross und Curnutte, 1995). Ob diese Untereinheit in Anwesenheit von p47^{phox} die Elektronen an die Hämgruppen leitet, die von dort auf den Sauerstoff übertragen werden, ist umstritten (Babior, 1999). Es konnte jedoch festgestellt werden, daß p67^{phox} eine katalytisch essentielle Bindestelle für NADPH enthält (Smith et al., 1996). Eine solche Bindestelle ist auch in Zytochrom *b₅₅₈* nachgewiesen worden (Doussiere et al., 1993; Ravel und Lederer, 1993). Die Beziehung zwischen diesen Bindestellen ist bislang noch nicht untersucht. Die p40^{phox} Untereinheit ist für die Aktivität der NADPH-Oxidase nicht essentiell. Die Funktion dieses Proteins ist noch nicht einwandfrei geklärt. Untersuchungen an diesem Protein zeigten einerseits einen inhibitorischen Effekt auf die Superoxidproduktion (Sathyamoorthy M. et al., 1997), andererseits wurden auch Hinweise auf einen stimulatorischen Effekt gefunden (Tsunawaki et al., 1996). Eine weitere für die Aktivität der Oxidase notwendige Komponente ist *Rac2*. Dieses hauptsächlich im Zytosol von ruhenden Neutrophilen zu findende Protein ist Mitglied der *Rho*-Familie, die für ihre Funktion in der Regulation des Zytoskeletts bekannt ist. Während der Aktivierung der NADPH-Oxidase bindet *Rac2* GTP und wandert zusammen mit dem zytosolischen Komplex des Enzyms an die Plasmamembran (Babior, 1999).

Neben den genannten Proteinkomponenten, von denen die membrangebundene Komponente *Rap1A* und die zytosolische Komponente p40^{phox} als nicht zwingend notwendig erachtet werden, sind für die Aktivierung noch Proteinkinasen wie GTP/GDP und Mg²⁺ essentiell. Außerdem sind Bestandteile des Zytoskeletts für die Assemblierung des Enzymkomplexes notwendig. Der Aktivierungsmechanismus des Multikomponenten-Komplexes umfaßt eine ganze Reihe von Vorgängen, die im Detail noch nicht ganz geklärt sind.

1. 3. 2. 2. Aktivierung der NADPH-Oxidase

Werden ruhende Phagozyten einem Stimulus ausgesetzt, wird die zytosolische Komponente $p47^{\text{phox}}$ stark phosphoryliert. Darauf folgt die Migration des gesamten zytosolischen Komplexes ($p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$ und $Rac2$) zur Membran, wo er mit Zytochrom b_{558} zur aktiven NADPH-Oxidase assoziiert (siehe Abb. 1-10). Die assemblierte Oxidase ist nun in der Lage, Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen. Dies ist durch die elektronentransportierenden Gruppen Flavin und der Hämgruppen möglich. Diese Variante des Elektronenflusses ist jedoch nicht unumstritten (Babior, 1999). Für die Aktivierung sind außerdem die niedermolekularen Nukleotid-bindenden Proteine $Rap1A$ und $Rac2$ notwendig (siehe Kap. 1. 3. 2. 1.). Während der Phagozytose stülpt sich die Plasmamembran ein und bildet die Wand des phagozytierenden Vesikels (Phagosom). Nach Fusion mit sekretorischen Vesikeln beziehungsweise spezifischen Granula setzt die Leukozyten Oxidase dann die produzierten O_2^- Radikale oder deren Folgeprodukte in das Lumen des Phagosoms frei. Der internalisierte Mikroorganismus ist dann einer letalen Lösung von ätzenden Oxidationsmitteln ausgesetzt.

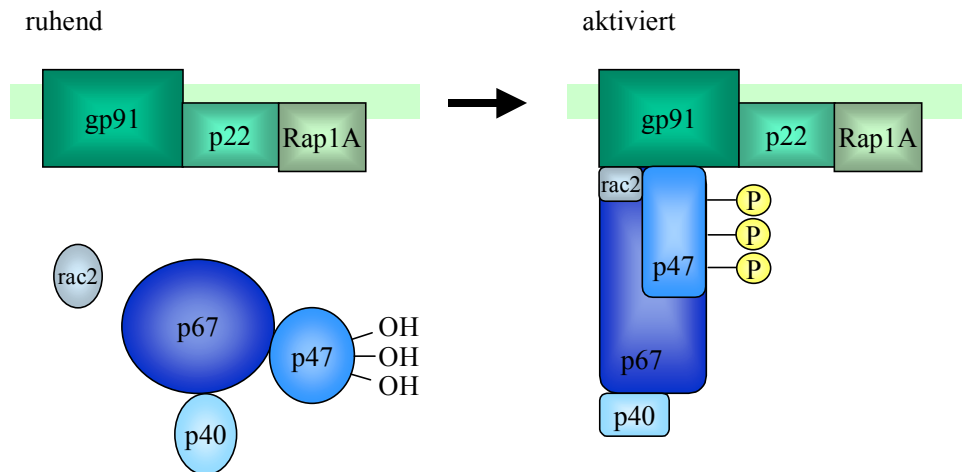


Abb. 1-10: Aktivierung der leukozytären NADPH-Oxidase. In ruhenden Zellen sind die Untereinheiten auf Zytosol ($p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$ und $Rac2$) und Membran ($gp91^{\text{phox}}$, $p22^{\text{phox}}$ und $Rap1A$) verteilt. $Rac2$ und $Rap1A$ sind niedermolekulare Guanin-bindende Proteine, die auch Funktionen in anderen Prozessen übernehmen neben der Oxidase-Aktivierung. Die anderen fünf Proteine sind die Kernbestandteile des Enzyms. Werden die Zellen aktiviert, wird $p47^{\text{phox}}$ mehrfach phosphoryliert und die zytosolischen Komponenten wandern zur Membran, wo sie mit Zytochrom b_{558} zur aktiven Oxidase assemblieren (Babior, 1999).

Der Aktivierungsmechanismus der NADPH-Oxidase umfaßt eine ganze Reihe von Prozessen. Die Phosphorylierung ist ein essentielles Element in der Aktivierung des Enzyms. $p47^{\text{phox}}$

wird während der Aktivierung an acht bis neun Serin-Resten am C-Terminus phosphoryliert. Durch gezielte Mutagenese konnten strategisch wichtige Phosphorylierungsstellen gefunden werden. Sie führte unter anderem zum fast vollständigen Verlust der Aktivität (S379) oder indirekt zur Inaktivierung durch Unterbinden einer vollständigen Phosphorylierung (S359/S370) (Faust et al., 1995; El Benna et al., 1996). Eine Phosphataufnahme von p67^{phox} konnte von El Benna et al. (1997) nachgewiesen werden. Ein weiterer Prozeß zur Aktivierung ist die Interaktion mit dem Zytoskelett. Obwohl diese Wechselwirkungen noch weitgehend unbekannt sind, konnten Hinweise auf eine Beteiligung bei der Aktivierung gefunden werden. So wurden in aktivierten Neutrophilen die O₂⁻ produzierende Aktivität sowie die Komponenten des Enzyms im äußeren Bereich des Zytoskeletts nachgewiesen (Nauseff et al., 1991). Zu dem zeigten Zellen, die an Oberflächen adhärten – einem Prozeß an dem Integrine beteiligt sind und bei dem es zu weitreichenden Änderungen des Zytoskeletts kommt - einen anderen zeitlichen Verlauf der Superoxidproduktion als suspendierte Zellen (Babior, 1999). Die Translokation der zytosolischen Komponenten findet nur in der Anwesenheit von p47^{phox} statt. Eine Wechselwirkung mit dem Zytoskelett konnte ebenso nachgewiesen werden, wie die Stimulus-abhängige Translokation von *Rac2* (Clark, 1999). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Aktivierung sind die Protein-Protein Wechselwirkungen, allen voran die zwischen SH3-Domänen der Proteine des zytosolischen Komplexes (p47^{phox} und p67^{phox} besitzen jeweils 2 und p40^{phox} eine SH3-Domäne) und Prolin-reicher Regionen. Diese Interaktionen variieren im ruhenden und aktivierten Zustand des Enzyms. Der Aktivierungsprozeß beinhaltet auch den Wechsel von GTP und GDP durch die Proteine *Rac2* und *Rap1A*. Ist die Aktivierung erfolgt und die Oxidase assembliert, kommt es zum Elektronenfluß von NADPH über FAD zu den Hämzentren und abschließend auf den molekularen Sauerstoff. Die Produktion von O₂⁻ führt durch die Umsetzung von NADPH auch zu einer Anhäufung von Protonen. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, daß die Aktivierung auch mit der Öffnung eines Kanals assoziiert ist, durch den die Protonen die Zelle verlassen können, bevor das Enzym wieder deaktiviert wird (Henderson, 1987, 1988; Nanda, 1993, 1994; Schrenzel, 1998).

1. 3. 2. 3. Behandlungsstrategien der chronischen Granulomatose

Die gegenwärtige Behandlung von CGD-Patienten beruht auf einer kombinierten antibakteriellen und fungiziden Prophylaxe (Fischer et al., 1993). Eine jüngere Behandlungsmethode beinhaltet die Gabe von rekombinantem humanen Interferon- γ , um Infektionen zu unterbinden. Die Langzeitwirkung dieser Methode ist jedoch noch unklar (Weening et al., 1995). In einigen wenigen Fällen wurde eine Behandlung durchgeführt, bei der HLA-identisches Knochenmark transplantiert wurde. Diese Behandlung ist für CGD-Patienten jedoch aufgrund des Infektionsrisikos gefährlicher als für Patienten mit anderen genetischen Defekten (Seger und Ezekowitz, 1994). Nicht zuletzt wegen des lebensbedrohlichen Charakters der Erkrankung ist sie ein Modell zur Entwicklung von Gentherapie-Ansätzen. Weitere Gründe sind auch das die genetischen Ursachen definiert sind, Knochenmark oder peripheres Blut ein leicht zugängliches Ziel für eine *ex vivo* Gentherapie sind und das alternativen Heilmethoden fehlen. Es konnten gesunde X-CGD-Träger gefunden werden, die einen kleinen Anteil normaler Neutrophilen hatten (Roos et al., 1986). Im transgenen Tiermodell genügte in einigen Fällen die Rekonstitution von 5 – 8 % der Superoxid generierenden Aktivität, um den Abwehrmechanismus gegen Mikroorganismen wieder herzustellen (Björgvinsdóttir et al., 1997). Diese Experimente legen nahe, daß nur eine Teilkorrektur von gp91^{phox} defizienten Zellen ausreicht, um eine normale Phagozytenfunktion in Patienten zu erreichen.

In einer Reihe von Studien konnte die partielle Korrektur des CGD-Phänotyps durch retrovirale Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen von Patienten mit Defekten in gp91^{phox}, p22^{phox} und p47^{phox} erreicht werden (Sekhsaria et al., 1993; Li et al., 1994; Zentilin et al., 1996, 1998; Becker et al., 1998; Nuno und Ishibashi, 1999). Weltweit sind derzeit 3 klinische Studien zur Gentherapie von CGD registriert (Human Gene Therapie, 2000). Malech und Mitarbeiter starteten 1995 die erste klinische Gentherapiestudie. In dieser Untersuchung wurden autologe CD34⁺-Zellen *ex vivo* retroviral mit intakten p47^{phox} Genkopien transduziert (Malech et al., 1997).

Für die Erprobung von Gentherapiekonzepten wurden verschiedene *in vitro* Systeme entwickelt. Neben der Immortalisierung von B-Lymphozyten durch Epstein-Barr Viren (EBV), die aus CGD-Patientenmaterial generiert wurden (Thrasher et al., 1992 und 1995; Chanock et al., 1992; Maly et al., 1993; Porter et al., 1993; Volpp und Lin, 1993; Sokolic et

al., 1996, Zentilin et al., 1996), wurden auch eine humane promyeloide Zelllinie (X-CGD PLB-985) durch homologe Rekombination und transgene X-CGD-Mäuse entwickelt (Zhen et al., 1993; Pollock et al., 1995). All diese Systeme wurden zur Quantifizierung der funktionellen Rekonstitution der Superoxid-Radikal Bildung verwendet. Ein Vergleich der erreichten Korrekturen in verschiedenen Studien ist schwierig, da unterschiedliche Vektoren, Titer und Infektionsprotokolle zugrunde liegen. Allgemein besteht bei retroviralen Vektoren das Problem, daß für einen effizienten Gentransfer die hämatopoetischen Stammzellen prästimuliert werden müssen. Dies führt nicht nur zu einer Zellteilung, die für eine Integration des Provirus essentiell ist, sondern auch zur Differenzierung der Zellen in vorgegebene Entwicklungsrichtungen. Damit verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Pluripotenz (Evans et al., 1999). Eine Strategie dieses zu umgehen, ist die Verwendung von alternativen viralen Vektoren wie beispielsweise lentiviralen Vehikeln.

1. 4. Ziel der Arbeit

Aufgrund ihrer Fähigkeit sich selbst zu erneuern und in jeglichen Zelltyp des Blut- und Immunsystems differenzieren zu können, sind hämatopoetische Stammzellen ein wichtiges Ziel der Gentherapie. Viele Erkrankungen, die das hämatopoetische System betreffen, können möglicherweise behandelt werden, indem therapeutische Gene stabil in Stammzellen exprimiert werden. Für einen Gentransfer mittels muriner retroviraler Vektoren ist eine Zellteilung für die Integration in das Wirtsgenom notwendig, die durch die Stimulation mit Zytokinen herbeigeführt werden muß. Mit einer Proliferation der Zellen beginnt jedoch auch eine Differenzierung in bestimmte Blutzelltypen, was zu einer Abnahme der langfristigen Repopulierungsfähigkeit führt (Amado und Chen, 1999). Für lentivirale Vektoren konnte gezeigt werden, daß eine *ex vivo* Stimulation von HSCs für einen effizienten Gentransfer in sehr frühe Stammzellen nicht notwendig ist und so zu einer besseren Rekonstitution von Knochenmark einer NOD/SCID Maus beiträgt (Miyoshi et al., 1999; Scherr et al., 2002).

Die chronische Granulomatose ist eine genetisch bedingte Erkrankung, bei der Zellen des hämatopoetischen Systems betroffen sind. Deshalb ist dieser Defekt ein gutes Modell für die Entwicklung einer Gentherapie mit HSC als Zielzellen. Bei dieser Erkrankung kommt es wegen einer gestörten Aktivität der Phagozyten-NADPH Oxidase zwar zur Phagozytose, aber die eingedrungenen Pilze und Bakterien können nicht abgetötet werden. Ursache hierfür ist die meist vollständig fehlende Produktion von aktivierten Sauerstoffmolekülen und deren Derivate in den phagozytierenden Vakuolen. Zwei Drittel der Fälle von CGD ist auf einen Defekt des auf dem X-Chromosom kodierten Glycoprotein gp91^{phox} (X-linked CGD - X-CGD) zurückzuführen. Dieses Protein ist die größere Untereinheit von Flavocytochrom b₅₅₈, einem membranständigen Heterodimer, welches das Redoxzentrum der Oxidase bildet (Dinauer et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit ist es, auf Basis eines etablierten retroviralen Gentransfer-Protokolls für CD34⁺-Zellen ein Transduktions-protokoll für lentivirale Vektoren zu etablieren (Dissertation Schilz, 1998; Dissertation Knoeß, 1999). Dies soll im Weiteren als Grundlage dienen, einen etablierten retroviralen Ansatz zum Transfer eines intakten gp91^{phox} Gens (Dissertation Becker, 1998) in einem lentiviralen Kontext zu untersuchen.

Hierzu werden im ersten Teil der Arbeit zunächst Vektoren mit grünem Fluoreszenzprotein (EGFP) als Marker und starken internen CMV-Promotoren konstruiert. Durch transiente Kotransfektion von drei Plasmiden (Transgenvektor, Verpackungs- und Envelopekonstrukt) in eine humane embryonale Nierenzelllinie (293T) werden Viruspartikel generiert, die in das Zellkulturmedium abgesondert werden. Die Partikel werden mit unterschiedlichen Methoden konzentriert und ihre Fähigkeit, humane hämatopoetische Stammzellen (CD34⁺-Zellen) effizient zu transduzieren, getestet.

Im zweiten Teil der Arbeit werden lentivirale Vektoren konstruiert, die das gp91^{phox}-Gen als therapeutisches Gen enthalten. Diese Vektoren werden dann hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, die NADPH-Oxidase Aktivität in der Modellzelllinie X-CGD PLB-985 (Zhen et al., 1993) zu rekonstituieren. Bei dieser Zelllinie ist das gp91^{phox}-Gen von PLB-985 Wildtypzellen (Tucker et al., 1987) durch homologe Rekombination unterbrochen. Diese humane myeloische Leukämiezelllinie kann nach Induktion mit Dimethylformamid (DMF) zu funktionellen Granulozyten und Makrophagen ausdifferenzieren. Nach Stimulation der ausgereiften Wildtyp- beziehungsweise transduzierten defekten Zellen kann dann eine Rekonstitution des Enzymkomplexes durch Sauerstoffradikalbildung nachgewiesen werden.

2. Materialien

2. 1. Geräte

Gerät

Agarosegel-Dokumentationssystem
 Autoklav
 Bakterieninkubator
 Brutschrank, CO₂-begast
 Elektrophoresekammern
 FACScan Gerät
 Feinwaage R160P-D1
 Fluoreszenzmikroskop Eclipse
 Kühlzentrifuge 2K15
 Kühlzentrifuge Modell J2-21
 (Rotor JA10 und JA20)
 Lichtmikroskop
 Luminometer
 Mikrowellenherd
 Milli-Q-Anlage
 Peristaltikpumpe
 pH-Meter
 Photometer ELISA-Reader SpectraMax
 Pipettierhilfe
 Vakuumtrockner, Speed Vac
 Spektral-Photometer Modell DU-64
 Sterilbank Modell LaminAir HLB 2448
 Sterilfilter 0,4 µm Millex GV
 Sterilfilter, Stericup (0,45µm; 0,22 µm)
 Thermocycler GeneAmp
 Tischzentrifuge
 Transilluminator
 Ultrazentrifuge Modell L8-80M
 (Rotoren: VTi50, VTi80, SW28)
 Vakuumpumpe
 Vortex
 Waage
 Wasserbäder
 Zellkulturflaschen
 Zellkulturinkubator

Hersteller/Vertrieb

UVP über Herolab, BioRad
 Integra Bioscience
 Heraeus Instruments
 Heraeus CO₂ Auto Zero
 BioRad, BRL
 Becton Dickinson
 Sartorius
 Nikon
 Sigma
 Beckman

 Leica
 Berthold
 Sharp
 Millipore
 Watson & Marlow
 Knick
 Molecular Dynamics
 Hirschmann
 Bachofer
 Beckman
 Heraeus Instruments
 Millipore
 Millipore
 Perkin Elmer
 Eppendorf
 UVP
 Beckman

 Bachofer
 Bender & Hobein AG
 Sartorius
 GFL
 Greiner, Falcon
 Heraeus Instruments

2. 2. Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller/Vertrieb</u>
Acrylamidlösung (Rotiphorese)	Roth
Agarose	Applied Biosystem
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Merck
Ampicillin	Boehringer Mannheim
AZT (Azidothymidin)	Roth
BSA (Bovines Serum Albumin)	Serva
Butanol, p. a.	Roth
Cäsiumchlorid (CsCl)	Roth
Chloroquine	Sigma-Aldrich
Zytochrom <i>c</i>	Sigma
DMF (Dimethylformamid)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva
dNTP (Desoxynukleotid-5'-triphosphat)	Pharmacia
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck
Ethanol, p. a.	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd (37 %)	Roth
Glycerin	Roth
HSA (Humanserum-Albumin)	Blutspendedienst Hessen
HBSS (Hank's gepufferte Salzlösung)	Gibco BRL/Life Technologies
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Roth
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Luminol	Fluka
Lysozym	Serva
Methanol, p. a.	Roth
Mineralöl	Sigma-Aldrich
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure))	Biomed
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
Natriumhydroxid	Roth
Phenol	Roth
PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate)	Sigma-Aldrich
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich
Polybrene	Sigma-Aldrich
Sucrose	Roth
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth
Tris-Base (Trisaminomethan)	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton-X-100	Serva

2. 3. Material zur Klonierung und biochemische Nachweise

2. 3. 1. Enzyme

<u>Enzyme</u>	<u>Hersteller/Vertrieb</u>
CIP (Phosphatase, alkalische)	New England Biolabs
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Sigma-Aldrich
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Perkin Elmer
Peroxidase (aus Meerrettich), POD	Sigma
Zytochrome <i>c</i> Reduktase	Sigma

2. 3. 2. Ausgangsvektoren und Plasmide

<u>Vektor</u>	<u>Quelle</u>
pSIN2-CMV-LacZ	Romain Zufferey, Universität Genf
pEGFP-N1	Clontech
pHR'RRL-PGK-GFP-SIN	Romain Zufferey, Universität Genf
pHR'CMV-GFP-WPRE	Didier Trono, Universität Genf
pIRES2-EGFP	Clontech
pSIN2-CMV-gp91phox	Sandra Wasser, Kinderspital Zürich

2. 3. 3. Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>
DH5 α	F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>deoR recA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96relA1</i>
HB101	F <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1proA2rps1.20</i> (Sm ^r), <i>xyl51-leu mtl1</i>
XL1-blue	<i>RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q Z Δ M15 Tn10 (tet ^R)], Stratagene
Stbl-2	F ⁻ <i>mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 lon gyrA96 thi-1 supE44 relA1 $\lambda$$\Delta$(lac-proAB)</i>

2. 4. 3. Antikörper

Antikörper

CD34 PC5 konjugiert
Maus IgG PC5 konjugiert
gp91^{phox} unkonjugiert

Ratte anti-Maus IgG1

Hersteller/Vertrieb

Beckman-Coulter
Beckman-Coulter
Görlach, Universität Frankfurt
Nemet, Universität Budapest
Beckton Dickinson

2. 4. 4. Zelllinien

2. 4. 4. 1. Adhärente Zellen

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
293	Humane embryonale Nierenzellen, adenoviral transformiert	Graham et al., 1977
293T	Humane embryonale Nierenzellen, stabil transformiert mit großem T-Antigen des SV40-Virus	DuBridg e et al., 1987
PG13iMgSLΔS	Infizierte „Producer“-Zellen murinen Ursprungs	Miller et al., 1991 PG13iMgSLΔS, Dissertation H. Knoeß, 1999

2. 4. 4. 2. Suspensionszellen

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
TF-1	Humane erythroide Leukämiezelllinie	Kitamura et al., (1989)
PLB-985	Humane akute Leukämiezelllinie	Tucker et al., 1987
X-CGD PLB-985 (Klon 3-3)	PLB-985, gp91 ^{phox} Gen mittels homologer Rekombination unterbrochen	Zhen et al., 1993
CD34 ⁺ -Zellen	primär aus Nabelschnurblut, Knochenmark, peripherem Blut frisch isoliert	Uniklinik Frankfurt, Abt. Hämatologie; MH Hannover, Abt. Hämatologie,
Kasumi	Humane akute myeloide Leukämiezelllinie	Asou et al., 1991

3. Methoden

3. 1. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3. 1. 1. Kultivierung von *Escherichia coli*

LB-Medium: 1 % (w/v) Caseinhydrolysat
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 0,5 % (w/v) NaCl

Die zur Vermehrung von Plasmid-DNA benutzten Bakterien werden in LB-Medium kultiviert (nach Sambrook et al., 1989 verändert). Bei Bakterien, die durch Plasmid-Transformation eine Ampicillinresistenz erhalten, wird dem Medium 50 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die Kultivierung erfolgt in einem 37 °C Schüttelinkubator. Frisch transformierte Zellen werden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (LB-Medium mit 1,2 % (w/v) Agar-Agar) ausplattiert und im 37 °C Brutschrank kultiviert.

3. 1. 2. Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode

CM-1, pH 5,8: 100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂
 30 mM KOAc
 10 mM CaCl₂
 15 % Glycerin

Der pH-Wert wird mit 0,2 M Essigsäure eingestellt. Die Lösung wird sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

CM-2: 10 mM MOPS, pH 7,0
 10 mM RbCl
 75 mM CaCl₂
 15 % Glycerin

Diese Lösung wird ohne MOPS-Puffer hergestellt und autoklaviert. Der hitzelabile MOPS-Puffer wird steril filtriert und nachträglich zugesetzt.

Die Herstellung kompetenter Zellen mit CaCl_2 erfolgt nach einer modifizierten Methode nach Hanahan (1983). In einem 1 Liter-Kolben werden 200 ml LB-Medium mit 400 μl einer Vorkultur eines *E.coli* Stammes (HB101, XL-1blue oder Stbl2) angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{550\text{nm}}$ von 0,5 wachsen gelassen. Die Kultur wird zu je 50 ml auf entsprechende Röhren aufgeteilt und zentrifugiert (5 min., 5000 x g, 20 °C). Danach wird das überstehende Medium dekantiert. Die auf Eis gestellten Sedimente werden in je 15 ml kaltem CM-1 aufgenommen. Anschließend wird die Suspension 1,5 Stunden auf Eis inkubiert, dabei wird sie ab und zu vorsichtig geschüttelt. Im folgenden werden die permeabilisierten Zellen erneut zentrifugiert (5 min., 5000 x g, 4 °C) und der Überstand dekantiert. Die auf Eis stehenden Sedimente werden in je 2 ml eiskaltem CM-2 aufgenommen. Zügig wird dann die Suspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die weitere Lagerung erfolgt dann bei – 80 °C.

3. 1. 3. Transformation kompetenter Bakterienzellen

Die kompetenten Bakterienzellen werden auf Eis aufgetaut. Jeweils 50 μl Zellsuspension wird vorgelegt und mit maximal 10 μl eines Ligationsansatzes beziehungsweise 0,5 – 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach kurzem Mischen werden die Ansätze 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Die transformierten Zellen werden erneut 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen direkt auf LB-Platten (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3. 1. 4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

3. 1. 4. 1. Mini-Plasmid-Präparation mittels alkalischer Lyse

Puffer 1, pH 8,0 (HCl): 50 mM Tris
 10 mM EDTA
 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase

Puffer 2: 200 mM NaOH
 1,0 % SDS (w/v)

Puffer 3, pH 5,5 (Essigsäure): 3,0 M KOAc

TE-Puffer, pH 8,0: 10 mM Tris pH 8.0
1 mM EDTA

Die Methode der alkalische Lyse zur Gewinnung von Plasmiden nach Birnboim und Doly (1979) wurde in einer modifizierten Form durchgeführt. Von einer 5 ml Übernachtskultur werden 1 – 3 ml sedimentiert (5 min., 4500 x g, 20 °C). Der Überstand wird dekantiert und die Zellen in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Der alkalische Aufschluß der Zellen erfolgt durch Zugabe von 300 µl Puffer 2. Die Lösung wird vorsichtig gemischt und es erfolgt eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend werden 300 µl Puffer 3 zugegeben. Das entstehende Präzipitat und vorhandene Zelltrümmer werden durch Zentrifugation (20 min., 20000 x g, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wird in ein frisches Gefäß überführt. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA durch Zugabe von 630 µl 100 % Isopropanol (0,7faches Volumen) gefällt und durch Zentrifugation (20 min., 20000 x g, 4 °C) sedimentiert. Das Präzipitat wird zweimal mit 70 % EtOH gewaschen (5 min., 20000 x g, 4 °C). Der überschüssige Ethanol wird dekantiert und die Gefäße 5 – 10 Minuten zum Trocknen mit der Öffnung nach unten auf Labortücher gestellt. Das Präzipitat wird dann entweder 15 min. an der Luft oder 5 min. unter Vakuum in der Lyophilie (SpeedVac) getrocknet. Danach wird die DNA in 20 – 40 µl H₂O oder 1 x TE-Puffer aufgenommen und bei –20 °C gelagert.

3. 1. 4. 2. Maxi-Plasmid-Präparation mittels Cäsiumchlorid-Gradienten

Sucrose-Puffer: 25 % (w/v) Sucrose in 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, Puffer sterilfiltriert
Lysozym: 10 mg/ml in 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
EDTA: 0,25 M EDTA, pH 8,0
Triton-Lyse-Mix: 0,3 % Triton X-100
0,78 M EDTA
0,15 M Tris-HCl, pH 8,0

Alle Lösungen werden bei 4 °C gelagert und verwendet.

Die Präparation mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten (modifiziert nach Haslinger, 1984) erlaubt die Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA mit hoher Reinheit.

Eine 500 ml Übernachtkultur wird in entsprechende Zentrifugenbecher (für JA-10 Rotor, Beckman) gefüllt und zentrifugiert (10 min., 4500 x g, 4 °C). Der Überstand wird dekantiert und die Zellen in 10 ml Sucrose-Puffer resuspendiert. Die Suspension wird in kleinere Zentrifugen-Röhrchen (für JA-20 Rotor, Beckman) überführt. Für die Lyse der Zellen werden 2,5 ml Lysozymlösung zugegeben, gut gemischt und fünf min. bei 4 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms werden 1,3 ml EDTA-Lösung zugegeben, gemischt und noch mal für 15 min. bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Triton-Lyse-Mix und Mischen wird der Ansatz 10 min. bei 45 °C inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA werden durch Zentrifugation (20 min., 5600 x g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wird vorsichtig in ein 50 ml Röhrchen überführt. Pro ml Überstand wird 1 g Cäsiumchlorid zugegeben und bei 40 °C so lange unter gelegentlichem Mischen erhitzt, bis das Salz sich vollständig gelöst hat.

In der Zwischenzeit werden in Röhrchen (für VTi 50 Rotor, Beckman) 50 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) vorgelegt. Die Cäsiumchlorid-DNA-Lösung wird dann nach Zentrifugation (15 min., 20 °C, 3000 x g) mit einer Pipette abgenommen und in ein entsprechende Zentrifugenröhrchen überführt. Mit Mineralöl und einer Cäsiumchloridlösung (1 g / ml CsCl in 1 x TE) werden die Röhrchen austariert. Die Röhrchen werden verschweißt und über Nacht zentrifugiert (200.000 x g, 20 °C).

Durch die Dichtegradientenzentrifugation bilden sich zwei Banden. Die obere enthält Plasmid-DNA mit Strangbrüchen („nicked“) und genomische DNA, während die untere Bande superspiralisierte Plasmid-DNA („supercoiled“) enthält. Die untere Bande wird mit einer Spritze abgezogen und in ein frisches Röhrchen (für VTi80 Rotor, Beckman) überführt. Die Röhrchen werden mit Cäsiumchloridlösung (1 g / ml CsCl in 1 x TE) austariert. Es folgt die zweite Dichtegradientenzentrifugation über Nacht (600.000 x g, 20 °C). Die untere Bande wird abgezogen und das überschüssige, sowie das in der Plasmid-DNA interkalierte Ethidiumbromid durch mehrmaliges Extrahieren mit n-Butanol entfernt. Das Cäsiumchlorid wird durch eine Anionentauschersäule (NAP-25, Pharmacia), wie vom Hersteller angegeben, abgetrennt. Dann wird die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 7,0 und 0,7fachem Volumen 100 % Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation (20 min., 15000 x g, 4 °C) sedimentiert. Die DNA wird dreimal mit 70 % EtOH gewaschen (1500 x g, 5 min. , 4 °C). Nach dem Trocknen wird das Plasmid in 0,5 – 1 ml

1 x TE aufgenommen. Wenn die Quantifizierung im Spektralphotometer einen Quotienten A_{260}/A_{280} von etwa 1,8 aufweist, ist eine weitere Reinigung nicht notwendig. Ansonsten muß die DNA erneut gefällt (siehe 3. 1. 5. 1.) beziehungsweise zunächst mit PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, siehe 3. 1. 5. 2.) extrahiert werden.

3. 1. 4. 3. Maxi-Plasmid-Präparation mit kommerziellen System

Mit einem kommerziellen System (z. B. JetStar 2.0, Genomed; Plasmid Maxiprep Kit, QIAGEN) kann Plasmid-DNA in größeren Mengen (0,5 – 1 mg) in kürzerer Zeit isoliert werden. Die Präparation erfolgt nach Handbuch des Herstellers.

3. 1. 5. Aufreinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA

3. 1. 5. 1. Präzipitation von DNA

Um DNA aus wässrigen Lösungen zu präzipitieren, wird 1/10 Volumen Salz (3,5 M NaOAc) und 0,7 Volumen 100 % Isopropanol oder alternativ 2,5 Volumen 100 % EtOH zugegeben. Bei kleinen Fragmenten beziehungsweise geringen Mengen wird die Fällung durch Zugabe von 1 µl Glykogen (Boehringer) unterstützt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation (15000 x g, 20 min., 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wird zweimal mit 70 % EtOH gewaschen (15000 x g, 5 min., 4 °C). Die DNA wird getrocknet und in Wasser oder TE gelöst.

3. 1. 5. 2. PCI-Extraktion von DNA

Zur Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen aus DNA-Lösungen, wird das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1) zugegeben und gründlich gemischt. Durch etwa einminütliche Zentrifugation werden die Phasen getrennt und die obere wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt. Um das Phenol zu entfernen, wird dann noch zweimal mit Chloroform extrahiert. Anschließend wird die DNA gefällt, getrocknet und in Wasser oder TE gelöst (siehe 3. 1. 5. 1.).

3. 1. 5. 3. Quantifizierung von DNA

Mit einem Spektralphotometer können Quantität und Qualität von Nucleinsäuren bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von Nucleotiden liegt bei 260 nm. Die Absorption von $A_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngige DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ für RNA und 33 $\mu\text{g/ml}$ für Oligonucleotide. Licht einer Wellenlänge von 280 nm wird auch von Proteinen absorbiert. Bildet man den Quotienten aus A_{260}/A_{280} , sollte dieser bei reiner DNA $1,8 \pm 0,1$ betragen. Liegt der Quotient tiefer oder höher, deutet dies auf eine Kontamination hin, die mit einer PCI-Extraktion oder erneuter DNA-Fällung entfernt wird.

3. 1. 5. 4. Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Werden DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt, können diese aus der Gelmatrix wieder eluiert werden. Dazu wird das entsprechende Fragment mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelelution erfolgt mit dem QIAEX II System (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Hierbei wird die Agarose zunächst gelöst und anschließend die Nucleinsäure an eine Matrix gebunden. Nach mehreren Waschschritten kann die DNA aus der Matrix eluiert werden.

3. 1. 6. Enzymatische Modifikationen von Nucleinsäure

3. 1. 6. 1. Restriktionsendonucleolytischer Verdau von DNA

Die analytische Restriktion wird in den entsprechenden Puffern des Herstellers unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt. Für die analytische Restriktion werden 0,5 μg – 2 μg DNA, bei präparativen Restriktionen 2 μg – 10 μg DNA, eingesetzt. Zur Kontrolle wird der gesamte Ansatz oder ein Aliquot, sowie ein Größenstandard durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3. 1. 6. 5.) aufgetrennt. Fragmente werden wie unter 3. 1. 5. 4. beschrieben präpariert.

3. 1. 6. 2. Dephosphorylierung freier DNA-Enden

Um eine Religation von gleichen überstehenden („sticky ends“) oder glatten („blunt ends“) Enden zu vermeiden, werden 10 – 20 pmol freie DNA-Enden in einem 50 µl Ansatz mit 1/10 Volumen 10x Puffer (vom Hersteller) und 10 U CIP („calf intestinal phosphatase“) für 1 – 1,5 Stunden bei 37 °C dephosphoryliert. Dabei wird alle halbe Stunden erneut 10 U CIP zugegeben. Abschließend wird das Enzym durch PCI-Extraktion (siehe 3. 1. 5. 2.) abgetrennt.

3. 1. 6. 3. Generierung glatter DNA-Enden („blunt end“)

Um DNA-Fragmente mit unterschiedlichen, überstehenden Enden ligieren zu können, müssen diese entweder durch 5' → 3' Polymeraseaktivität aufgefüllt, oder durch 3' → 5' Exonucleaseaktivität abgebaut werden. Beide Aktivitäten besitzt die große Untereinheit (Klenow-Fragment) der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli*.

Zum Auffüllen von 5' überstehenden Enden werden zum Restriktionsansatz 10 mM dNTP und 5 U Klenow-Fragment zugegeben. Der Ansatz wird bei 37 °C 20 – 30 min. inkubiert. Für den Abbau 3' überstehender Enden werden 2 mM dNTP und 5 U Klenow-Fragment zum Ansatz zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur 30 min. inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt entweder durch Zugabe von 10 mM EDTA, oder durch Hitzeinaktivierung 10 min. bei 65 °C.

3. 1. 6. 4. Ligation von DNA-Fragmenten

Fragmente mit gleichen überstehenden oder glatten Enden können durch T4-DNA-Ligase kovalent verestert werden. Dazu werden 20 ng Vektor-Fragment mit dem 2 - 50fachen molaren Überschuß an Insert-Fragment in einem 20 – 50 µl Ansatz, der 1/10 Volumen 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (vom Enzymhersteller) und 400 U T4-DNA-Ligase enthält, 4 - 24 Stunden bei 16 °C inkubiert. Die so entstandenen modifizierten Plasmide können danach wie unter 3. 1. 3. beschrieben transformiert werden.

3. 1. 6. 5. Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris, pH 7,8
5 mM NaOAc
5 mM EDTA

6x Auftragspuffer (6x AP): 50 % Glycerin
0,1 % Xylencyanol
0,1 % Bromphenolblau

Durch horizontale Gelelektrophorese können die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld (5 – 15 V/cm) aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente zur Anode verhält sich proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Zum Gießen des Gels werden, je nach zu trennender Fragmentgröße, 0,8 bis 1,6 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Kochen gelöst und nach kurzem Abkühlen 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA-Proben werden mit Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach der Auftrennung wird das Fragmentierungsmuster auf einem Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Polaroidbild oder einem entsprechenden System dokumentiert.

3. 1. 6. 6. Synthese linearer DNA-Fragmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

10x PCR-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,8
500 mM KCl
15 mM MgCl₂
0,01 % Gelatine

Mit einer PCR können DNA-Fragmente generiert werden, die entweder das Vorhandensein spezifischer Sequenzen dokumentieren, oder zur Klonierung weiter verwendet werden können (Saiki et al. 1985; Mullins et al., 1986; Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al. 1988).

Eine Standard-PCR wird in einem 50 µl-Ansatz durchgeführt. Dieser Ansatz enthält PCR-Puffer (Endkonzentration 1x), 0,4 µM dNTP, jeweils 2 mM zweier gegenläufiger Oligonukleotidprimer, 39 mM MgCl₂, sowie 2,5 U Taq-Polymerase. Als Matrize werden 1 – 10 pg Plasmid-DNA oder 1 µg genomische DNA eingesetzt. Als Negativkontrolle wird

Wasser statt DNA oder genomische DNA ohne entsprechende Zielsequenz eingesetzt. Die Positivkontrolle ist Plasmid-DNA mit der gesuchten Zielsequenz. Wenn eine PCR auf genomische DNA durchgeführt wird, wird die Positivkontrolle zusätzlich mit 1 µg genomischer DNA ohne Zielsequenz supplementiert. Der Ansatz wird dann in einem Thermocycler inkubiert. Die Reaktionsbedingungen werden gemäß den verwendeten Reagenzien angepaßt.

3. 2. Zellbiologische Arbeitsmethoden

3. 2. 1. Kultivierung von Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien oder Primärzellen werden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die quantitative Bestimmung vitaler Zellen erfolgt durch Anfärben mit 0,2 % Trypanblau. Die Subkultivierung von Zellen erfolgt in der logarithmischen Wachstumsphase.

Suspensionszellen werden in der Regel in RPMI 1640 mit 10 % FCS (hitzeinaktiviert), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Bei der Passagierung erfolgt eine Verdünnung von etwa $1 - 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf $3 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml.

Adhärent wachsende Zellen werden in DMEM-Medium mit den gleichen Zusätzen wie RPMI-Medium kultiviert. Eine Passagierung erfolgt wenn der Zellrasen konfluent ist. Die anhaftenden Zellen werden zunächst ein- bis zweimal mit PBS gewaschen, dann können sie mit Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,55 mM EDTA, 137 mM NaCl) abgelöst und vereinzelt werden. Wie hoch die Zellen verdünnt werden, ist abhängig von der Generationszeit. Schnell wachsende Zellen werden 1:20 - 1:30, langsam wachsende Zellen 1:5 - 1:10 verdünnt. Manche Zelllinien, wie die als „Producer“-Zellen verwendeten 293T-Zellen, benötigen zum Anhaften Gelatine. Dazu werden die entsprechenden Zellkulturgefäße mit 0,1 % Gelatine mindestens 20 min. beschichtet. Vor der Aussaat wird die überschüssige Lösung abpipettiert.

Zellen können durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierzu wird eine geeignete Anzahl Zellen in Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO zunächst bei -80 °C eingefroren und später in flüssigem Stickstoff gelagert. Besonders empfindliche Zellen können in 80 - 90 % FCS und 10 - 20 % DMSO eingefroren werden. Werden so konservierte

Zellen wieder aufgetaut, werden die auf Trockeneis transportierten Zellen bei 37 °C aufgetaut und unmittelbar danach in ein Röhrchen mit vorgelegtem Medium überführt. Dann werden die Zellen noch ein- bis zweimal gewaschen und in frischen Medium ausgesät.

3. 2. 2. Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen zur Virusproduktion

2 x HBS (pH 7,0): 55 mM HEPES
275 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄
2 M CaCl₂
0,1 M Chloroquine

Einen Tag vor der Transfektion (Pear et al., modifiziert) werden 4 x 10⁶ Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Für die Transfektion wird als erstes das DNA-Präzipitat hergestellt. Dafür werden insgesamt 20 - 40 µg DNA mit 61 µl 2 M CaCl₂ versetzt und auf 500 µl mit H₂O aufgefüllt. Für die Produktion von lentiviralen Partikeln mit dem verwendeten System werden standardmäßig 20 µg Transgenvektor, 6,5 µg Verpackungskonstrukt und 3,5 µg „Envelope“-Konstrukt eingesetzt. Dann wird zu dem Gemisch 500 µl 2 x HBS tropfenweise zugegeben. Um einen möglichst feinen Calciumphosphat Niederschlag zu erhalten, wird während der Zugabe mit Hilfe eines Elektropipettors ständig Luft in die DNA-Lösung geblasen. Anschließend wird Medium mit 1 µl 0,1 M Chloroquine pro ml Medium vorbereitet. Danach erfolgt ein Mediumwechsel auf den ausgesäten Zellen mit 3 ml chloroquinehaltigem Medium je 10 cm Zellkulturschale. Das Präzipitat wird zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Werden andere Zellkulturgefäße als 10 cm Schalen verwendet, wird der Ansatz proportional zur Wachstumsfläche angepaßt. Die Schalen werden dann 8 – 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dienen die transfizierten Zellen zur Virusproduktion, erfolgt erneut ein Mediumwechsel mit 5 ml Medium, das 10 mM Natriumbutyrat enthält. Die Inkubation wird maximal 10 – 12 Stunden fortgesetzt. Dann werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 5 – 6 ml frisches Medium zugegeben. Die Zellen werden im Anschluß weiter kultiviert. Das in den Zellkulturüberstand sezernierte Virus kann nun bis zu drei Tage alle 8 – 16 Stunden geerntet werden. Wird das Virus nicht unmittelbar nach der Ernte verwendet, kann er bei -80 °C gelagert werden.

3. 2. 3. Methoden zur Konzentrierung lentiviraler Partikel aus Zellkulturüberstand

Lentiviren, die mit Glycoprotein G aus dem Vesikular-Stomatitis-Virus pseudotypisiert werden, erhalten dadurch eine so robuste Lipidhülle, daß sie durch unterschiedliche Methoden angereichert werden können. So kann der mitunter niedrige Titer des Virusüberstandes erhöht werden.

3. 2. 3. 1. Ultrafiltration

Retroviren messen zwischen 60 und 90 nm im Durchmesser und können mit herkömmlichen Ultrafiltrationseinheiten angereichert werden. Dazu können Filtrationseinheiten mit einer Ausschlußgrenze von 50 kDa – 500 kDa genutzt werden. Zunächst wird der Zellkulturüberstand 10 Minuten bei 4 °C und 437 x g zentrifugiert. Danach wird der Überstand durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert. Der nun zellfreie Virusüberstand kann nun in die vorbereiteten Filtrationseinheiten gegeben werden. Die vom Hersteller meist unsteril gelieferten Ultrafiltrationseinheiten werden mit 70 % EtOH von Keimen befreit. Spuren von EtOH werden durch zweimaliges Waschen mit sterilem PBS oder H₂O entfernt. Die Parameter der Zentrifugation und das Volumen an Überstand werden den Angaben des Herstellers angepaßt. Das Konzentrat wird zur Transduktion von Zellen verwendet, oder bei –80 °C gelagert.

3. 2. 3. 2. Ultrazentrifugation

Für die Sedimentierung von Viruspartikeln mittels Ultrazentrifugation ist eine stabile Hülle essentiell, da sonst die Anreicherung mit einem Verlust der Infektiosität einhergeht. Der Zellkulturüberstand wird zunächst durch Zentrifugation (5 min., 4 °C, 437 x g) und Filtration (Millipore, 0,45µm) von Zellen und Zelltrümmern befreit. Die Zentrifugenbecher und die Zentrifugenröhrchen (für SW28-Rotor, Beckman) werden mit 70 % EtOH desinfiziert, zweimal mit sterilem H₂O ausgespült und unter der sterilen Werkbank getrocknet. Die Zentrifugenröhrchen werden dann in die Zentrifugengefäße eingesetzt und mit mindestens 35 ml und maximal 39 ml Virusüberstand befüllt. Alle Gefäße werden auf der Waage auf maximal ±0,02 g austariert, wobei Tara- Röhrchen mit H₂O befüllt werden. Die Viruspartikel

werden durch Zentrifugation (1,5 Stunden, 45.000 x g, 4 °C) sedimentiert. Danach wird der Überstand dekantiert und die Röhrchen ein bis zwei min. kopfüber auf Labortüchern gestellt. Das Sediment wird in 1/10 bis 1/100 Volumen entsprechend des benötigten Mediums aufgenommen. Anschließend werden die Viruspartikel eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm auf einem Rundschtüttler inkubiert und durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Der so präparierte Virusüberstand wird dann für die Transduktion eingesetzt, oder bei -80 °C gelagert.

3. 2. 3. 3. Sedimentieren von Viruspartikeln durch „Low Speed“-Zentrifugation

Die zu sedimentierenden Viruspartikel werden, wie unter 3. 2. 3. 2. Beschrieben, von Zellen und Zelltrümmern befreit. Die Zentrifugenbecher (für JA-10 Rotor, Beckman) werden, wie unter 3. 2. 3. 2. Beschrieben, desinfiziert. Der Zellkulturüberstand wird in die Becher gefüllt, austariert und in den JA-10 Rotor eingesetzt. Die Zentrifugation (4.500 x g, 4 °C) erfolgt über Nacht. Der Überstand wird dekantiert und die Becher für ein bis zwei min. kopfüber auf Labortücher gestellt. Das Sediment wird in 1/10 – 1/100 Volumen des benötigten Mediums aufgenommen und 1 Stunde bei 37 °C und 200 rpm auf einem Rundschtüttler gelöst. Das konzentrierte Virus kann nun für die Transduktion verwendet, oder bei -80 °C gelagert werden.

3. 2. 3. 4. Anionenaustauschchromatographie

Lentivirale Partikel werden nach der Ausknospung von Wirtszellmembran umhüllt, die Glycoproteine viralen Ursprungs enthält und aufgrund der typischen Struktur negativ geladen ist. Dies macht man sich bei der Anreicherung durch Anionenaustauschchromatographie zunutze. Der Zellkulturüberstand wird, wie in 3. 2. 3. 2. Beschrieben, vorbereitet. Die verwendete Säule (Fractoflow, Merck) ist eine Hohlfasermembran, an der kovalent TMA-Ankergruppen gebunden sind. Die Säule wird unter der Sterilbank mit Pumpenschläuchen bestückt, an einem Stativ befestigt und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Watson & Marlow) beschickt. Zunächst wird die Säule mit 50 ml PBS gespült. Anschließend wird der Überstand aufgetragen und die Säule mit 20 ml PBS gewaschen. Die Elution erfolgt mit 2 ml 0,6 M

NaCl in PBS und 5 ml 2 M NaCl in PBS. Vor der Aufbereitung des Eluates wird die Säule mit 10 ml 5 M NaCl in PBS und 50 ml 2 M NaCl in PBS mit 20 % EtOH gespült. Die Säule wird in ausreichendem Volumen der letzten Waschlösung bei 4 °C aufbewahrt. Das Eluat wird dann in einer Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 15, 100 kDa, Vivascience) entsalzt und auf ein Volumen von ein bis drei ml eingeeengt. Das Konzentrat wird so für die Transduktion von Zellen eingesetzt, oder bei –80 °C gelagert.

3. 2. 4. Transduktion von Zellen mit lentiviralem Virusüberstand

Ein Marker- oder therapeutisches Gen kann entweder transient durch Transfektion (siehe 3. 2. 2.) oder stabil durch Transduktion (Infektion) mittels eines Virus in eukaryontische Zellen eingebracht werden. Für die Transduktion sind die Vektoren beziehungsweise Viruspartikel so konstruiert, daß sie die Zielzelle genau einmal infizieren und die neue Information in das Wirtsgenom integrieren können.

Bei der Transduktion von adhärennten Zellen werden 24 Stunden zuvor Zellen ausplattiert. Für die Infektion wird dann das Medium gegen Virusüberstand ausgetauscht. Um einen Kontakt von Zelle und Virus zu erleichtern, wird dem viralen Überstand 4 µg/ml Polybrene zugegeben. Polybrene ist ein Polykation, welches die Adsorption von DNA an die Zelloberfläche erhöht. Der Ansatz wird dann 8 – 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Überstand wird abgezogen und frisches Medium zugegeben. Die Zellen werden dann bis zur Analyse wie Zelllinien weiter kultiviert und gegebenenfalls passagiert.

Suspensionszellen werden in Multi-Lochplatten ausgesät und mit Virusüberstand überschichtet, dem 4 µg/ml Protaminsulfat zugesetzt wird. Die Platten werden dann zentrifugiert (90 min., 32 °C, 1200 x g) und mindestens 2,5 Stunden oder über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach folgt ein drei Viertel Mediumwechsel und nach 24 Stunden ein weiterer drei Viertel Mediumwechsel. Bis zur weiteren Bearbeitung der Zellen werden diese wie Zelllinien kultiviert und passagiert.

3. 2. 5. Methoden zur Titerbestimmung

Um verschiedene Experimente miteinander vergleichen und beurteilen zu können, benötigt man eine Aussage über die produzierte Menge an Virus. Eine Möglichkeit ist, die Anzahl transgenexprimierender Zellen mit dem eingesetzten Volumen an Virusüberstand ins Verhältnis zu setzen. Dies bezeichnet man auch als biologischen Titer, bei dem die exprimierenden Klone beziehungsweise Zellen ausgezählt werden. Eine weitere schnelle Methode ist die Bestimmung mittels TaqMan-PCR (Perkin-Elmer), bei der die RNA-Kopien im Überstand quantifiziert werden. Diese Methode ist quantitativ genauer, gibt aber nicht die Anzahl infektiöser Partikel wieder. Für das in dieser Arbeit gewählte Testsystem war jedoch das Verhältnis der RNA-Genomkopienzahl zu infektiöser Partikelzahl konstant.

3. 2. 5. 1. Endpunktverdünnung mittels visueller Auswertung

Für diesen Test werden 24 Stunden vor dem Ansatz der Titerbestimmung 5×10^4 Zellen pro Loch auf einer 24-Lochplatte ausgesät. Vor der Herstellung der Verdünnungsreihe wird der Virusüberstand zunächst vorverdünnt, und zwar 1:10 wenn nicht-konzentrierter und 1:100 wenn konzentriert Überstand eingesetzt wird. Für die Dreifach-Bestimmung und die Negativkontrolle werden insgesamt 4,5 ml vorverdünnter Überstand (supplementiert mit 4 µg/ml Polybrene) benötigt. In jeweils fünf 14 ml-Rundbodenröhrchen werden 4,5 ml Medium mit 4 µg/ml Polybrene vorgelegt und durch Überführen von jeweils 0,5 ml, ausgehend von der Vorverdünnung, eine serielle Verdünnung angesetzt. Anschließend wird von den vorbereiteten Platten das Medium abgezogen und durch je ein ml der Verdünnungen ersetzt. Der besseren Übersicht wegen, werden die gleichen Verdünnungen in Spalten (senkrecht) und die unterschiedlichen Verdünnungen in Reihen (waagrecht) pipettiert. Zur vierten Reihe wird als Negativkontrolle 150 µg/ml AZT (Azidothymidin) zugesetzt. AZT ist ein Thymidinanalogon, das die reverse Transkription inhibiert. Die so behandelten Zellen sollten, sofern kein exprimiertes Protein aus den transfizierten Zellen mit transferiert wurde, keine Transgen-Expression zeigen. Die Platten werden dann acht Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann erfolgt ein Mediumwechsel. Vier Tage nach Infektion werden die Platten am Mikroskop ausgewertet und die Vertiefung mit der höchsten Verdünnung identifiziert, die noch positive Kolonien enthält. Die Anzahl der Kolonien multipliziert mit der Verdünnung ergibt die infektiösen Einheiten pro ml Virusüberstand (IU/ml).

3. 2. 5. 2. Quantifizierung der viralen RNA mittels TaqMan-PCR

Die reverse Transkription des viralen Genoms beinhaltet verschiedene Elongationsschritte und Sprünge (Coffin et al., 1996). Diese Reaktionen starten mit der Minusstrang cDNA Synthese an der Primer-Bindungsstelle, an der eine tRNA^{Pro} gebunden ist. Diese initial gebildete cDNA umfaßt die R-U5 Region und führt zu einer sogenannten „strong-stop“ Spezies (siehe Abb. 1-6). Diese ersten Schritte werden schon im Viruspartikel initiiert, noch bevor das Virus in eine Zielzelle gelangt (Trono, 1992). An dieser cDNA setzen die gewählten Primer an, so daß ohne eine reverse Transkriptionsreaktion direkt eine TaqMan-PCR durchgeführt werden kann.

Ein TaqMan-PCR Ansatz enthält 5 µl 10x TaqMan-Puffer, 800 µM dNTP (200 µM/Nukleotid), 200 nM Sonde, 5,5 mM MgCl₂, 3 U Taq Gold Polymerase (Perkin-Elmer) und 900 nM Primer (300 nM je Primer) in einem Gesamtvolumen von 40 µl. Dazu werden dann 10 µl DNA-Lösung gegeben. Für die Standardreihe wird der verwendete Transgenvektor als Plasmid so verdünnt, das 2 bis 2×10^{10} Moleküle in gesamt 10 µl zu jedem Ansatz pipettiert werden können. Der Virusüberstand wird 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 verdünnt. Für alle Verdünnungen wird H₂O mit 100 µg/ml Lachssperma-DNA verwendet. Im Thermocycler erfolgt dann die Reaktion und die Aufzeichnung der Kinetik. Die Daten werden gleichzeitig von einem Rechner bearbeitet, so daß die Anzahl viraler Genome ermittelt werden kann. Da ein Viruspartikel zwei RNA-Genomkopien enthält, entspricht die ermittelte Kopienzahl, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor, der Anzahl der Viruspartikel. Beim Vergleich von Titern, die einerseits mittels Endpunktverdünnung und andererseits mittels TaqMan-PCR bestimmt wurden, wurde bislang dieses System die Erfahrung gesammelt, daß der molekularbiologisch ermittelte Titer durchschnittlich um den Faktor 10 höher liegt, als der auf Zellen bestimmte Titer (M. Scherr, mündliche Mitteilung).

3. 2. 6. Durchflußzytometrie (FACS, „Fluorescence Activated Cell Sorting“)

Mit Hilfe eines Durchflußzytometers (FACScan, Becton Dickinson) können Zellen durch fünf verschiedene Parameter charakterisiert werden. Zum einen können die Größe und die Granularität der Zellen physikalisch durch die Streuung von Licht untersucht werden. Zum anderen kann Fluoreszenz von drei verschiedenen Wellenlängen detektiert werden. Unter Verwendung von Fluoreszein-gekoppelten Antikörpern beziehungsweise Proteinen kann so spezifisch die Expression von Transgenprodukten oder beispielsweise Differenzierungsmarkern nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden (Herzenberg, 1978). Die erhaltenen Daten wurden mit dem vom Gerätehersteller mitgelieferten Computerprogramm CellQuest (Beckton Dickinson) ausgewertet.

3. 2. 6. 1. Funktionsprinzip des Durchflußzytometers

Durch eine Stahlkapillare wird Einzelzellsuspension in das FACS-Gerät gesaugt. In einer Trägerflüssigkeit werden die Zellen einzeln durch eine Meßkapillare geschickt. Dort wird die Zelle vom Licht eines Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm getroffen. Die von den Zellen verursachte Streuung und Emission wird durch entsprechende Detektoren registriert.

Aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Zelle wird das eingestrahelte Licht gestreut. Das Streulicht hat dabei unterschiedliche qualitative und quantitative Eigenschaften. Im Kleinwinkelbereich von $3 - 10^\circ$ ist die Streuung des einfallenden Lichtes maximal und gibt Aufschluß über die Größe der Zelle (Vorwärtsstreulicht, „forward angle light scatter“, FSC). Ein kleinerer Teil des Lichtes streut seitlich (Seitwärtsstreulicht, „side angle light scatter“, SSC) und gibt Informationen über die Membranfaltung und die Granularität der Zelle.

Oberflächen- oder intrazelluläre Proteine werden mit Fluorochrom-assoziierten Antikörpern nachgewiesen. Fluorochrome absorbieren Licht einer charakteristischen Wellenlänge, wobei durch die aufgenommene Energie Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Beim Rücksprung der Elektronen auf das Ausgangsniveau wird Energie in Form von Photonen, die als Fluoreszenz detektiert werden können, oder Wärme frei. Das emittierte Licht ist energieärmer und deshalb langwelliger.

Das FACS besitzt einen Argonlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm abgibt. Je nach verwendetem Fluorochrom wird dann Licht mit einem unterschiedlichen Emissionsspektrum frei (siehe nachstehende Tabelle).

Fluorochrom	Abkürzung	Emissionsspektrum	Emissionsmaximum	Meßkanal
Fluoreszein-Isothiocyanat	FITC	475 – 600 nm	525 nm	Fl-1
R-Phycoerythrin	PE	550 – 650 nm	575 nm	Fl-2
Phycoerythrin-Cyanin 5.1	PC5	660 – 680 nm	670 nm	Fl-3
grünes Fluoreszenzprotein	GFP	n. b.	507 nm	Fl-1

Tabelle 3-1: Auflistung der verwendeten Fluorochrome mit ihren Emissionsspektren und Emissionsmaxima, sowie des zugehörigen Meßkanals. (n. b. – nicht bekannt).

Manche Fluorochrome, wie zum Beispiel GFP, emittieren sehr intensiv über ihr gesamtes Spektrum und haben deshalb nicht immer ein ausgeprägtes Maximum. Durch die Überschneidung der Emissionsbereiche der Meßkanäle treten dann im benachbarten Meßkanal ebenfalls Fluoreszenzen auf, die das Meßergebnis beeinflussen. Deshalb muß der Anteil der Emission in anderen Meßkanälen von dem des zu Messenden abgezogen werden. Die Subtraktion wird als Fluoreszenzkomensation bezeichnet und kann am Gerät eingestellt werden.

3. 2. 6. 2. FACS-Markierung

FACS-Wasch: 1 % FCS
0,1 % NaN₃
in PBS

FACS-Fixierer: 1 % Formaldehyd
in PBS

An oder in Zellen können monoklonale Antikörper an die nachzuweisenden Proteine binden. Die Antikörper können direkt mit Fluorochromen gekoppelt sein, oder ihre spezifische Bindung muß in einem weiteren Schritt mit einem konjugierten Zweitantikörper nachgewiesen werden. Dienen fluoreszierende Proteine als Marker, wie das grüne Fluoreszenzprotein (GFP), kann diese Fluoreszenz ohne weitere Markierung im FACS

nachgewiesen werden. Will man neben der Expression von Marker oder Transgen auch andere Eigenschaften, wie beispielsweise den Differenzierungsgrad einer einzelnen Zelle detektieren, so kann man mit unterschiedlichen Antikörpern und Fluorochromen eine Doppel- in seltenen Fällen auch Dreifachmarkierungen vornehmen.

Für die Markierung werden Einzelzellsuspensionen von 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen verwendet, die gegebenenfalls durch Trypsinieren generiert werden. Die Zellen werden zunächst in ein Polystyrolröhrchen überführt und mit FACS-Wasch aufgefüllt. Nach Zentrifugation (5 min., $200 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) wird der Waschpuffer dekantiert. Dann wird der Erstantikörper gegen das nachzuweisende Protein in die Zellsuspension gegeben und durch Vortexen gründlich gemischt. Es folgt eine Inkubation von 20 – 30 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Zellen werden erneut mit FACS-Wasch gewaschen. Wenn erforderlich, kann der Zweitantikörper zugegeben werden, wobei die Durchführung der des Erstantikörpers entspricht. Anschließend werden die Zellen in einer angemessenen Menge (200 – 500 μl) FACS-Fixierer aufgenommen. Wenn der Erstantikörper direkt mit dem Fluorochrom konjugiert ist, kann nach dem zweiten Waschen sofort fixiert werden. Zeigt das nachzuweisende Protein eine Autofluoreszenz, dann kann direkt nach dem ersten Waschen fixiert werden, sofern kein weiteres Protein in den einzelnen Zellen nachgewiesen werden soll.

Die Zellen müssen nicht fixiert werden, wenn die Messung unmittelbar nach der Markierung erfolgt. Sie müssen hierfür jedoch auf Eis gehalten werden. Werden die Zellen fixiert, können sie maximal eine Woche bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

3. 2. 7. Arbeitsmethoden mit hämatologischen CD34⁺-Stammzellen

3. 2. 7. 1. Präparation und Kultur von hämatopoetischen Stammzellen

Hämatopoetische, CD34 exprimierende Stammzellen können aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripherem Blut isoliert werden. Knochenmark wird durch Punktion unter lokaler Anästhesie aus dem Beckenkammknochen gewonnen. Nabelschnurblut wird durch eine Drainage aus Plazenta- und Nabelschnurgewebe gewonnen. Für gewöhnlich zirkulieren nur sehr wenige Stammzellen im peripherem Blut, deshalb werden Patienten

beziehungsweise Spender vorher häufig mobilisiert werden. Dies bedeutet, daß die Anzahl durch Stimulation mit entsprechenden Wachstumsfaktoren erhöht werden muß. Die Separation von Stammzellen erfolgt hier aus Leukapheresematerial.

Unabhängig von welcher Quelle die Stammzellen präpariert werden, müssen zunächst die mononukleären Zellen mittels Ficollgradient aus den Antikoagulanzen-haltigen Rohmaterial isoliert werden. Das Ausgangsmaterial wird 1:3 mit PBS verdünnt. In eine ausreichende Anzahl konischer 50 ml-Röhrchen werden jeweils 15 ml steriles Ficoll ($\delta = 1,077 \text{ g / ml}$, Seromed) vorgelegt. Das Ficoll wird dann vorsichtig mit je 20 ml Zellsuspension überschichtet. Dabei sollten sich beide Lösung nicht mischen und eine scharfe Phasengrenze bilden. Der Gradient bildet sich durch Zentrifugation (30 min., 400 x g, 20 °C, ohne Bremse!), wobei sich Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen) in der Interphase anreichern, während die Thrombozyten sich am Boden in der Ficollphase befinden. Die zellhaltige Interphase wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in ein frisches Röhrchen überführt und dreimal mit PBS gewaschen (10 min., 500 x g, 20 °C). Anschließend werden die Zellen in MACS-Puffer (0,5 % BSA und 2 mM EDTA in PBS) auf 10^8 Zellen pro 300 μl Suspension eingestellt.

Die Markierung der Zellen mit CD34-Antikörpern und magnetischen Beads, sowie die Separation mit entsprechenden Säulen erfolgt nach Angaben des Herstellers des kommerziellen Zellseparationskits (CD34 *Progenitor Cell Isolation Kit*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Nach einer Zellzahlbestimmung wird die Reinheit durchflußzytometrisch bestimmt.

Werden die Zellen nicht unmittelbar nach Isolation verwendet, können sie in einer Lösung aus 90 % HSA und 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert werden (siehe auch 3. 2. 1.).

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in serumfreiem Medium (X-Vivo10, BioWhittaker), supplementiert mit 1 % HSA (Blutspendedienst Hessen), 2 mM L-Glutamin (LifeTechnologies), 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin (LifeTechnologies). Außerdem erfolgt die Zugabe 100 ng/ml SCF und 100 ng/ml Flt3-Ligand. Darüber hinaus werden entweder 20 ng/ml IL-3 und 20 ng/ml IL 6 oder 100 ng/ml TPO zugegeben. Die Kulturbedingungen sind wie bei anderen Zellen 37 °C und 5 % CO_2 .

3. 2. 7. 2. Transduktion von CD34⁺-Zellen

Die Transduktion der CD34⁺-Zellen wird mit frisch präparierten oder kryokonservierten Zellen durchgeführt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden ungefähr 16 Stunden vor der Infektion aufgetaut. Dazu werden in 14 ml-Röhrchen 10 ml RPMI mit 20 % FCS vorgelegt. Die Zellen werden dann bei 37 °C aufgetaut und in das vorbereitete Medium überführt. Nach Zentrifugation (10 min., 500 x g, 20 °C) wird der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein frisches Röhrchen überführt. Die Zellen werden erneut mit 10 ml RPMI mit 20 % FCS gewaschen und dann in X-Vivo10 (Biowhittaker) mit 1 % HSA, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin aufgenommen. Es wird eine Zellzahl von 5x10⁵ bis 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspension mit Zytokinen (100 ng/ml SCF, 100 ng/ml Flt3-Ligand, je 20 ng/ml IL-3 und IL-6 alternativ 100 ng/ml TPO) supplementiert. Dann werden die Zellen 16 Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO₂).

Parallel wird die RetroNectin-Beschichtung der 24-Lochplatten für die Transduktion durchgeführt. Dafür wird in die benötigte Anzahl an Vertiefungen der Zellkulturplatte jeweils 1 ml [50 µg/ml] rekombinantes Fibronektinfragment CH-296 (RetroNectin, Takara) gegeben. Die Platte wird dann 2 Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Lösung abgezogen und einmal mit 1 x HBSS gewaschen. Es erfolgt eine Belegung unspezifischer Bindeplätze mit jeweils 1 ml 2 % BSA (steril) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die BSA-Lösung wird verworfen und die Löcher einmal mit PBS gespült. Bis zur Benutzung wird das PBS auf der Platte belassen und kann so auch mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

Für die Transduktion wird das PBS abgezogen und 1 x 10⁵ bis 2 x 10⁵ Zellen/Kavität ausgesät. Zu den Zellen wird dann Virusüberstand – beziehungsweise Medium für die Kontrolle – zugesetzt, welcher mit dem entsprechend verwendeten Zytokincocktail und 4 µg/ml Protaminsulfat supplementiert wird. Die Platte wird zentrifugiert (90 min., 1215 x g, 32 °C) und danach für mindestens 2,5 Stunden beziehungsweise über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgt ein drei Viertel Mediumwechsel. Ein Teil der Zellen wird dann weiter kultiviert, und drei bis vier Tage oder später eine FACS-Markierung durchgeführt. Mit dem anderen Teil der Zellen werden unmittelbar nach der Infektion Differenzierungskulturen in semisoliden Medien (siehe 3. 2. 7. 3.) angesetzt. Transduzierte Zellen, die für einen Rekonstitutionsversuch in NOD/SCID-Mäusen

vorgesehen sind, werden direkt nach der Infektion verwendet. Der Kultivierungszeitraum sollte hierbei 36 – 48 Stunden nicht überschreiten.

3. 2. 7. 3. Differenzierungskulturen in semisoliden Medien

Die Klonogenität und Fähigkeit zur Differenzierung von *ex vivo* manipulierten Zellen kann in semisoliden Medien wie Methylzellulose oder Agar getestet werden. Die Zellen, die durch diesen Assay erfaßt werden („colony forming cells“, CFCs), sind in der Differenzierung während der Hämatopoese weiter fortgeschritten als solche, die in einem NOD/SCID-Mausmodell (SCID „repopulating cells“, SRCs) beobachtet werden.

In einem Röhrchen werden 3 ml Methylzellulose (Mehtocult H4431, Stem Cell Technologies) pro zu untersuchender Zellpopulation vorgelegt. Hierin enthalten sind unter anderem die Zytokine G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-6, SCF und EPO. Das semisolide Medium wird im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Von den transduzierten Zellen werden jeweils 1500 Zellen in 300 µl IMDM aufgenommen und zur vorgewärmten Methylzellulose gegeben. Das gründliche Durchmischen erfolgt durch Vortexen. Anschließend werden die Röhrchen für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Zum Ausplattieren werden jeweils 1 ml der Suspension pro 35mm-Zellkulturschale gegeben. Die Schalen werden vorsichtig geschwenkt, bis der Boden vollständig benetzt ist. Die Platten werden im Brutschrank inkubiert. Nach acht bis zwölf Tagen kann der Test mikroskopisch ausgewertet werden.

Alternativ zur Methylzellulose können auch Agarkulturen angesetzt werden. Hierzu werden 300 – 600 Zellen in 1 ml Agar (0,35 % Agar, 25 % FCS, 50 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-3, 10 ng/ml G-CSF, 10 ng/ml GM-CSF in McCoy's Medium) pro Zellkulturschale ausgesät. Nach 14 Tagen Inkubation im Brutschrank werden die Zellen mikroskopisch ausgewertet.

3. 2. 7. 4. FACS-Analyse transduzierter CD34⁺-Zellen

Um die Effizienz der Transduktion einerseits und den Anteil CD34⁺-Zellen zu ermitteln, wird eine FACS-Analyse durchgeführt. Die Transduktionseffizienz kann anhand der Fluoreszenz im Meßkanal FI-1 (siehe 3. 2. 6. 1.) bestimmt werden, wenn die Zellen mit GFP als Markergen transduziert wurden. Der Anteil CD34⁺-Zellen wird durch Markierung mit CD34-Antikörpern (CD34 PC5, Beckman-Coulter) bestimmt. Die Durchführung erfolgt wie unter 3. 2. 6. 2. beschrieben.

3. 2. 8. Analyse von gp91-exprimierenden Zellen

3. 2. 8. 1. Chemilumineszenz-Assay

Die funktionelle Rekonstitution der NADPH-Oxidase kann anhand der Bildung von O₂⁻-Radikalen untersucht werden (Porter et al., 1992). Im Chemilumineszenz-Assay werden lentiviral transduzierte X-CGD PLB-985 sowie PLB-985 Wildtypzellen terminal differenziert und untersucht. Bei der funktionell rekonstituierten NADPH-Oxidase werden O₂⁻-Radikale gebildet, die spontan, oder durch Superoxid-Dismutase katalysiert, zu H₂O₂ umgesetzt werden. (Curnutte, 1993). Die Basis des Assays ist die Oxidation des Luminols. Dabei werden durch zelluläre Peroxidasen Elektronen vom H₂O₂ auf Luminol übertragen. Die Spezifität des Tests kann durch Inhibierung der Reaktion mittels Katalase nachgewiesen werden. Die bei dem Experiment entstehende Chemilumineszenz wird spektralphotometrisch (Berthold) dokumentiert und als Kinetik dargestellt.

Für diesen Test werden die zu untersuchenden Zellen fünf bis sechs Tage zuvor in Medium mit 0,5 % DMF ausdifferenziert. Nach einer Zellzahlbestimmung werden 4 x 10⁵ Zellen pro Ansatz zentrifugiert (5 min., 300 x g, 20 °C), in 1 ml PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in 400 µl 10 µM Luminol in HBSS (Gibco) aufgenommen. In vier Kavitäten einer Luminometer-Platte werden jeweils 100 µl Ansatz überführt. Das zur Stimulation der Radikalbildung notwendige PMA und die für die Umsetzung des Luminols notwendige Meerrettich-Peroxidase wird in kleinen Portionen bei -20 °C gelagert. Ein 2 µl Aliquot der PMA-Stammlösung (1 mg/ml in DMSO) wird erst mit 18 µl DMSO und dann mit 180 µl H₂O versetzt und bis zum Test auf Eis

gehalten. Ein Gefäß der zu je 100 µl aliquotierten Peroxidase (1 U/ µl) wird ebenfalls direkt nach dem Auftauen auf Eis gesetzt. Nachdem die Luminometer-Platte in das Gerät eingesetzt und dieses für die Messung vorbereitet wurde, werden die PMA- und die Peroxidaselösung 1:5 mit 10µM Luminol in HBSS verdünnt. Zunächst werden 10 µl Peroxidase pro Ansatz zügig mit einer Multipette (Eppendorf) zugegeben und unmittelbar danach mit 10 µl PMA-Lösung in jeweils zwei der vier Ansätze die Reaktion induziert. Danach wird sofort die Messung gestartet. Die Messung und Aufzeichnung der Daten erfolgt durch das Luminometer.

3. 2. 8. 2. Zytochrom *c*-Assay

PBSG-Puffer: 0,9 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂
7,5 mM Glucose
in PBS

Eine weitere Methode zum quantitativen Nachweis der Superoxidproduktion ist der Zytochrom *c*-Assay (nach Mayo und Curnutte, 1990). Hierbei wird der zeitliche Verlauf der Reduktion von Zytochrom *c* durch die von den Zellen gebildeten O₂⁻-Radikale spektralphotometrisch verfolgt. Die Spezifität des Assays für Sauerstoffradikale kann durch Inhibierung der Reduktion mit Superoxid-Dismutase nachgewiesen werden (Volkman et al., 1984).

Für diesen Test werden die transduzierten promyeloischen Progenitorzellen (PLB-985, X-CGD PLB-985) fünf bis sechs Tage zuvor mit 0,5 % DMF im Medium zur Ausdifferenzierung gebracht. Für den Test wird stets eine frisch Stammlösung von 1,5 mM Zytochrom *c* (18,57 mg/ml) in PBSG-Puffer angesetzt. Pro zu untersuchender Probe werden dann 50 µl der Stammlösung 1:20 mit PBSG verdünnt. Nach Zellzahlbestimmung werden 4x10⁶ Zellen zentrifugiert (5 min., 500 x g, 20 °C) und mit zwei bis drei ml PBS gewaschen. Das Zellsediment wird in ein ml Zytochrom *c* Lösung aufgenommen und jeweils 250 µl in 4 Kavitäten einer Mikrotiterplatte überführt. Ein 2 µl Aliquot einer PMA-Stammlösung (1 mg/ml in DMSO, Lagerung -20 °C) wird zunächst mit 18 µl DMSO versetzt und dann mit 365 µl H₂O verdünnt. Die Lösung wird bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Die bestückte

Platte wird in den ELISA-Reader (Spektralphotometer für Mikrotiterplatten, SpectraMax, Molecular Dynamics) eingesetzt. Die gefüllten Kavitäten werden dann zur Ermittlung des Grundwertes einmal bei 550 nm gemessen. Dann wird zügig zu jeweils zwei der vier Ansätze pro Probe 10 µl PMA-Lösung mit einem Multipette (Eppendorf) pipettiert und die Messung gestartet.

3. 2. 8. 3. FACS-Analyse gp91^{phox} exprimierender Zellen

Der Anteil gp91^{phox} exprimierender Zellen wird durchflußzytometrisch bestimmt. Hierzu werden die Zellen mit einem Antikörper markiert, der gegen den extrazellulären Bereich des Glycoproteins 91 der NADPH-Oxidase gerichtet ist. Die Markierung wird wie unter 3. 2. 6. 2. beschrieben durchgeführt. Abweichend werden die Zellen 40 min. bei Raumtemperatur mit gp91-Antikörper (Roos et al., 1996) als Nicht-Fluorhochchrom konjugiertem Erstantikörper inkubiert. Der Nachweis des Antikörpers erfolgt wie beschrieben mit dem PE-gekoppelten Zweitantikörper.

3. 2. 8. 4. Nachweis der gp91^{phox}-Expression durch Westernblot-Analyse

Lysepuffer: 1 % Triton X-100
150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,4
2 mM EDTA
1 Tablette „Complete Protease-Inhibitor“ Mix (Boehringer) für je 10 ml
0,5 mM PMSF

Zur Überprüfung der Expression des gp91^{phox}-Proteins werden jeweils etwa 10⁷ transduzierte und differenzierte (fünf bis sechs Tage in Medium mit 0,5 % DMF) X-CGD PLB-985 Zellen zentrifugiert (5 min., 500 x g, 20 °C) und einmal mit PBS gewaschen. Die Röhrchen werden für ein bis zwei min. kopfüber auf Labortücher gestellt. Das Zellsediment wird in einem ml Lysepuffer aufgenommen und 10 –15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird erneut zentrifugiert (5 min., 20.000 x g, 4 °C). Der Überstand wird in vorgekühlte Gefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Lysate werden in 5 x Auftragspuffer aufgenommen und nach Erhitzen (5 min., 95 °C) auf ein 8 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Maniatis, 1989) aufgetragen

und die aufgetrennten Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran (BioRad) geblottet (Verhoeven et al., 1989). Die Detektion erfolgt mit einem monoklonalem Maus-anti-Human gp91^{phox}-Antikörper (A. Görlach, Uniklinik Frankfurt). Die spezifische Bindung des Antikörpers erfolgt mit einem Ratte-anti-Maus Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Die Banden werden in einer Chemilumineszenzreaktion (ECL „Detection Reagent“, Amersham) durch die Umsetzung von Luminol durch die Peroxidase auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

3. 2. 8. 5. Quantitative Proteinbestimmung

5x Bradford-Lösung: 42,5 % (v/v) H₃PO₄
 25 % (v/v) EtOH
 0,05 % (w/v) Commassie Brilliant Blue G250

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde zunächst eine 1x Bradford-Lösung durch verdünnen mit H₂O hergestellt. Als Eichkurve wurden unterschiedliche Mengen BSA im Bereich von 0 - 20 µg BSA/ml verwendet. Dafür wurde zunächst eine Stammlösung von 100 mg/ml BSA hergestellt und diese 1:100 verdünnt [1 µg/µl]. Die Proben für die Eichkurve wurden nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

µl BSA [1 µg/µl]	0	2	4	6	8	12	16	20
µl Puffer	20	18	16	14	12	8	4	0
Vol. gesamt [µl]	20	20	20	20	20	20	20	20
Gehalt BSA [g/l]	0	2	4	6	8	12	16	20

(Als Puffer zur Verdünnung wurde der Puffer der unbekannt Proteinlösung verwendet)

Zu den jeweils 20 µl vorgelegte Proteinlösung wurde dann 980 µl 1x Bradford-Lösung zugegeben. Von den Proben mit unbekanntem Proteingehalt wurden auch 20 µl in Reagenzgefäß vorgelegt und mit 980 µl 1x Bradford-Lösung versetzt. Alle Proben wurden durch vortexen gemischt und dann jeweils 250 µl einer Probe in zwei Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Dann erfolgte die Messung in einem Photometer ELISA-Reader (SpectraMax, Molecular Dynamics) bei 595 nm. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt

automatisch durch das Spektrometer. Dabei ergab sich die Eichkurve aus einer Auftragung der Absorption gegen die Konzentration. Die Eichgerade wurde über lineare Regression ermittelt, wonach auch der Proteingehalt der Proben mit unbekannter Proteinkonzentration berechnet wurden.

3. 2. 8. 6. Semiquantitativer Nachweis der Integration von Transgenen durch PCR

Durch semiquantitative PCR wird die durchschnittliche Anzahl der integrierten Transgenkopien pro Zelle ermittelt. Aus den transduzierten Zellen wird mit DNAzol (Life Technologies) nach Herstellerangaben genomische DNA isoliert. Die Mengen werden spektralphotometrisch bestimmt. Die genomische DNA wird für die PCR auf 100 ng/ µl eingestellt. Die Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgt wie unter 3. 1. 6. 6. beschrieben. Für die Reaktion werden 1 µg genomische DNA eingesetzt. Damit die Stärke der Banden quantitativ beurteilt werden kann, wird zu 1 µg genomische DNA ohne Zielsequenz jeweils die Menge an Plasmid mit Zielsequenz eingesetzt, die eins, zwei, fünf und zehn Kopien pro Zelle entspricht. Dabei geht man davon aus, daß 1 µg genomische DNA etwa 150.000 Zellen entspricht. Mit der Formel $[g/Kopie \times 150.000 = 1 \text{ Kopie/Zelle}]$ und mit dem Näherungswert, das 330 g/mol das Gewicht eines Basenpaares ist, kann man die Menge an Plasmid-DNA berechnen, die einer Kopie oder mehreren Kopien pro Zelle entspricht. Die untersuchte Zielsequenz ist ein ungefähr 83 bp umfassendes Fragment des gp91^{phox}-Gens. Zur Kontrolle, daß gleiche Mengen an genomischer DNA verwendet wurden, wird die PCR mit GAPDH-spezifischen Oligonukleotiden unter gleichen Bedingungen wiederholt.

4. Ergebnisse

4. 1. Etablierung eines Protokolls für die Transduktion hämatopoetischer Stammzellen mit lentiviralem Virusüberstand

Als Grundlage für die Entwicklung einer lentiviralen Gentherapie sollte zunächst ein Protokoll für die Transduktion von CD34⁺-Zellen entwickelt werden. Dazu wurden zunächst die Bedingungen der transienten Transfektion hinsichtlich des Titors optimiert. Danach wurden verschiedene Methoden zur Anreicherung von Viruspartikeln etabliert und auf Zelllinien getestet. Die erfolgreichsten Methoden wurden auf effizienten Gentransfer in Stammzellen untersucht.

4. 1. 1. Konstruktion der lentiviralen Vektoren pSIN-GFP, pRRL-CMV-GFP-WPRE-SIN und pRRL-CMV-IRES-GFP-WPRE-SIN

Zur Klonierung des Vektors pSIN-GFP wurde im Konstrukt pSIN2-CMV-LacZ (freundlicherweise von R. Zuffrey, Genf, zur Verfügung gestellt) das Markergen *LacZ* gegen EGFP („enhanced green fluorescent protein“) ausgetauscht. Dafür wurde der Vektor mit Kpn I geöffnet und die 3′ überstehenden Enden mit T4-DNA-Polymerase (NEB) entfernt. Gleichzeitig wurde der Vektor pEGFP-N1 (Clontech) mit Not I linearisiert und die 5′ überstehenden Enden durch eine Behandlung mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend wurden beide Plasmide mit BamH I verdaut. Danach erfolgte die Isolierung des etwa 6 kb großen Vektors und des etwa 700 bp großen GFP-Fragmentes mittels Gel-Extraktion. Die Ligation wurde dann in zwei Ansätzen mit 5fachen beziehungsweise 20fachen Überschuß an GFP-Insert angesetzt.

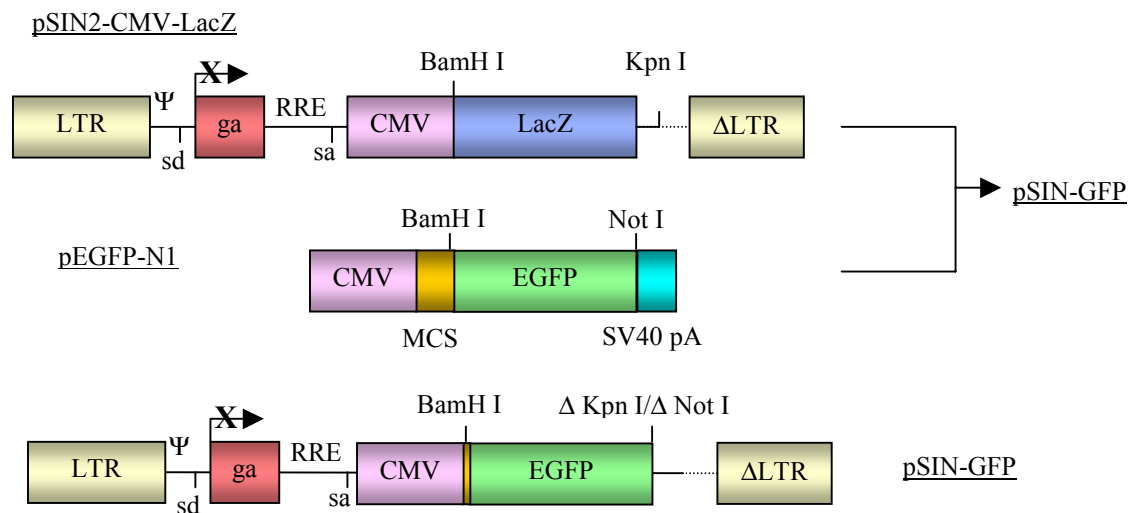


Abb. 4-1: Klonierungsstrategie für den Vektor pSIN-GFP.

Als eine Weiterentwicklung des etablierten Vektors pSIN-GFP sollte ein Vektor konstruiert werden, der zum einen *Tat*-unabhängig und zum anderen selbst-inaktivierend ist. Die Unabhängigkeit vom Transaktivator *Tat* erreichte man durch Austausch der Promotor-Enhancer-Sequenzen in der U3-Region der 3' LTR gegen die entsprechende Region des Rous-Sarkom Virus (RSV) (Dull et al., 1998). Selbst-inaktivierend wurde der Vektor durch eine 400 bp große Deletion der U3-Region in der 5' LTR, so daß nach der reversen Transkription keine Promotor-Enhancer-Sequenzen mehr wirksam sind (Zuffrey et al., 1998). Ein Vektor mit diesen Eigenschaften ist der pRRL-PGK-GFP-SIN (R. Zuffrey, Genf), der als Ausgangsvektor diente. Um gute Expressionsraten zu erhalten, wurde die Kassette aus internem Promotor (PGK) und Markergen (EGFP) durch eine Kassette, die neben dem CMV-Promotor und EGFP außerdem noch über eine WPRE-Sequenz („Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element“) verfügt, ersetzt. Diese fördert den Transport von ungespleißten Transkripten vom Kern in das Zytosol und führt somit zu einer erhöhten Expression. Diese Kassette wurde aus dem Vektor pHR'CMV-GFP-WPRE (pCGW) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Zuffrey, Genf) mit den Restriktionsendonukleasen Kpn I und Cla I isoliert und in den Ausgangsvektor über die gleichen Schnittstellen eingebaut.

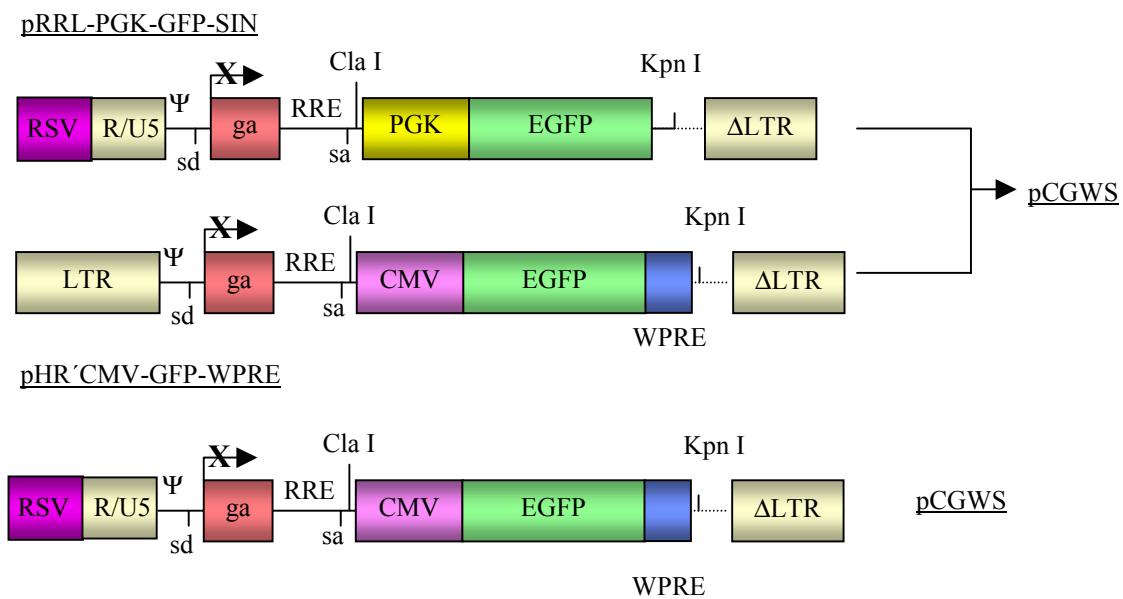


Abb. 4-2: Schema der Klonierung des Vektors pRRL-CMV-GFP-WPRE-SIN (pCGWS).

Damit verschiedene therapeutische Gene in einem lentiviralen Kontext getestet werden können, wurde der Vektor pCGWS so umstrukturiert, daß über eine multiple Klonierungsstelle (MCS) ein Gen leicht eingebaut werden kann. Das Markergen EGFP wurde durch eine Kasette von IRES („internal ribosomal entry site“) und EGFP ersetzt. Dies sollte neben der Expression eines beliebigen Gens auch ein Überprüfen und Quantifizieren des Transduktionsvorgangs durch die EGFP-Expression erlauben. Der Ausgangsvektor pCGWS wurde mit BstB I linearisiert und die überstehenden Enden durch Klenow-Behandlung aufgefüllt. Das zweite Plasmid, pIRES2-EGFP (Clontech), wurde mit Not I geöffnet und ebenfalls mit Klenow-Fragment behandelt. Danach wurden beide Ansätze mit der Restriktionsendonuklease Nde I inkubiert. Vor der Gelextraktion der Fragmente und der Ligation über Nacht wurde der als Vektor dienende pCGWS mit alkalischer Phosphatase behandelt.

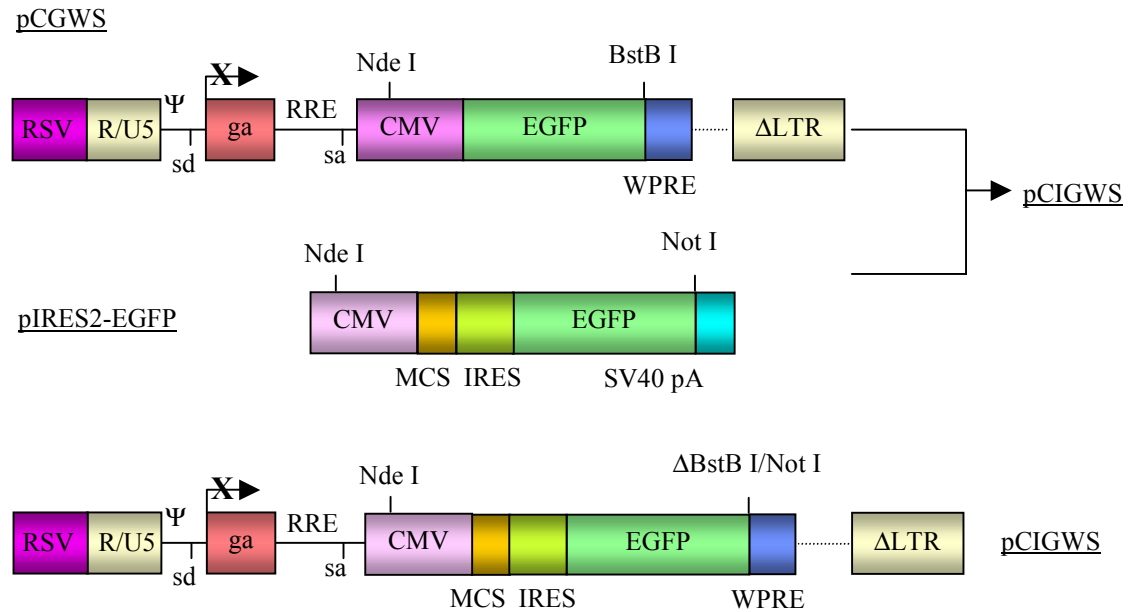


Abb. 4-3: Klonierungsschema des Vektors pRRL-CMV-IRES-GFP-WPRE-SIN (pCIGWS).

4. 1. 2. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Produktion von lentiviralen Partikeln mit hohem Titer

Um einen möglichst effizienten Gentransfer in CD34⁺-Zellen zu erzielen, wurden Methoden zur Aufkonzentrierung von lentiviralen Partikeln getestet und optimiert. So wurden neben der Optimierung des Titers bei der Produktion von Virusüberständen auch physikalische und chemische Methoden zur Anreicherung der Partikel untersucht.

4. 1. 2. 1. Auswirkung von Natriumbutyrat und unterschiedlicher Mengen Plasmid auf den Virustiter

Für eine Produktion von Viruspartikeln müssen zunächst die erforderlichen drei Plasmide in 293T-Zellen cotransfiziert werden. In diesem Experiment wurde zum einen das Verpackungskonstrukt pCMVΔR8.93 (Zuffrey, Genf) verwendet. Dieses Plasmid enthält die HIV-1 Strukturgene *gag* und *pol* sowie die Information für das regulatorisch wirksame *Rev*-Protein. Die Expression dieser Gene durch einen CMV-Promotor reguliert. Zum anderen werden die Viruspartikel durch Glycoprotein G des VSV pseudotypisiert. Die Information für

dieses Hüllprotein ist auf dem Plasmid pMD.G kodiert. Als drittes Plasmid wurde hier der Transgenvektor pCGWS (siehe 4. 1. 1. 2.) eingesetzt.

Für eine Optimierung der Verhältnisse der einzelnen Konstrukte (Vektor, Verpackung, *Envelope*) wurden verschiedene Mengen an Plasmid-DNA ausgetestet. Darüber hinaus wurde die Auswirkung von Natriumbutyrat (NaBut) auf den Titer untersucht. Diese Substanz ist ein Histon-Deacetylase-Hemmer, der noch eine Reihe anderer Effekte zeigt. Die Akkumulation von acetylierten Histonen ist für eine effiziente Transkription notwendig (Grunstein, 1997). Darüber hinaus konnte für eine Reihe von Viren ein stimulierender Effekt auf die virale Genexpression und Replikation nachgewiesen werden (Radsak et al., 1989; Saemundosen et al., 1980; Ash, 1986). Auch für HIV-1 konnte eine Aktivierung der LTR gesteuerten Expression nachgewiesen werden (Bohan et al., 1987). Für dieses Experiment wurde, wie unter 3. 2. 2. erläutert, eine Transfektion durchgeführt. Die getesteten Mengenverhältnisse sind in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Tab. 4-1: Verwendete Plasmidmengen zur Optimierung des Virustiters.

Kombination	µg Plasmid Transgenvektor	µg Plasmid Verpackungskonstrukt	µg Plasmid env-Konstrukt	µg gesamt pro Petrischale
A	10	6,5	3,5	20
B	20	13	7	40
C	15	10	5	30
D	10	10	2	22
E	20	20	4	44

Bei der Transfektion wurde ein zweifacher Ansatz des Präzipitates hergestellt und zu gleichen Teilen auf zwei Petrischalen pipettiert. Der 8stündigen Transfektion folgte ein Mediumwechsel, wobei jeweils eine Platte des gleichen Ansatzes zusätzlich mit NaBut (Endkonzentration 10 mM) versetzt wurde. Nach Inkubation über Nacht erfolgte erneut auf allen Platten ein Mediumwechsel. Dabei wurde das Volumen des Mediums auf 5 ml reduziert. Anschließend wurde über 24 Stunden der Virusüberstand gesammelt und damit eine Titerbestimmung angesetzt.

Die Auswertung der Titerbestimmung zeigte, daß in vier von fünf Kombinationen die Zugabe von Natriumbutyrat zu einer Erhöhung des Titers führte. Am deutlichsten war der Effekt in

Kombination D, wo der Titer durch Zugabe des Reagenz um das 4,3fache, von $1,0 (\pm 0,5) \times 10^6$ IU/ml auf $4,3 (\pm 1,2) \times 10^6$ IU/ml, gesteigert wurde. Am geringsten fiel die Erhöhung bei Kombination A aus, hier stieg der Titer um das 1,7fache ($3,3 \pm 2,1 \times 10^6 \rightarrow 5,7 \pm 3,1 \times 10^6$ IU/ml). In der Transfektion mit der Plasmidkombination E konnte kein Effekt durch Zugabe von NaBut beobachtet werden. Bei der Transfektion ohne Inkubation in Gegenwart des Histon-Deacetylase-Hemmers konnte mit Kombination A der höchste Titer erzielt werden ($3,3 \pm 2,1 \times 10^6$ IU/ml). Die Anzahl infektiöser Partikel bei Transfektion mit Kombination B und E ohne NaBut war gleich ($2,3 \pm 1,2 \times 10^6$ IU/ml und $2,3 \pm 0,6 \times 10^6$ IU/ml). Es konnte jedoch nur bei Kombination B durch die Gabe von Butyrat eine Steigerung des Titers um etwa das dreifache erzielt werden.

Die graphische Auswertung der Titerbestimmung ist in Abbildung 4-4 dargestellt. Ausgehend von diesem und anderen Versuchen (nicht gezeigt) wurde die Mengen an Plasmid-DNA der Kombination B und die Behandlung mit 10 mM NaBut im folgenden für alle Transfektionen verwendet, da diese Kombination in allen Experimenten die besten Resultate lieferte.

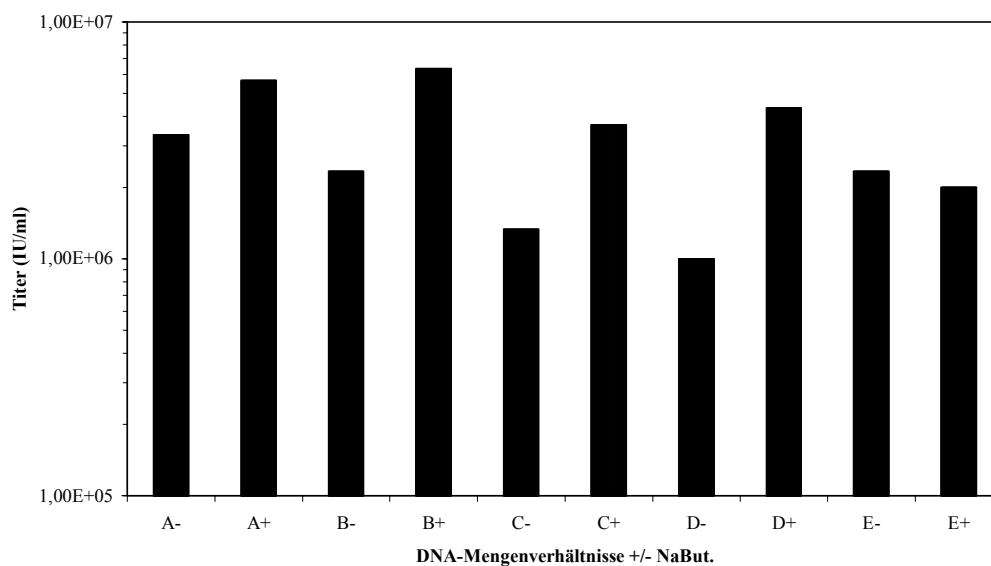


Abb. 4-4 : Vergleich der erzielten Titer nach Transfektion mit verschiedenen Variationen der Menge an Plasmid-DNA. Die unterschiedlichen Verhältnisse der Konstrukte zu einander wurden jeweils mit (+) und ohne (-) 10 mM Natriumbutytrat getestet. Der in einer Dreifachbestimmung durch Endpunktverdünnung (siehe 3. 2. 5. 1.) auf 293T-Zellen bestimmte Titer ist hier als Mittelwert dargestellt. Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung. Die Kombinationen A bis E entsprechen den in Tab. 4-1 erläuterten Mengen der jeweiligen Komponenten des verwendeten Plasmidsystems.

4. 1. 2. 2. Einfluß unterschiedlicher serumfreier Medien auf den Virustiter

Da für die klinische Anwendung die Transduktion von Stammzellen unter serumfreien Bedingungen stattfinden muß, wurde ausgetestet, welches Medium sich zur Produktion von viralen Partikeln eignet. Dazu wurden zum einen DMEM (GIBCO-BRL) und zum anderen X-VIVO 10 (BioWhittaker) getestet, das speziell zur Kultivierung von Stammzellen unter serumfreien Bedingungen entwickelt wurde. Darüber hinaus erfolgte der Test von 293G-Medium (BioWhittaker), welches für eine serumfreie Kultur von 293T-Zellen entwickelt wurde. Für diesen Versuch wurden 293T-Zellen ausplattiert, wie unter 3. 2. 2. dargelegt, transfiziert und mit NaBut inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und auf jeweils fünf Platten eines der oben beschriebenen Medien gegeben. Der Virusüberstand wurde an drei aufeinander folgenden Tagen gesammelt, die entsprechenden Überstände vereint und der Virustiter bestimmt.

Aus der graphischen Auswertung (siehe Abb. 4-5) wird deutlich, daß der Titer bei allen drei Medien drei Tage nach Transfektion deutlich absank. Für den Virusüberstand, der einen beziehungsweise zwei Tage nach Transfektion gesammelt wurde, ergab sich kein wesentlicher Unterschied im Titer. Die Anzahl infektiöser Partikel des Virusüberstandes, die in 293G-Medium gesammelt wurden, war an Tag eins und zwei mit $4,0 (\pm 2,7) \times 10^5$ und $4,7 (\pm 1,2) \times 10^5$ IU/ml am höchsten. Am dritten Tag fiel sie auf etwa ein Drittel ($1,3 (\pm 0,6) \times 10^5$ IU/ml) ab. Diesen Trend zeigten auch die anderen Medien. So fiel der Titer unter Verwendung von X-VIVO 10 Medium am dritten Tag um eine Zehnerpotenz auf $3,3 (\pm 1,5) \times 10^4$ IU/ml ab. Die Produktion von Viruspartikeln ergab für DMEM bei der ersten und zweiten Entnahme einen Titer von $2,3 (\pm 0,6) \times 10^5$ IU/ml und $2,7 (\pm 0,6) \times 10^5$ IU/ml . Über den gleichen Zeitraum wurde mit X-VIVO 10 Medium $3,7 (\pm 1,5) \times 10^5$ IU/ml und $2,7 (\pm 1,2) \times 10^5$ IU/ml erreicht. Da X-VIVO 10 Medium für die serumfreie Kultur von Stammzellen verwendet wird und sich der Titer in diesem Experiment nicht wesentlich von den anderen Medien unterschied, wurde für die folgenden Untersuchungen dieses Medium verwendet.

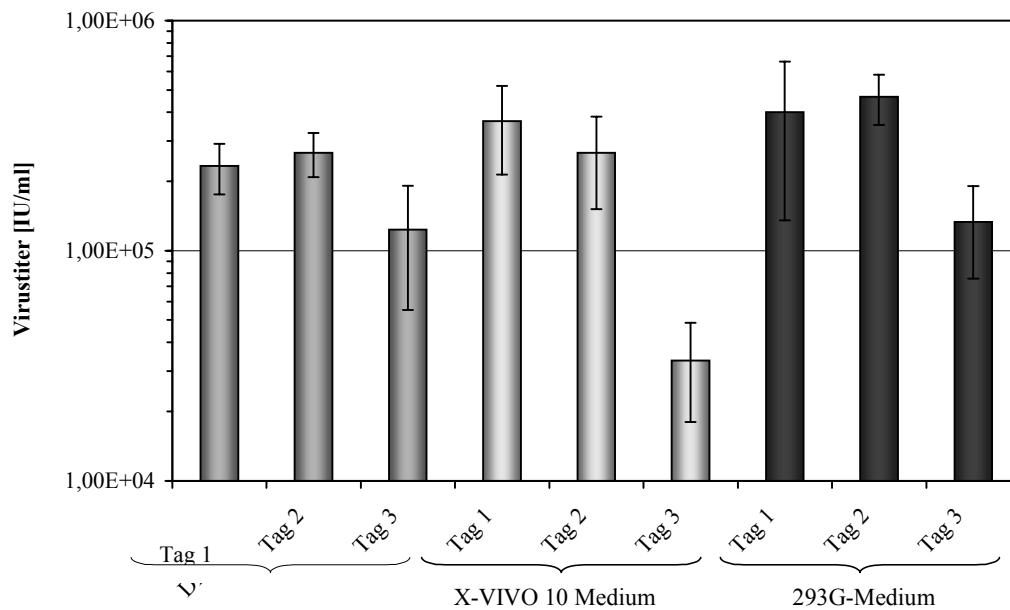


Abb. 4-5: Einfluß serumfreier Medien auf den Titer von an drei aufeinander folgenden Tagen geernteten Virusüberstand. Der Titer wurde in Triplikaten auf 293T-Zellen bestimmt und hier als Mittelwert dargestellt. Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung.

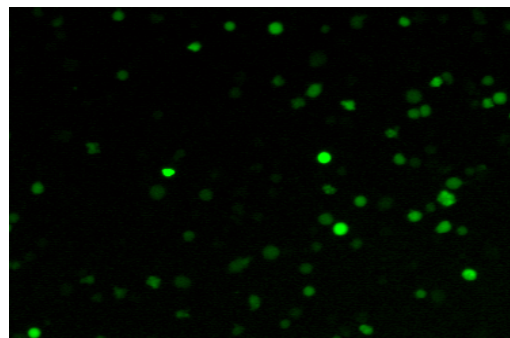
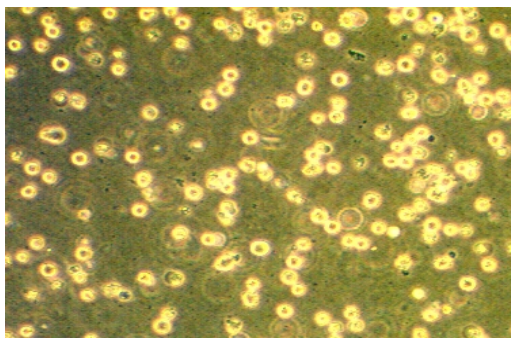
4. 1. 2. 3. Konzentrierung infektiöser Viruspartikel durch Ultrazentrifugation

Um möglichst hohe Virustiter zu erzielen, wurde zunächst die Ultrazentrifugation als Möglichkeit zur Anreicherung von Viruspartikeln getestet. Dafür wurde Virusüberstand (pCGWS, pCMVAR8.93 und pMD.G) von insgesamt zehn Petrischalen gesammelt. Da in diesem Experiment TF1-Zellen infiziert werden sollten, wurde der Überstand in RPMI Medium gesammelt. Die Partikel von jeweils sechs Petrischalen (Σ 30 ml) wurden durch Ultrazentrifugation (120 min., 75.000 x g, 4 °C) sedimentiert und in 3 ml RPMI aufgenommen. Der Überstand von vier Zellkulturschalen wurde nicht konzentriert. Je 5×10^5 TF1-Zellen wurden in 3 ml Virusüberstand, konzentriert oder nicht-konzentriert, aufgenommen. Die Zellen wurden dann zentrifugiert (90 min., 1215 x g, 32 °C) und anschließend 150 min. im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Parallel dazu wurde auch eine Titerbestimmung (siehe 3. 2. 5. 1.) auf 293T-Zellen angesetzt. Fünf Tage nach der Transduktion wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht und eine FACS-Analyse durchgeführt.

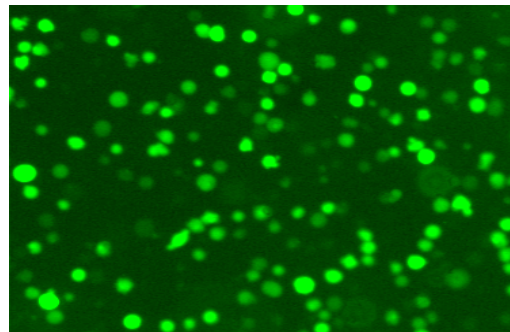
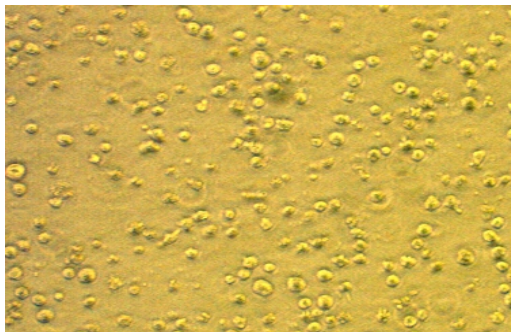
Die Auswertung der Titerbestimmung zeigte, daß der Titer von 4×10^5 auf 4×10^6 infektiöse Einheiten pro ml (IU/ml) erhöht werden konnte. Das entspricht dem theoretisch möglichen Konzentrierungsfaktor von 10, der sich aus der Volumenreduktion (30 ml \rightarrow 3 ml) ergibt. Die Kontrolle der transduzierten TF1-Zellen im Fluoreszenzmikroskop ergab eine deutliche Zunahme an GFP exprimierenden Zellen (siehe Abb. 4-6). Diese optische Auswertung wurde durch die FACS-Analyse (siehe Abb. 4-7) bestätigt. Hier konnte bei 79 % der Zellen, die mit nicht konzentriertem Virusüberstand infiziert wurden, eine GFP Expression nachgewiesen werden. Für die mit konzentriertem Virus transduzierten TF1-Zellen konnte eine Transgen-Expression in 99 % der Zellen detektiert werden. Der Anteil von 2 % positiver Zellen in der Negativkontrolle ist ein Artefakt, der durch Verschleppung positiver Zellen bei der Fixierung verursacht wurde.

Durchlicht

Fluoreszenz



A



B

Abb. 4-6: Fluoreszenzkontrolle der transduzierten TF1-Zellen. Die Zellen wurden mit nicht konzentriertem (A) und konzentriertem Virusüberstand (B) transduziert. Die Infektionsdauer betrug vier Stunden. Die Dokumentation der Kontrollen wurde fünf Tage nach Transduktion vorgenommen.

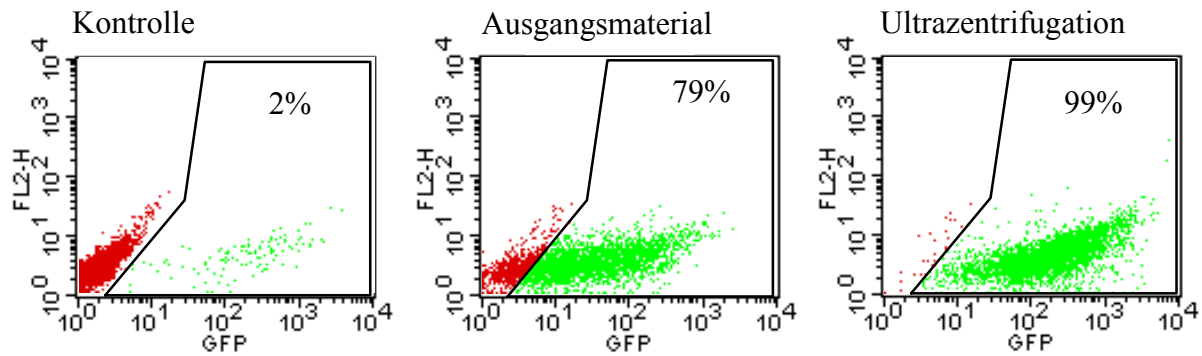


Abb. 4-7: Die FACS-Analyse der transduzierten TF1-Zellen wurde fünf Tage nach Transduktion durchgeführt. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte, aber ansonsten gleich behandelte, Zellen verwendet. Die Bezeichnung Ausgangsmaterial steht für Zellen, die mit nicht konzentriertem Virusüberstand behandelt wurden. Die TF1-Zellen, die mit konzentriertem Virus transduziert wurden, sind in dem Diagramm mit dem Titel Ultrazentrifugation gezeigt.

4. 1. 2. 4. Anreicherung von Viruspartikeln mit Anionenaustauschchromatographie

Als Alternative zur Konzentrierung des Virus mit Ultrazentrifugation wurde ein Anionenaustauschverfahren getestet. Hierbei wurde eine Hohlfaser-Säule (Fractoflow®, Merck) mit TMA Ankergruppen verwendet. Dafür wurden 293T-Zellen in 15 subkonfluent bewachsenen Zellkulturflaschen (T175, Greiner) mit pCGWS, pCMVΔR8.93 und pMD.G transfiziert. Die Zellen wurden für neun Stunden mit dem Kalziumphosphatpräzipitat inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS folgte eine Inkubation in 15 ml DMEM in Gegenwart von 10 mM Natriumbutyrat über Nacht. Nach einem Mediumwechsel auf 12 ml DMEM wurde an drei aufeinander folgenden Tagen Virus geerntet und direkt eine Chromatographie durchgeführt. Dafür wurden die Überstände vereint, zentrifugiert (5 min., 1500 rpm, 4 °C) und filtriert (Stericup 0,45 μm, Millipore). Ein kleiner Teil wurde für die Titerbestimmung abgenommen. Das Eluat wurde dann mit einer Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 15, 100 kDa, Vivascience) (siehe 3. 2. 3. 1.) durch Waschen mit Medium entsalzt und weiter aufkonzentriert. Mit dem nicht-konzentrierten und konzentrierten Virusüberstand wurde eine Titerbestimmung auf 293T-Zellen angesetzt. Eine vierte Konzentrierung wurde auch mit 180 ml eines zwischenzeitlich bei -80 °C gelagerten Virusüberstandes durchgeführt.

Die graphische Auswertung (Abb. 4-8) zeigt, daß in allen Versuchen eine Anreicherung der viralen Partikel mit Fractoflow® gelungen ist. Die mit der anschließenden Ultrafiltration

verbundene Volumenreduktion führte jedoch zu keiner wesentlichen Steigerung des Titer. Wie in den vorangegangenen Experimenten war auch diesmal eine Abnahme der infektiösen Partikelzahl nach der ersten beziehungsweise zweiten Ernte zu beobachten. Über alle Versuche betrachtet, konnte die Partikelzahl pro ml bezogen auf den Titer vor der Konzentrierung um das 7- bis 23fache durch Fractoflow® und um das 5- bis 33fache nach Ultrafiltration gesteigert werden. Die Ausbeuten lagen zwischen 43 % und 125 % nach der Anionenaustauschchromatographie und zwischen 8 % und 56 % nach der Ultrafiltration.

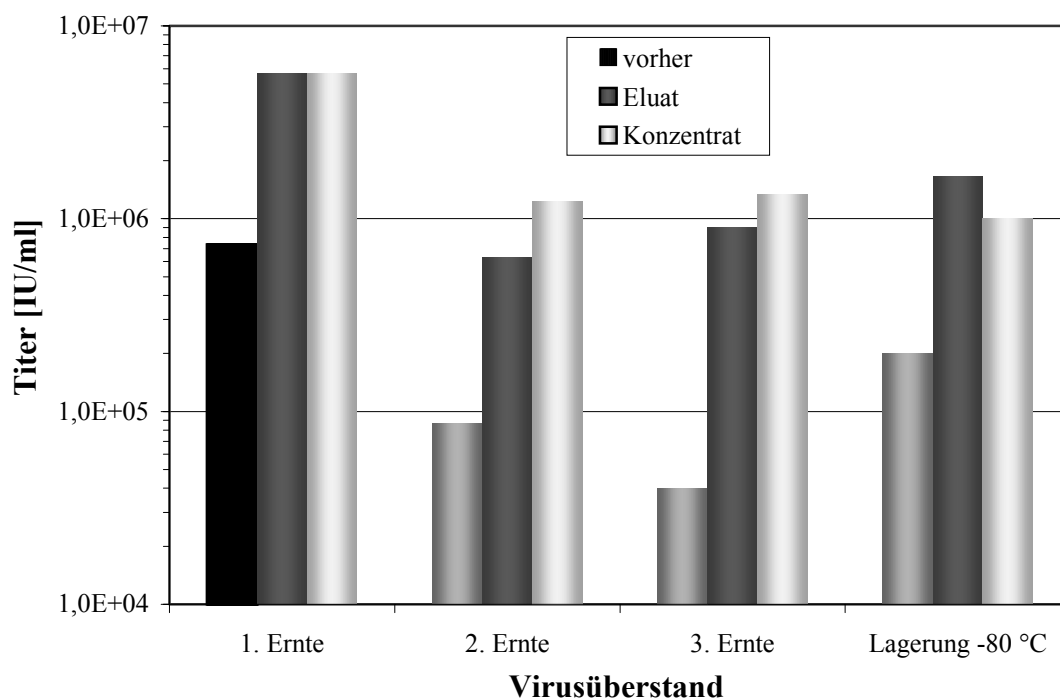


Abb. 4-8: Vergleich der Fraktionen Ausgangsmaterial (vorher), nach Fractoflow® (Eluat) und nach Ultrafiltration (Konzentrat) aus vier unabhängigen Experimenten. Die Titerbestimmung erfolgte auf 293T-Zellen in Triplikaten. Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung.

Tab. 4-2: Auswertung der Titerbestimmung von 4 Versuchen. Der Titer wurde vor und nach Fractoflow® Anreicherung, sowie nach Entsalzen (Vivaspin 15, 100 kDa) bestimmt. Die Bestimmung des Titers erfolgte auf 293T-Zellen in Triplikaten. Der Fehler errechnet sich aus der Standardabweichung. Der Konzentrierungsfaktor errechnet sich aus dem Quotienten des Titers des Eluates beziehungsweise Konzentrates dividiert durch den Titer des Ausgangsmaterials. (KF – Konzentrierungsfaktor).

Fraktion	Titer [IU/ml]	KF	Vol. [ml]	Σ Partikel [IU]	Ausbeute [%]
1. Ernte					
Ausgangsmaterial	$7,3 \pm 4,6 \times 10^5$	1,0	180	$1,3 \pm 0,8 \times 10^8$	100
Fractoflow Eluat	$5,7 \pm 3,8 \times 10^6$	7,8	10	$5,7 \pm 3,8 \times 10^7$	43
Vivaspin Konzentrat	$5,7 \pm 0,6 \times 10^6$	7,8	7	$4,0 \pm 0,4 \times 10^7$	30
2. Ernte					
Ausgangsmaterial	$8,7 \pm 2,3 \times 10^4$	1,0	180	$1,6 \pm 0,4 \times 10^7$	100
Fractoflow Eluat	$6,3 \pm 3,5 \times 10^5$	7,2	10	$6,3 \pm 3,5 \times 10^6$	39
Vivaspin Konzentrat	$1,2 \pm 0,7 \times 10^6$	14	3	$3,6 \pm 2,1 \times 10^6$	23
3. Ernte					
Ausgangsmaterial	$4,0 \pm 1,7 \times 10^4$	1,0	180	$7,2 \pm 3,1 \times 10^6$	100
Fractoflow Eluat	$9,0 \pm 1,7 \times 10^5$	22,5	10	$9,0 \pm 1,7 \times 10^6$	125
Vivaspin Konzentrat	$1,3 \pm 0,6 \times 10^6$	32,5	3	$3,9 \pm 1,8 \times 10^6$	56
Lagerung bei –80 °C					
Ausgangsmaterial	$2,0 \pm 1,7 \times 10^5$	1,0	180	$3,6 \pm 3,1 \times 10^7$	100
Fractoflow Eluat	$1,7 \pm 0,6 \times 10^6$	8,5	10	$1,7 \pm 0,6 \times 10^7$	46
Vivaspin Konzentrat	$1,0 \pm 0 \times 10^6$	5	3	$3,0 \pm 0 \times 10^6$	8

4. 1. 2. 5. Vergleich von Ultrazentrifugation, Fractoflow® und Ultrafiltration als Methoden zur Anreicherung von Viruspartikeln

Da die Anreicherung von Viruspartikeln mit Fractoflow® mit einem Verlust bezogen auf die Gesamtpartikelzahl verbunden ist, wurde diese Methode in einem Experiment direkt mit der Ultrazentrifugation verglichen. Zusätzlich wurde als Alternative die Konzentrierung größerer Volumina (60 ml max. Füllhöhe) an Überstand mit Ultrafiltration (JumboSep, 100 kDa, Pall-Gelman) getestet. Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Anreicherung von retroviralem Virusüberstand angewendet (H. Knoeß, persönliche Mitteilung).

Für diese Untersuchung wurden 15 Zellkulturflaschen (T175, Greiner) mit ausgesäten 293T-Zellen transfiziert (8 Stunden) und in Gegenwart von Natriumbutyrat (10mM) über Nacht inkubiert. Nach einmaligen Waschen mit PBS erfolgte ein Mediumwechsel. Anschließend wurde der Virusüberstand an drei aufeinander folgenden Tagen gesammelt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die insgesamt 540 ml Virusüberstand wurden vereint, zentrifugiert (5 min., $437 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und filtriert ($0,45\text{ }\mu\text{m}$). Ein Teil des nicht-konzentrierten Virusüberstandes wurde abgenommen und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für jede Konzentrierungsmethode wurden 180 ml Überstand verwendet. Für die Ultrazentrifugation wurde der Virusüberstand auf fünf Rörchen verteilt und zentrifugiert (90 min., $45.000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Danach wurde der Überstand dekantiert und das Sediment in je 7 ml PBS aufgenommen. Die resuspendierten Viruspartikel wurden vereint und ein zweites Mal zentrifugiert. Das zweite Sediment wurde in 2 ml RPMI aufgenommen. Die Anionenaustauschchromatographie wurde wie im vorigen Abschnitt (siehe 4. 1. 2. 4.) beschrieben durchgeführt und mit Vivaspin 15 (100 kDa) entsalzt und auf 2 ml eingengt. Die Ultrafiltration wurde mit dem JumboSep-System (Pall-Gelman, 100 kDa) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Konzentrat (15 ml) wurde anschließend mit einer kleineren Ultrafiltrationseinheit (vivaspin15, 100 kDa) auf 2 ml eingengt. Mit den erhaltenen konzentrierten Viruslösungen wurden anschließend eine Titerbestimmung und eine Infektion von TF1-Zellen durchgeführt.

Die graphische Auswertung (Abb. 4-9) zeigt, daß durch Fractoflow® die höchste Steigerung des Virustiters erreicht wurde. Mit Ultrazentrifugation konnte ebenfalls die Viruspartikelzahl pro ml erhöht werden, durch die Ultrafiltration dagegen konnte keine Anreicherung von Viruspartikeln beobachtet werden. Die in Tabelle 4-3 zusammengefaßten Ergebnisse der Titerbestimmungen zeigten, daß der Titer des geernteten Überstandes $4,7 \pm 1,2 \times 10^6$ [IU/ml] enthielt und durch Chromatographie um etwa das 11fache gesteigert ($5,3 \pm 3,5 \times 10^7$ [IU/ml]) werden konnte. Die Ausbeute war mit 13 % vergleichsweise niedrig (siehe 4. 1. 2. 4.). Durch Ultrazentrifugation wurde eine 3,5fache Erhöhung auf $1,7 \pm 0,6 \times 10^7$ [IU/ml] erreicht, bei einer Ausbeute von 4 %. Mit Ultrafiltration konnte gar keine Zunahme der Partikel pro Volumen beobachtet werden. Diese Resultate spiegelten sich auch in der fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle der infizierten TF1-Zellen wieder (siehe Abb. 4-10). Hier zeigten die Zellen, die mit Virusüberstand nach Fractoflow® infiziert wurden, die deutlichste Transduktionseffizienz (geschätzt $>70\%$). Zellen, die mit Überstand vor Konzentrierung und nach Ultrafiltration behandelt wurden, zeigten einen geringen Anteil an GFP exprimierenden Zellen (geschätzt $<5\%$). Die TF1-Zellen, die mit Überstand nach

Ultrazentrifugation transduziert wurden, zeigten eine diffuse Fluoreszenz, die eine Abschätzung des Anteiles an exprimierender Zellen nicht zuließ.

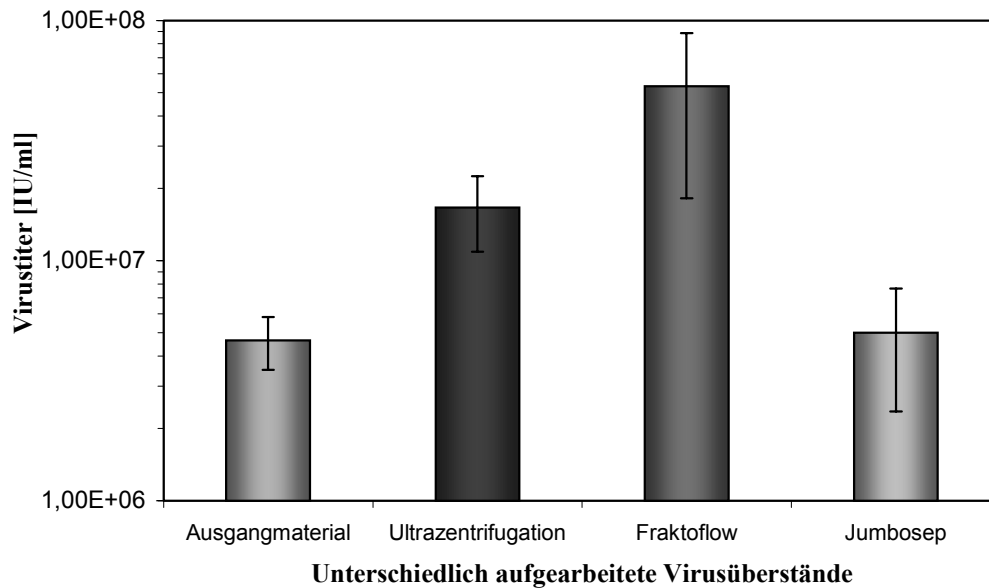


Abb. 4-9: Vergleich des Virustiters des geernteten Virusüberstandes mit Überständen, die unterschiedlich aufkonzentriert wurden. Der Titer wurde auf 293T-Zellen in Triplikaten bestimmt (\pm Standardabweichung). Die Auswertung erfolgte vier Tage nach Transduktion.

Tab. 4-3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Titerbestimmung auf 293T-Zellen (Triplikate \pm Standardabweichung). (KF – Konzentrierungsfaktor).

	Titer [IU/ml]	KF	Vol. [ml]	Σ Partikel [IU]	Ausbeute [%]
Ausgangsmaterial	$4,7 \pm 1,2 \times 10^6$	1,0	180	$8,5 \pm 2,2 \times 10^8$	100
Ultrazentrifugation	$1,7 \pm 0,6 \times 10^7$	3,5	2	$3,3 \pm 1,2 \times 10^7$	4
Fractoflow®	$5,3 \pm 3,5 \times 10^7$	11,3	2	$1,1 \pm 0,7 \times 10^8$	13
JumboSep	$5,0 \pm 2,7 \times 10^6$	1,1	2	$1,0 \pm 0,5 \times 10^7$	1

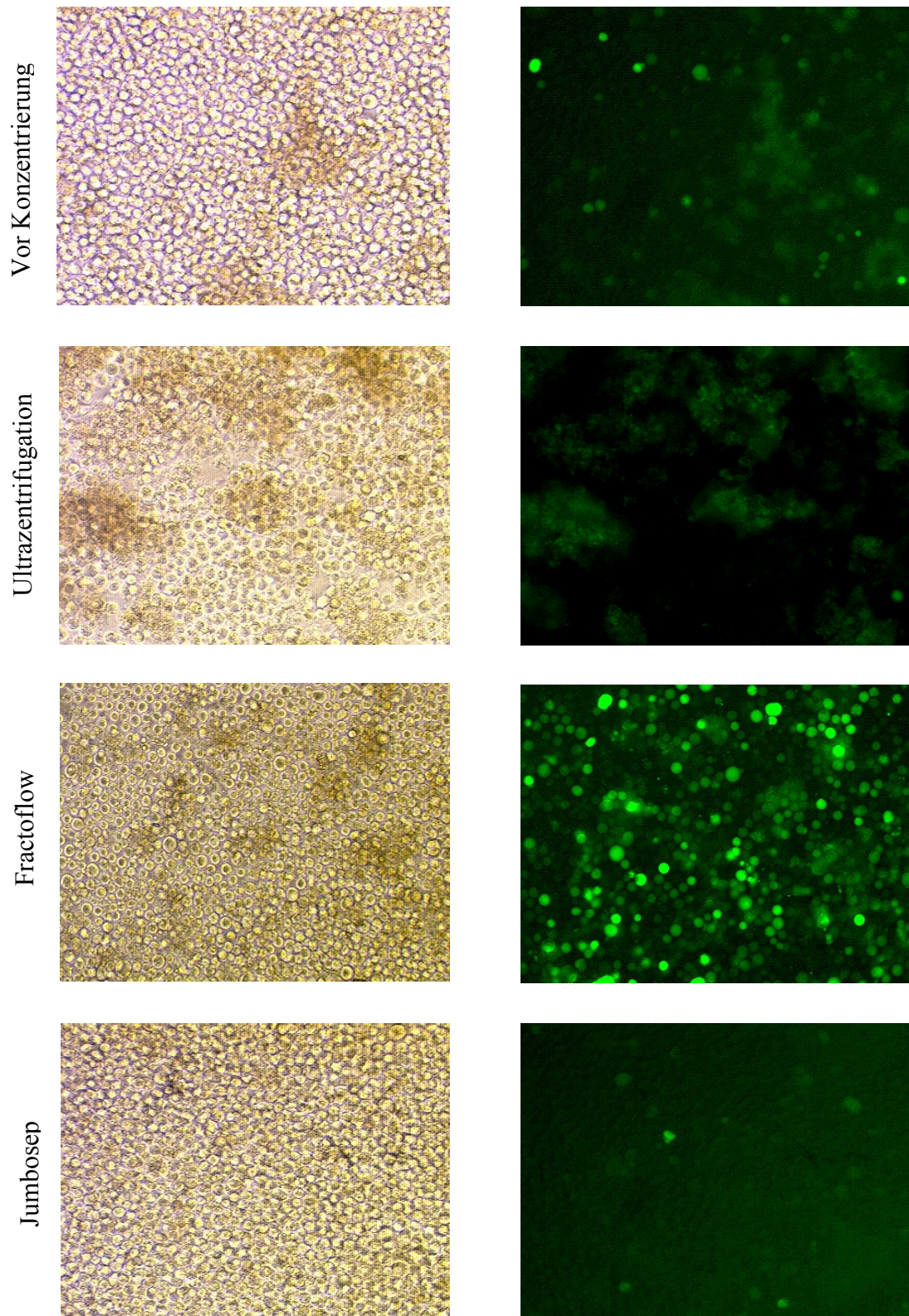


Abb. 4-10: Fluoreszenzmikroskop-Kontrolle von TF1-Zellen, jeweils 10^5 Zellen wurden mit 1 ml konzentriertem beziehungsweise unkonzentriertem Virus vier Stunden infiziert. Die Aufnahmen wurden drei Tage nach Transduktion gemacht.

4. 1. 2. 6. Einfluß von Medienkomponenten auf die Konzentrierung von Virusüberstand

Bei den vorangegangenen Experimenten wurde festgestellt, daß bei der Anreicherung von Viruspartikeln mittels Fractoflow® und anschließender Ultrafiltration das Konzentrat mitunter eine viskosere Konsistenz annahm und Anreicherung von Phenolrot zeigte. Bei der Titererhöhung durch Ultrazentrifugation zeigte das Sediment teilweise mikroskopisch sichtbare Rückstände. Deshalb wurde im folgenden Versuch untersucht, ob Phenolrot, FCS beziehungsweise HSA einen Einfluß auf die Anreicherung von Viruspartikeln durch Ultrazentrifugation oder Anionenaustauschchromatographie haben. Getestet wurden Phenolrot-freies X-VIVO 10 Medium mit (A) und ohne (B) 2 % HSA, sowie Phenolrot-haltiges DMEM mit (C) und ohne (D) 2 % FCS.

Dafür wurden auf acht 500 cm²-Zellkulturplatten (Falcon) ausplattierte 293T-Zellen wie im vorigem Abschnitt beschrieben transfiziert und mit NaBut (10 mM) behandelt. Nach Waschen mit PBS wurde auf jeweils zwei Platten je 50 ml eines Mediums der oben beschriebenen Varianten (A - D) gegeben. Nach 24 Stunden wurde der erste Virusüberstand gesammelt, entsprechend vereint, zentrifugiert und filtriert (siehe 4. 1. 2. 5.). Mit diesem konditioniertem Medium wurde dann, wie unter 4. 1. 2. 4. erläutert, eine Konzentrierung über Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden wurde erneut Überstand gesammelt und mit diesem eine Ultrazentrifugation (siehe 4. 1. 2. 3.) durchgeführt. Von den nicht-konzentrierten und konzentrierten Virusüberständen wurde anschließend eine Titerbestimmung auf 293T-Zellen angesetzt.

Bei der Durchführung des Versuches konnte kein Unterschied bei der Handhabung oder Konsistenz des VSV-G pseudotypisierten Virus beobachtet werden. Der Titer des geernteten Überstandes war mit $1,5 \pm 0,5 \times 10^5$ (1. Ernte) beziehungsweise $5,7 \pm 1,5 \times 10^5$ IU/ml (2. Ernte) eine log-Stufe geringer als im vorangegangenen Experiment. Wie aus den Abbildungen 4-11 und 4-12 hervorgeht, wurde mit allen Medien eine Anreicherung von infektiösen Viruspartikeln erreicht. Das Medium D zeigte in beiden Experimenten die geringste Steigerung der Anzahl infektiöser Partikel pro ml. In den Tabellen 4-4 und 4-5 sind die Ergebnisse der Titerbestimmungen zusammengefaßt. Im ersten Experiment (Fractoflow®) zeigten die Medien mit HSA beziehungsweise FCS (A beziehungsweise C) die höchsten Konzentrierungsfaktoren (21 beziehungsweise 17) und Ausbeuten (63 % beziehungsweise 52 %). Bei der zweiten Ernte (Ultrazentrifugation) wurde für X-VIVO 10 ohne HSA der höchste Konzentrierungsfaktor (25) und die höchste Ausbeute (74 %) gefunden. Da in diesen Experimenten kein wesentlicher Einfluß von HSA beziehungsweise FCS oder Phenolrot

beobachtet werden konnte, wurde Medium A mit Hinblick auf spätere Stammzellversuche weiter verwendet.

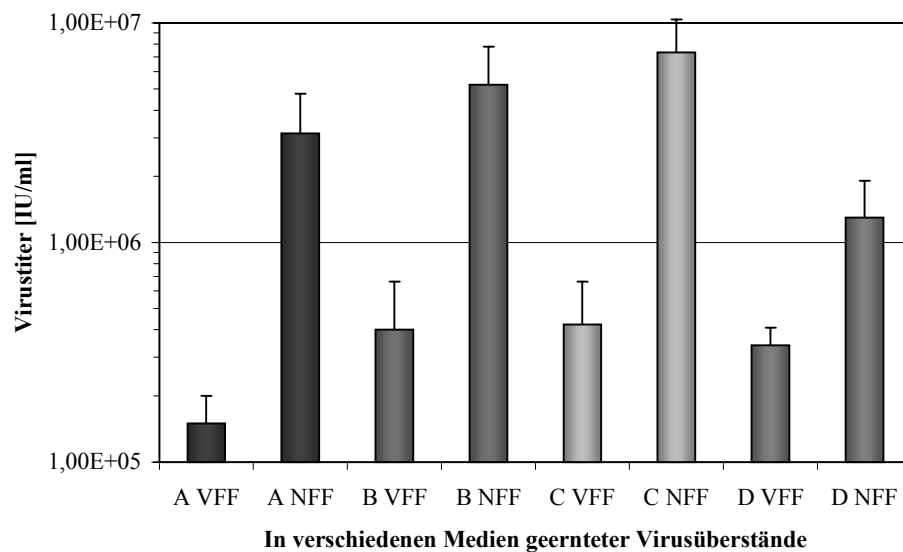


Abb.4-11: Vergleich der Titer vor und nach Fractoflow® Aufkonzentrierung von Virus, der in unterschiedlichen Medien gesammelt wurde. (X-VIVO 10: A – mit 2 % HSA, B – ohne HSA; DMEM: C – mit 2 % FCS, D – ohne FCS; VFF – vor Fractoflow®, NFF – nach Fractoflow®). Der Titer wurde in Triplikaten auf 293T-Zellen getestet.

Tab. 4-4: Auswertung der Titerbestimmung auf 293T-Zellen (Triplikate). Die Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtzahl der Partikel vor und nach Konzentrierung. Der Konzentrierungsfaktor ist der Quotient der Titer nach und vor Anreicherung. (X-VIVO 10: A – mit 2 % HSA, B – ohne HSA; DMEM: C – mit 2 % FCS, D – ohne FCS; VFF – vor Fractoflow®, NFF – nach Fractoflow®). Die Ausbeute bezieht sich dabei auf die Gesamtmenge an infektiösen Partikeln nach dem Aufkonzentrierungsschritt in Bezug auf die ursprünglich vorhandene Gesamtpartikelzahl. (KF – Konzentrierungsfaktor).

	Titer [IU/ml]	KF	Volumen [ml]	Partikel total [IU]	Ausbeute [%]
A VFF	$1,5 \pm 0,5 \times 10^5$	1	100	$1,5 \pm 0,5 \times 10^7$	100
A NFF	$3,1 \pm 1,6 \times 10^6$	20,9	3	$9,4 \pm 4,8 \times 10^6$	63
B VFF	$4,0 \pm 2,7 \times 10^5$	1	100	$4,0 \pm 2,7 \times 10^7$	100
B NFF	$5,2 \pm 2,5 \times 10^6$	13,1	3	$1,6 \pm 0,8 \times 10^7$	39
C VFF	$4,2 \pm 2,4 \times 10^5$	1	100	$4,2 \pm 2,4 \times 10^7$	100
C NFF	$7,3 \pm 3,1 \times 10^6$	17,3	3	$2,2 \pm 0,9 \times 10^7$	52
D VFF	$3,4 \pm 0,7 \times 10^5$	1	100	$3,4 \pm 0,7 \times 10^7$	100
D NFF	$1,3 \pm 0,6 \times 10^6$	3,8	3	$3,9 \pm 1,8 \times 10^6$	11

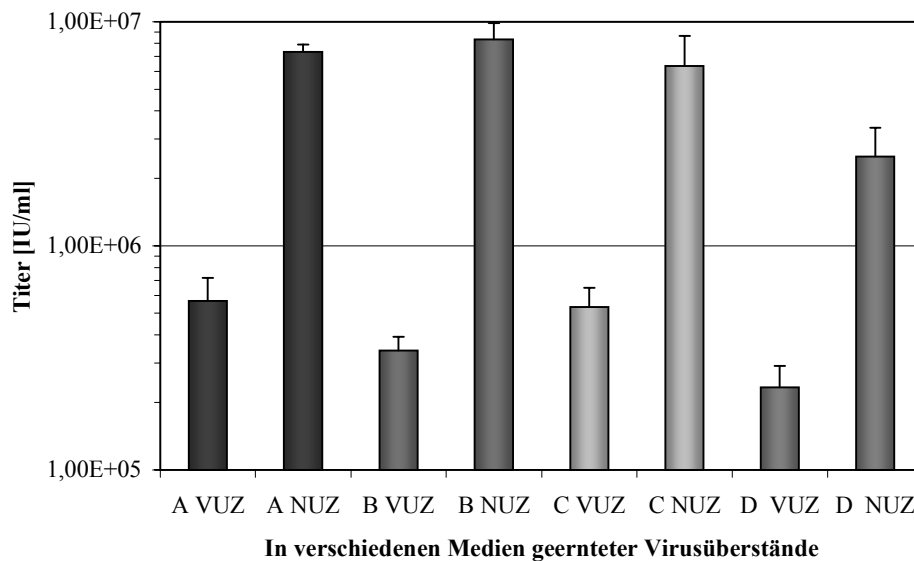


Abb. 4-12: Darstellung der Titer vor und nach Ultrazentrifugation von Überstand der in unterschiedlichen Medien gesammelt wurde (X-VIVO 10: A – mit 2 % HSA, B – ohne HSA; DMEM: C – mit 2 % FCS, D – ohne FCS; VUZ – vor Ultrazentrifugation, NUZ – nach Ultrazentrifugation). Der Titer wurde in Triplikaten auf 293T-Zellen getestet.

Tab. 4-5: Auswertung der Titerbestimmung auf 293T-Zellen (Triplikate). Die Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtzahl der Partikel. Der Konzentrierungsfaktor ist der Quotient der entsprechenden Titer. (X-VIVO 10: A – mit 2 % HSA, B – ohne HSA; DMEM: C – mit 2 % FCS, D – ohne FCS; VUZ – vor Ultrazentrifugation, NUZ – nach Ultrazentrifugation). (KF – Konzentrierungsfaktor).

	Titer [IU/ml]	KF	Volumen [ml]	Partikel total [IU]	Ausbeute [%]
A VUZ	$5,7 \pm 1,5 \times 10^5$	1	100	$5,7 \pm 1,5 \times 10^7$	100
A NUZ	$7,3 \pm 0,5 \times 10^6$	12,9	3	$2,2 \pm 1,5 \times 10^7$	39
B VUZ	$3,4 \pm 0,5 \times 10^5$	1	100	$3,4 \pm 0,5 \times 10^7$	100
B NUZ	$8,3 \pm 1,5 \times 10^6$	24,5	3	$2,5 \pm 0,5 \times 10^7$	74
C VUZ	$5,3 \pm 1,2 \times 10^5$	1	100	$5,3 \pm 1,2 \times 10^7$	100
C NUZ	$6,3 \pm 2,3 \times 10^6$	11,9	3	$1,9 \pm 0,7 \times 10^7$	36
D VUZ	$2,3 \pm 0,6 \times 10^5$	1	100	$2,3 \pm 0,6 \times 10^7$	100
D NUZ	$2,5 \pm 0,9 \times 10^6$	10,7	3	$7,5 \pm 2,7 \times 10^6$	32

4. 1. 2. 7. Austestung weiterer Varianten der Viruskonzentrierung

Um alternative und weniger aufwendige Verfahren als die Anionenaustauschchromatographie zu finden, wurde die Ultrazentrifugation in Kombination mit unterschiedlichen Resuspensionspuffern, die Konzentrierung durch Präzipitation und die Sedimentierung bei niedriger Geschwindigkeit („Low Speed“-Zentrifugation) getestet.

Als eine Variation der Ultrazentrifugation wurde zum einen die Dauer und zum anderen die Geschwindigkeit der Zentrifugation herabgesetzt. Für dieses Experiment wurden insgesamt 90 ml Virusüberstand, in diesem Fall mit pCIGWS (siehe 4. 1. 1. 3.) als Transgenvektor, in gleichen Volumina auf drei Röhrchen aufgeteilt. Nach Zentrifugation (60 min., 19.000 rpm, 4 °C) wurden die Proben dekantiert und in 300 µl Puffer je Röhrchen aufgenommen. Puffer A war PBS, als Puffer B diente NTE Puffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA) und für Puffer C wurde NTE Puffer mit 0,01 % Tween-20 verwendet. Die Resuspension erfolgt 60 min. auf einem Rundschtüttler (200 rpm.) bei Raumtemperatur.

Es wurde auch eine neue Methode zur Konzentrierung getestet, die Kopräzipitation von Viruspartikeln mit Kalziumphosphat (Morling und Russel, 1995). Für die Präzipitation der Viruspartikel wurden 45 ml Virusüberstand mit 2 M NaOH auf pH 7,7 eingestellt. Danach wurde mit 1 M CaCl₂ eine Endkonzentration von 60 mM eingestellt. Nach einer Inkubation von 30 min. bei 37 °C wurde das Präzipitat sedimentiert (5 min., 3000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend dekantiert und das Sediment in 900 µl 100 mM EDTA durch schütteln auf dem Rundschtüttler gelöst (60 min., 200 rpm., 37 °C).

Die dritte Variante war die „Low Speed“-Zentrifugation. Hierfür wurden 90 ml Virusüberstand in drei Röhrchen aufgeteilt, 5 ml PBS zugegeben und über Nacht (16 Stunden) zentrifugiert (1000 x g, 4 °C). Nach dem Dekantieren wurden die Proben in jeweils 300 µl X-VIVO 10 Medium aufgenommen.

Um die so konzentrierten Proben auf Infektiosität zu testen, wurden jeweils 10⁵ TF1-beziehungsweise PLB-985-Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte in einem Volumen von 900 µl beziehungsweise 800 µl Medium ausgesät. Dazu wurden jeweils 100 µl (1:10) beziehungsweise 200 µl (1:5) des konzentrierten Virusüberstandes zugegeben. Die Infektion wurde dann wie unter 3. 2. 4. beschrieben fortgesetzt. Fünf Tag nach der Infektion wurde eine FACS-Analyse durchgeführt und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die FACS-Analyse ergab für die Virusüberstände, die mit „Low Speed“ zentrifugiert wurden, die höchsten Transduktionsraten mit 90 % und 85 % in TF1-Zellen, die mit 1:5 beziehungsweise 1:10 verdünntem Virus transduziert wurden. Bei den gleich behandelten PLB-985-Zellen betrug der Anteil GFP exprimierender Zellen 87 % und 85 %, wenn sie mit 1:5 beziehungsweise 1:10 verdünnten Viruspartikeln behandelt wurden. Die Zellen, die mit ultrazentrifugiertem Virusüberstand transduziert wurden, zeigten durchschnittlich gleiche Transduktionsraten und nur geringe Unterschiede zwischen den zum Resuspendieren verwendeten Puffern. Bei den durch Fällung sedimentierten Viruspartikeln war in TF1-Zellen keine Transduktion und im Fall der PLB-985-Zellen keine repräsentative Anzahl lebender Zellen (ca. 2 %) mehr zu detektieren. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Tab. 4-6 aufgeführt. Eine separate Titerbestimmung wurde nicht vorgenommen. Aus den FACS-Daten konnte kein aussagekräftiger Titer bestimmt werden, da hierfür in diesem Experiment höhere Verdünnungen des Virus notwendig gewesen wären (S. Stein, persönliche Mitteilung).

Tab.4-6: Zusammenfassung der FACS-Analyse. Die TF1-Zellen und die PLB-985-Zellen wurden mit Virusüberstand transduziert, der auf unterschiedliche Weise konzentriert beziehungsweise resuspendiert wurde. Die FACS-Messung wurde am Tag fünf durchgeführt. (UZ – Ultrazentrifugation; „Low Speed“ – Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit; Vorher - Ausgangsmaterial).

TF1	GFP positiv [%]	GFP positiv [%]	PLB-985	GFP positiv [%]	GFP positiv [%]
	1 : 5	1 : 10		1 : 5	1 : 10
Vorher	25	16	Vorher	17	11
UZ PBS	89	88	UZ PBS	95	93
UZ NTE	90	84	UZ NTE	94	92
UZ NTE ^{Tween}	88	83	UZ NTE ^{Tween}	96	94
Fällung	0,8	0,6	Fällung	91 (davon 2 % vital)	90 (davon 2 % vital)
Low Speed	90	85	Low Speed	87	85

Diese Ergebnisse konnten bei der mikroskopischen Auswertung in dieser Deutlichkeit nicht bestätigt werden. Die transduzierten TF1-Zellen zeigten zwar eine deutliche Transduktion im Mikroskop (siehe Abb. 4-15), aber nicht in dem Umfang, wie sie durch die FACS-Analyse bestimmt wurde (siehe Abb. 4-13 und 4-14).

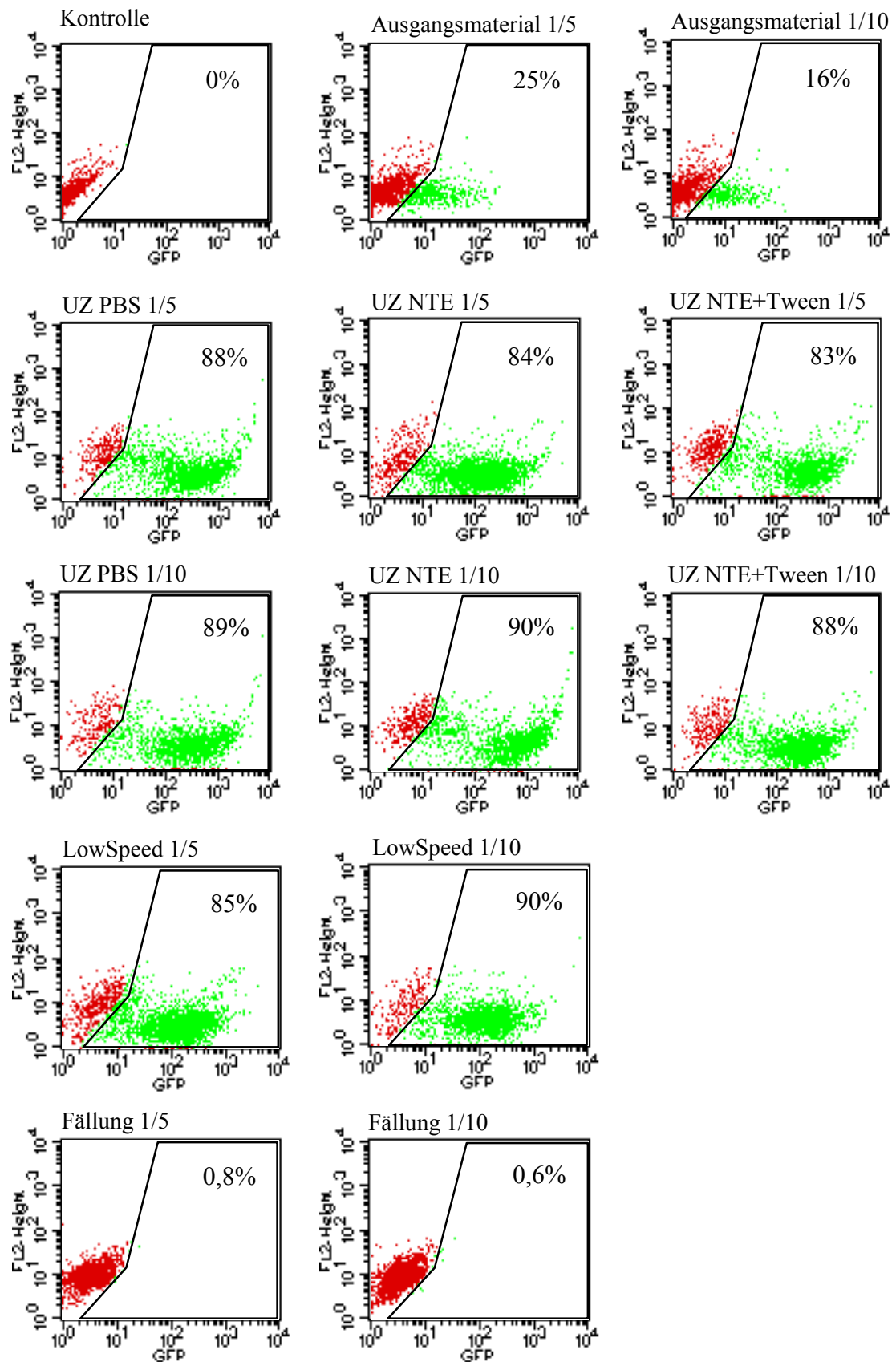


Abb. 4-13: Graphische Darstellungen der FACS-Analyse der TF1-Zellen. Die Zellen wurden fünf Tage nach Transduktion im FACS analysiert. (UZ - Ultrazentrifugation).

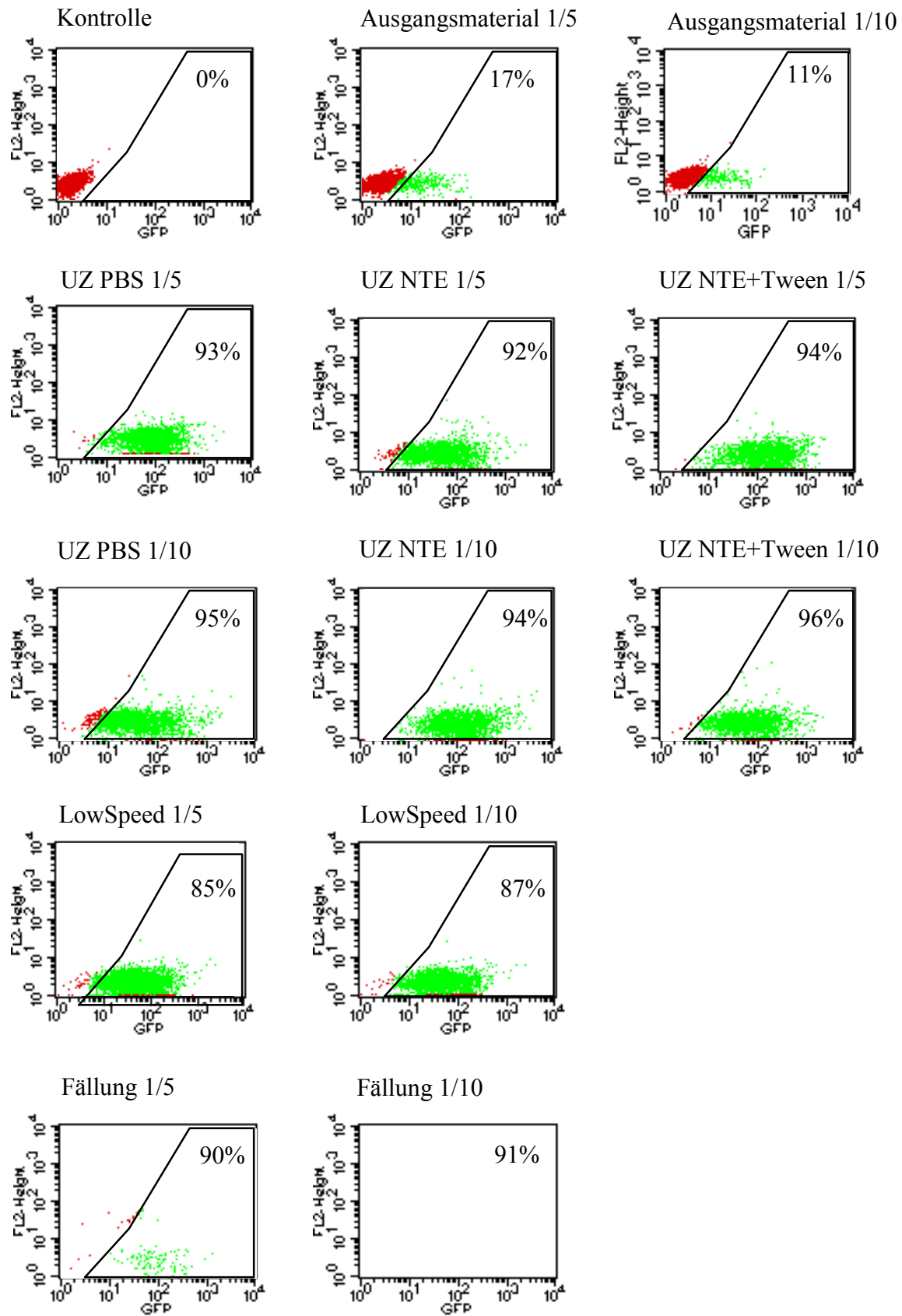


Abb. 4-14: Graphische Darstellungen der FACS-Analyse der PLB-985-Zellen. Die Zellen wurden fünf Tage nach Transduktion im FACS analysiert. (UZ - Ultrazentrifugation).

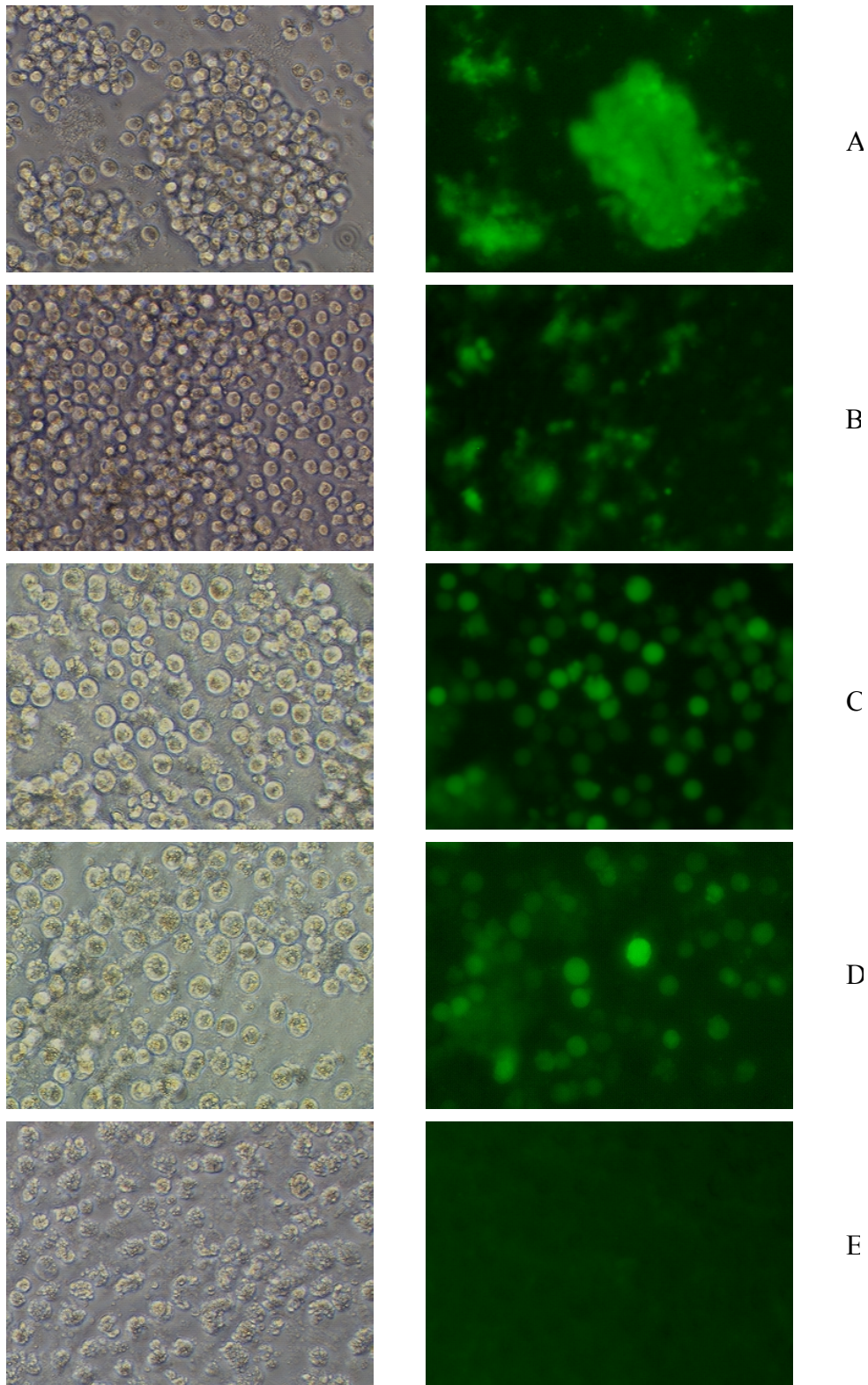


Abb. 4-15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transduzierten TF1- und PLB-985-Zellen. (PLB-985-Zellen transduziert mit ultrazentrifugiertem Virusüberstand in NTE gelöst, A – 1:5, B – 1:10; TF1-Zellen transduziert mit Partikeln, die bei niedriger Geschwindigkeit sedimentiert wurden, C – 1:10, D – 1:5; TF1-Zellen transduziert mit gefällten Viruspartikeln, E – 1:5).

4. 1. 3. Transduktion von CD34⁺-Zellen mit konzentriertem Virusüberstand

Die Stammzellen des hämatopoetischen Systems sind ruhende Zellen, das heißt, sie teilen sich *in vitro* praktisch nur nach Zugabe definierter Wachstumsfaktoren. Bei den bisher gängigen retroviralen Vektoren war man auf eine Zellteilung angewiesen, damit die virale DNA im Wirtsgenom integrieren und so dauerhaft das Transgen exprimieren kann. Mit der Zellteilung geht jedoch eine Differenzierung der Stammzellen einher, die zu einem zunehmenden Verlust an Pluripotenz und in Folge dessen zu einer verminderten Repopulierungsfähigkeit führt. Der Präintegrationskomplex eines Lentivirus kann in einem aktiven Prozeß in den Zellkern vordringen, ohne auf den Zusammenbruch der Kernmembran angewiesen zu sein. Es konnte bereits gezeigt werden, daß lentivirale Vektoren ruhende Zellen transduzieren können (Naldini, 1996). Um einen möglichst effizienten Gentransfer in hämatopoetischen Stammzellen zu erzielen, wurden CD34⁺-Zellen mit lentiviralem Überstand transduziert, der nach den in den vorigen Kapitel aufgeführten Methoden angereichert wurde.

4. 1. 3. 1. Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen mit ultrazentrifugiertem Virusüberstand

Nach erfolgreicher Transduktion der promyeloischen Zelllinie TF1 sollte getestet werden, ob ein durch Ultrazentrifugation präparierter Virusüberstand für eine effiziente Transduktion von Stammzellen geeignet ist. Dafür wurden etwa 8×10^5 CD34⁺-Zellen aus peripherem Blut nach Lagerung in flüssigem Stickstoff aufgetaut und in zwei gleich große Portionen geteilt, wobei jede in 2 ml X-VIVO 10 Medium aufgenommen wurde. Der eine Teil der Zellen wurde ohne, der andere Teil mit Zytokinen (SCF [100 ng / ml], Flt3-L [100 ng / ml], IL-6 [10 ng / ml], IL-3 [10 ng / ml]) über Nacht inkubiert. Der Virusüberstand - in diesem Fall war pCGWS (siehe 4. 1. 1.) der Transgenvektor - wurde nach der in Abschnitt (4. 1. 2. 3.) beschriebenen Methode präpariert. Der Titer des Virusüberstandes betrug 1×10^7 IU/ml . Die Stammzellen wurden dann in einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung auf einer Retronectin (Takara) beschichteten Platte ausgesät. Zu jeweils einem Aliquot der CD34⁺-Zellen mit und ohne Vorbehandlung durch Zytokine wurden dann 1 ml Virusüberstand zugegeben. Dies entspricht einer MOI von 50 (MOI – „multiplicity of infection“, [IU/Zelle]), was besagt, daß 50 Viruspartikel pro Zelle im Ansatz vorhanden sind. Die Ansätze der entsprechenden Negativkontrolle (mit und ohne Zytokine) wurden nur mit Medium supplementiert. Zu allen

Ansätzen wurde 4 µg/ml Protaminsulfat dazugegeben. Die Zellen wurden auch in der folgenden Inkubation von 18 Stunden entweder mit oder ohne Zytokine kultiviert. Innerhalb dieses Zeitraums wurde eine Zentrifugation (90 min., 1215 x g, 32 °C) mit anschließender Inkubation (150 min., 37 °C, 5 % CO₂) und ein Halbmediumwechsel durchgeführt, bevor die Zellen weiter kultiviert wurden. Danach wurden alle Zellen in Gegenwart von Zytokinen kultiviert. Drei Tage nach Transduktion erfolgte die Fixierung eines Teils der Zellen für die FACS-Analyse. Einen Tag später wurden darüber hinaus Agarkulturen mit 250, 500 und 750 Zellen pro Schale angesetzt (siehe 3. 2. 7. 3.).

Im Fluoreszenzmikroskop waren nur vereinzelt GFP exprimierende Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 4-17), wobei die Transduktionseffizienz auf unter 5 % geschätzt wurde. Die FACS-Analyse (siehe Abbildung 4-16) ergab 64 % Markergen exprimierende Zellen bei Inkubation ohne Zytokine, und 61 % GFP-Expression für die Zellen, die ständig in Gegenwart von Zytokinen inkubiert wurden. Die Auswertung des Kolonie-Assays (siehe Tabelle 4-7) ergab durchschnittlich 20 % GFP exprimierende Zellen, wobei die geringe Gesamtkoloniezahl nicht außer Acht gelassen werden sollte.

Tab. 4-7: Zusammenfassung der Auswertung des Kolonie-Assays. (Transd. – Transduziert, [+] – mit Zytokine, [-] - ohne Zytokine). Die Anzahl der Kolonien bezieht sich auf die jeweilige Gesamtzahl der gezählten Kolonien, der Anteil an GFP positiven Kolonien steht in Klammern dahinter. Die Klonogenität, die den Anteil populierender Zellen angibt und der Anteil GFP exprimierender Zellen ist jeweils der Mittelwert der Dreifach-Bestimmung.

	Anzahl an Kolonien pro			Klonogenität [%]	GFP positive Kolonien [%]
	250	500	750		
	ausgesäte Zellen				
Transd. -	4 (1)	16 (1)	18 (2)	2,4 ± 0,8	14
Transd. +	3 (1)	26 (3)	6 (1)	2,4 ± 2,4	21
Kontrolle -	9 (0)	16 (0)	22 (0)	3,2 ± 0,3	0
Kontrolle +	9 (0)	12 (0)	18 (0)	2,8 ± 0,7	0

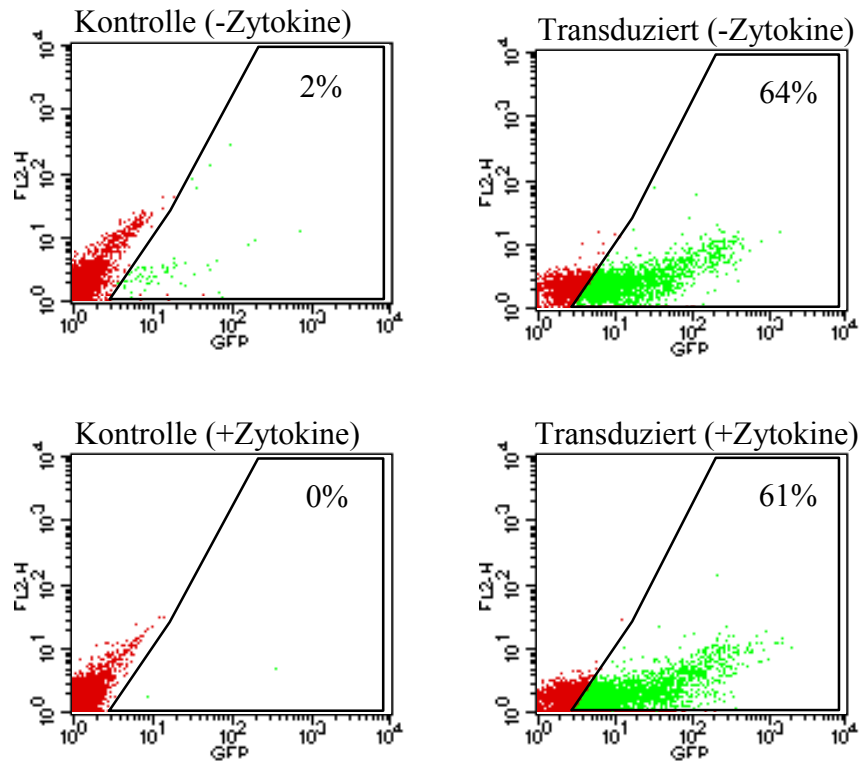


Abb. 4-16: Dot-Blot Darstellung der FACS-Analyse der transduzierten $CD34^+$ -Zellen drei Tage nach Transduktion mit lentiviralen Vektoren. Ein Teil der Zellen wurde für etwa 40 Stunden ohne Zytokine kultiviert. Der andere Teil der Zellen wurde seit Beginn der Kultivierung mit Zytokinen supplementiert.

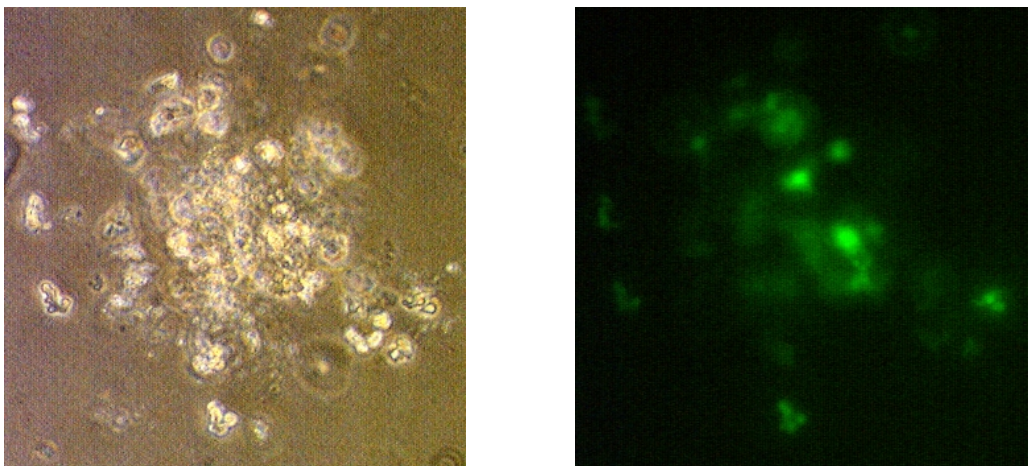


Abb. 4-17: Exemplarisch dargestellt ist die Aufnahme einer GFP positiven Kolonie der Agar-Kultur, die aus einer $CD34^+$ -Zellen hervorgegangen ist. Das Bild wurde 13 Tage nach Ausplattieren aufgenommen.

4. 1. 3. 2. Transduktion von CD34⁺-Zellen mit konzentriertem Virusüberstand nach Anionenaustauschchromatographie

Da sich in den vorangegangenen Experimenten zeigte, daß Konzentrierung durch Anionenaustauschchromatographie eine höhere beziehungsweise vergleichbare Anreicherung von Viruspartikeln erlaubte als die der Ultrazentrifugation, sollte die Transduktionseffizienz eines solch präparierten Überstandes auf CD34⁺-Zellen getestet werden. Dafür wurden bei – 80 °C gelagerte Stammzellen aus Knochenmark aufgetaut, gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die 8×10^5 Zellen wurden zu je 4×10^5 Zellen aufgeteilt und in jeweils 2 ml X-VIVO 10 Medium aufgenommen. Die eine Hälfte wurde mit Zytokinen supplementiert (SCF [100ng /ml], Flt3-L [100 ng/ml], IL-3 [20 ng/ml], IL-6 [20 ng/ml]). Anschließend wurden die Zellen vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Partikel eines bei –80 °C gelagerten Virusüberstandes wurden dann wie in dem unter 4. 1. 2. 4. beschriebenen Experiment durch Anionenaustauschchromatographie konzentriert, durch Ultrafiltration (Vivaspin 15, 100 kDa) entsalzt und weiter eingeeengt. Ein kleiner Teil des Überstandes wurde vor und nach der Konzentrierung entnommen und damit eine Titerbestimmung auf 293T-Zellen durchgeführt. Die mit und ohne Zytokine präinkubierten CD34⁺-Zellen wurden dann auf je drei Vertiefungen einer 24-Lochplatte pro Aliquot aufgeteilt. In jeweils ein Loch pro Ansatz wurde 1,5 ml konzentrierter Virusüberstand gegeben, in ein zweites dann jeweils 1,5 ml des 1:10 verdünnten Virus und in die Kontrolle wurde entsprechend 1,5 ml Medium gefüllt. Der Teil der Zellen, der zuvor schon in Gegenwart von Zytokinen inkubiert wurde, wurde weiterhin mit Zytokinen supplementiert. Nach Zentrifugation (90 min., 2500 rpm, 32 °C) wurden die Zellen für 150 min. inkubiert und ein Halbmediumwechsel durchgeführt. Dann folgte eine Inkubation über Nacht und ein weiterer Austausch der Hälfte des Mediums. Hierbei wurden alle Zellen mit Zytokinen supplementiert. Nach sieben Tagen erfolgte neben der Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop auch eine FACS-Analyse.

Die Titerbestimmung des eingesetzten Virusüberstandes ergab einen Titer von $2,3 \times 10^6$ IU/ml vor und $4,7 \times 10^7$ IU/ml nach der Konzentrierung. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zeigte sich, daß sich die Transduktionseffizienz gegenüber dem Versuch mit Ultrazentrifugation auf schätzungsweise 10 – 20 % erhöht hatte (siehe Abb. 4-19). Bei dieser optischen Auswertung konnte für die Zellen, die in Gegenwart von Zytokinen kultiviert wurden, eine höhere Transduktionseffizienz beobachtet werden (siehe Abb. 4-19). Dies bestätigte sich nicht in der anschließenden FACS-Analyse. Hier wurden 19 % GFP exprimierende Zellen ohne Zytokine und 14 % mit Zytokine gemessen, wenn konzentriertes

Virus verwendet wurde. Wie in Abbildung 4-19 dokumentiert, bewirkt die Gabe von Zytokinen möglicherweise eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals der positiven Zellen zu höheren Intensitäten. In diesem Experiment konnte wie im Experiment 4. 1. 2. 7. festgestellt werden, daß die mikroskopisch ermittelte Zunahme an GFP-exprimierenden Zellen im Zusammenhang mit einer Verschiebung des FACS-Signals zu höheren Fluoreszenzintensitäten steht (FL-1 ≥ 100).

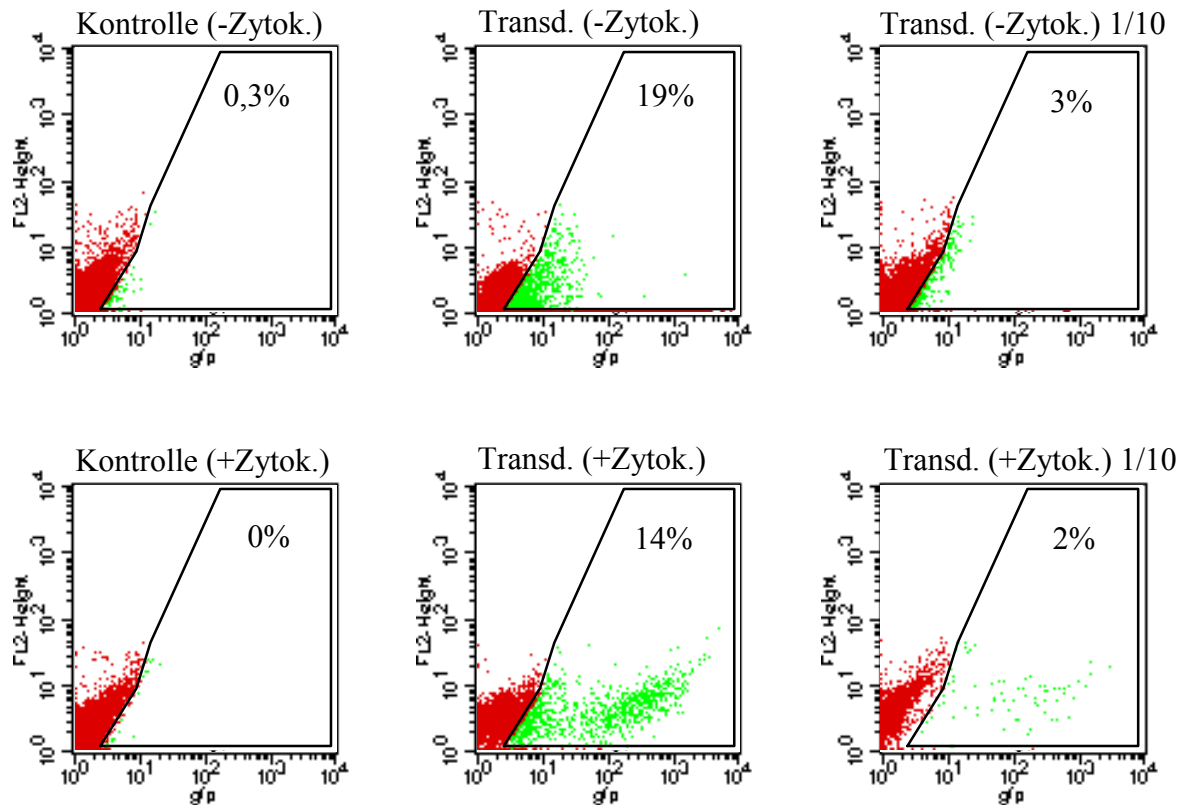


Abb. 4-18: Graphische Darstellung der FACS-Analyse der transduzierten CD34⁺-Zellen. In der oberen Reihe sind die Dot-Blots der Zellen aufgeführt, die ohne Zytokine kultiviert wurden. In der Reihe darunter die entsprechenden Abbildungen der Zellen, die bereits nach dem Auftauen in Gegenwart von Zytokinen kultiviert wurden. Die FACS-Analyse erfolgte sieben Tage nach Transduktion.

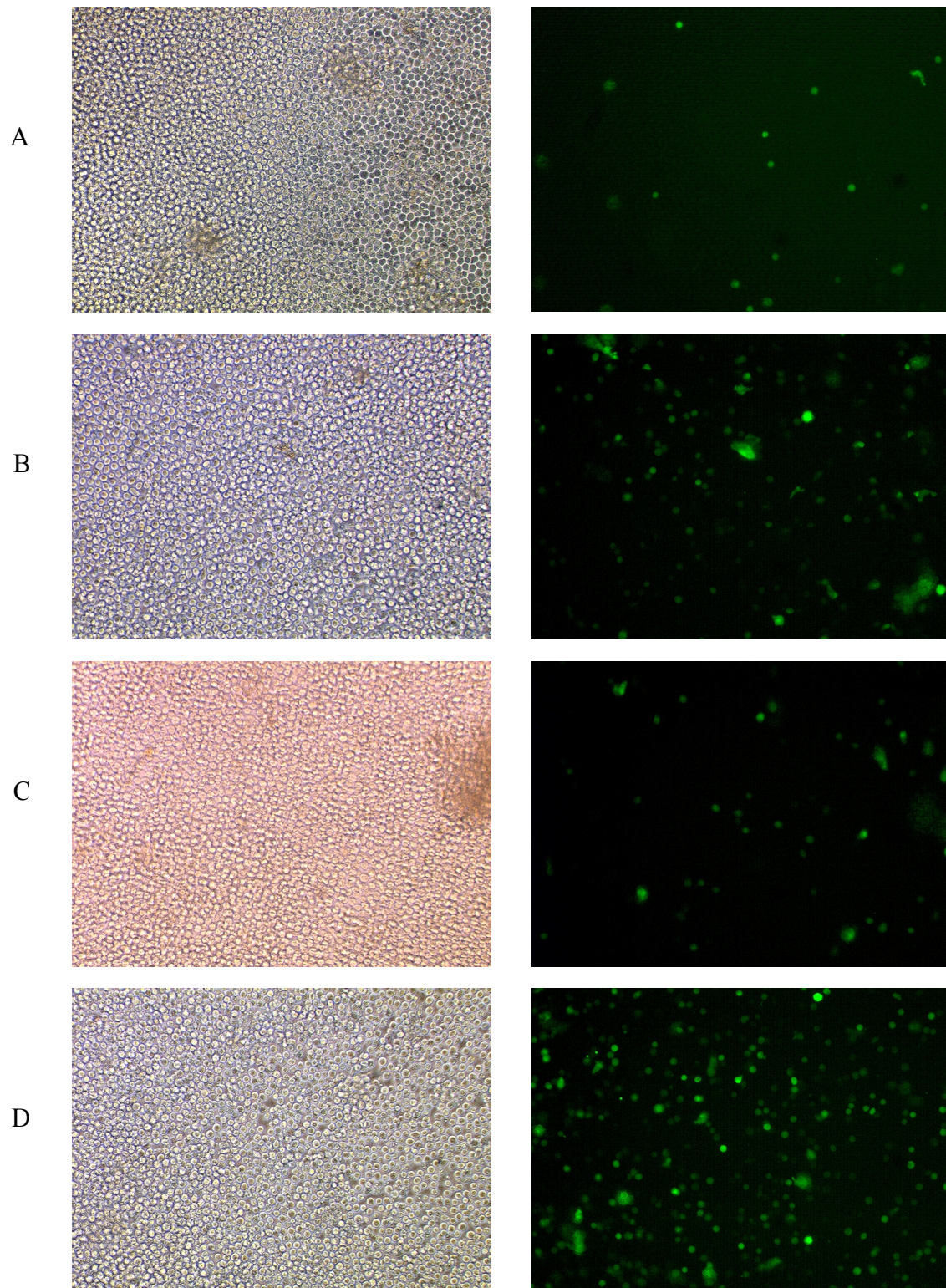


Abb. 4-19: Fluoreszenzaufnahmen der mit konzentriertem und verdünntem Virusüberstand infizierten CD34⁺-Zellen sieben Tage nach Transduktion. (A – Ohne Zytokingabe bei Präinkubation und Infektion, Virus 1:10 verdünnt, B – wie A, aber Virus konzentriert; C – mit Zytokinen behandelt, Virus 1:10 verdünnt, D – wie C, aber konzentriertes Virus).

4. 1. 3. 3. Transduktion von hämatopoetischen Vorläuferzellen mit konzentriertem Virusüberstand nach „Low Speed“-Zentrifugation

Die Konzentration durch „Low Speed“-Zentrifugation über Nacht erwies sich als eine Alternative zu den bereits getesteten Methoden. Auch in diesem Fall wurde die Fähigkeit des so präparierten Virus, CD34⁺-Zellen effizient zu transduzieren, getestet. Dafür wurden Stammzellen aus peripheren Blut, die in flüssigem Stickstoff gelagert waren, schonend aufgetaut. Nach dem Waschen wurden sie in 2 ml X-VIVO 10 Medium aufgenommen und mit Zytokinen supplementiert (SCF [100 ng/ml], Flt3-L [100 ng/ml], TPO [100 ng/ml]). Dann folgte die Inkubation über Nacht im Brutschrank. Parallel dazu wurden 120 ml eines bei -80 °C gelagerten Virusüberstandes, der mit pCGWS als Transgenvektor generiert wurde, wie im Abschnitt 4. 1. 2. 7. beschrieben über Nacht zentrifugiert (16 Stunden, 1000 x g, 4 °C) und in 3 ml X-VIVO 10 Medium resuspendiert (2 Stunden, 200 rpm, Raumtemperatur). Zusätzlich wurden die resuspendierten Partikel filtriert (0,45 µm Filter) um eventuell vorhandene Verunreinigungen zu entfernen. Von dem Überstand wurden Aliquots vor Zentrifugation, nach Zentrifugation und nach 0,45 µm Filtration für eine Titerbestimmung auf 293T-Zellen eingesetzt. Nach der Zentrifugation wurde parallel zur Resuspension des Virus eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Jeweils $1,2 \times 10^5$ CD34⁺-Zellen wurden in die Vertiefungen einer 24-Lochplatte ausgesät. In jeweils vier Löcher wurden dann 0,5 ml konzentrierte Partikel gegeben, zwei Kavitäten wurden als Kontrolle nur mit Medium gefüllt. Alle Ansätze wurden mit Zytokinen und 4 µg/ml Protaminsulfat versetzt. Die Infektion erfolgte dann durch Zentrifugation (90 min., 1215 x g, 32 °C) und 150 min. Inkubation bei 37 °C. Bei zwei Ansätzen wurde dann der Virusüberstand nochmals gegen frischen Virusüberstand ausgetauscht bevor die Inkubation über Nacht fortgesetzt wurde. Für einen Methylzellulose Assay wurden dann pro Ansatz in Triplikaten 1000 Zellen pro Petrischale (35mm, Greiner) ausgesät. Anschließend erfolgte ein Austausch von $\frac{3}{4}$ des Mediums und eine Fortsetzung der Kultur für zwei Tage. Die Zellen wurden gewaschen und eine Differenzierungskultur angelegt. Dafür wurden die HSC in Myelocult Medium (Stem Cell Technologies) aufgenommen und mit Hydrocortison [1 µM], SCF [50 ng/ml] sowie G-CSF [10 ng/ml] supplementiert. Fünf Tage nach Infektion wurde eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung und weitere neun Tage später eine FACS-Analyse der Zellen durchgeführt. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen mit CD33-Antikörper markiert. CD33 ist ein transmembranes Glycoprotein, das auf Monozyten und Granulozyten sowie deren Vorläufer

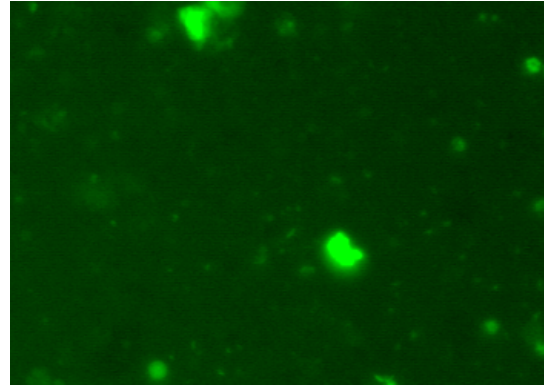
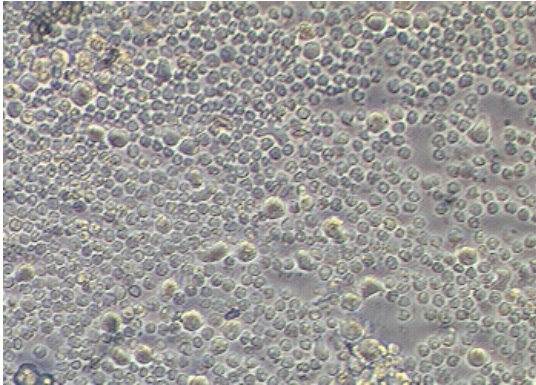
präsent ist, jedoch nicht auf sehr frühen Vorläuferzellen. Am darauf folgenden Tag wurde der Kolonie-Assay ausgewertet.

Die Titerbestimmung ergab für Virusüberstand vor Zentrifugation 3×10^4 IU/ml, nach Zentrifugation erhöhte sich der Titer auf $5,3 \times 10^5$ IU/ml. Die zusätzliche Filtration führte zu einer Abnahme der Partikelzahl auf 3×10^5 IU/ml. Damit ergibt sich für dieses Transduktionsexperiment nur eine MOI von 1,25. Dies ist gemessen an den vorherigen CD34⁺-Versuchen (MOI 50 bei Ultrazentrifugation und MOI \approx 500 bei Fractoflow®) extrem gering. Bei den HSCs wurde schon nach der Präinkubation ein schlechter Zustand der Zellen festgestellt. So wurden in der Zellzahlbestimmung von den 2×10^6 eingefrorenen Zellen, lediglich $1,2 \times 10^6$ lebende Zellen detektiert. Im Fluoreszenzmikroskop wurde eine hohe GFP-Expression beobachtet, wobei jedoch eine Vielzahl der exprimierenden Zellen tot war (siehe Abb. 4-19). In der FACS-Analyse wurden durchschnittlich 80 - 90 % CD33 exprimierende Zellen gemessen. Von den einmal transduzierten Zellen zeigten rund 10 % eine GFP-Expression. Nach zweimaliger Transduktion betrug der Anteil GFP-positiver Zellen 14 %. Die Daten sind in einer Dot-Blot Auftragung in Abb. 4-21 dargestellt. Im Kolonie-Assay erwiesen sich durchschnittlich 10 % der Zellen als klonogen. In diesem Assay zeigten 10 % der einmal und 14 % der zweimal infizierten koloniebildenden Zellen eine Expression von GFP. Die Ergebnisse des klonalen Assays in semisolidem Medium sind in Tabelle 4-8 zusammengefasst.

Tab. 4-8: Auswertung des Methylzellulose-Assays. Die Gesamtkoloniezahl umfaßt alle bei Durchlicht gezählten Kolonien (Mittelwert der Dreifachbestimmung \pm Standardabweichung). Die Klonogenität errechnet sich aus der Anzahl der gebildeten Kolonien in Relation zu den ausgesäten Zellen (1000 Zellen/Petrischale). Die Transduktionseffizienz ist der prozentuale Anteil positiver Kolonien an der Gesamtzahl der Kolonien.

	Koloniezahl gesamt	Positive Kolonien	Klonogenität [%]	Transduktionseffizienz [%]
Kontrolle	96 \pm 11	0	9,6	0
1 x infiziert	113 \pm 33	11 \pm 7	11,3	9,7
2 x infiziert	118 \pm 23	17 \pm 6	11,8	14,4

1x transduziert



2x transduziert

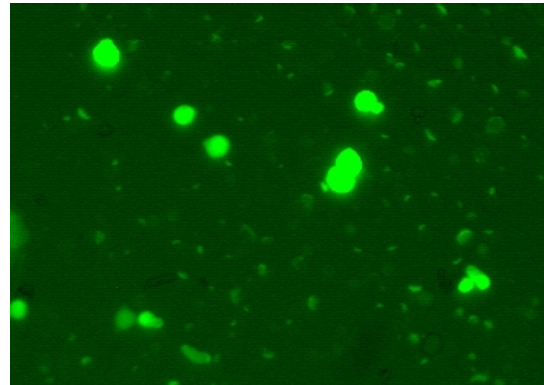
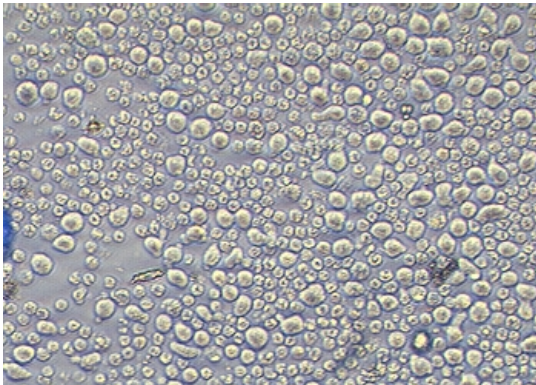


Abb. 4-20: Aufnahmen der einmal (obere Reihe) beziehungsweise zweimal (untere Reihe) transduzierten CD34⁺-Zellen. Die Bilder wurden fünf Tage nach Transduktion angefertigt. Die Stammzellen wurden über Nacht in zytokinhaltigem Medium präinkubiert. Nach zwei Tagen wurde von den Zellen eine Differenzierungskultur angelegt.

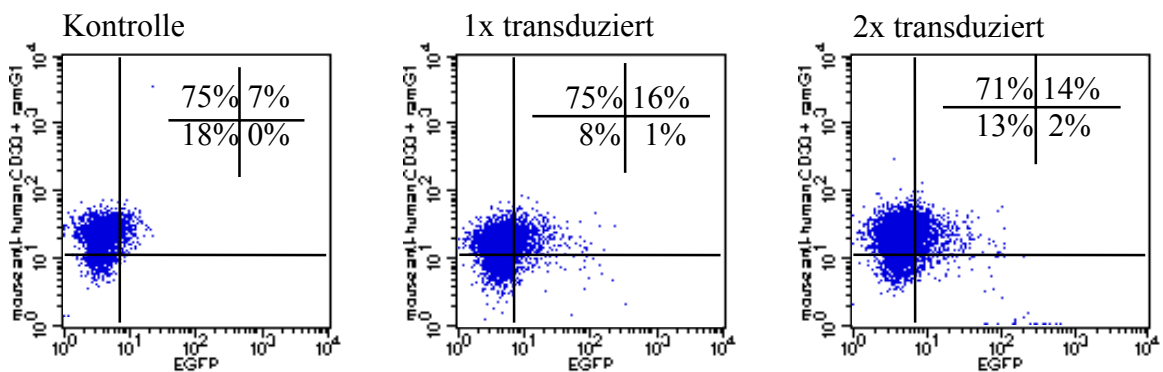


Abb. 4-21: Dot-Blot Darstellung der FACS-Ergebnisse der transduzierten Zellen. Aufgetragen ist das Fluoreszenzsignal der CD33-Markierung gegen die Fluoreszenz, die von GFP hervorgerufen wird. Die Auswertung der Quadranten ist in der jeweiligen Abbildung oben links in Prozent angegeben. Die FACS-Analyse erfolgte 14 Tage nach Transduktion.

4. 1. 3. 4. Vergleich verschiedener Methoden zur Konzentrierung von Viruspartikeln in Bezug auf die Transduktionseffizienz von CD34⁺-Zellen

Nach der Etablierung verschiedener Methoden zur Konzentrierung von Virus, sollte in parallel durchgeführten Experimenten direkt miteinander verglichen werden, ob diese Methoden qualitative und quantitative Unterschiede in Bezug auf die Transduktionseffizienz von CD34⁺-Zellen zeigen.

Für die Untersuchung wurden fünf subkonfluente Zellkulturflaschen (T175, Greiner) mit ausplattierten 293T-Zellen transfiziert und dreimal Virusüberstand innerhalb von 48 Stunden gesammelt. Nach Abtrennung von Zellen und Zelltrümmern wurden die insgesamt 300 ml Überstand in drei Portionen zu je 100 ml aufgeteilt. Die Anteile wurden dann mittels „Low Speed“-Zentrifugation, Ultrazentrifugation oder Fractoflow® auf 1,5 ml konzentriert. Die aus peripherem Blut stammenden CD34⁺-Zellen wurden am Abend vor der Transduktion in Kultur genommen und auf eine Zellzahl von 10⁶ Zellen / ml eingestellt. Am folgenden Tag wurden die Zellen in einer Zellzahl von 10⁵ Zellen pro Kavität in einer mit Retronectin (Takara) beschichteten 24-Lochplatte in einem geringen Volumen ausgesät. Dazu wurde in jeweils eine Vertiefung 500 µl konzentriertes Virus, nicht-konzentriertes Virus und Medium für die Kontrolle zugegeben. Die Platte wurde zunächst zentrifugiert (90 min., 2500 rpm, 32 °C) und dann über Nacht in Gegenwart des Virus inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Parallel dazu wurden TF1 zur Kontrolle ebenfalls mit 0,5 ml Überstand infiziert und sowohl eine Titerbestimmung auf 293T angesetzt als auch der Titer mittels TaqMan-PCR bestimmt. Einen Tag später wurden ¾ des Mediums ausgetauscht. Da die CD34⁺-Zellen in keinem guten Zustand waren, wurde am darauf folgenden Tag ein kompletter Wechsel des Mediums vorgenommen. Nach fünf Tagen wurde die Titerbestimmung ausgezählt und zwei Tage später eine FACS Analyse der transduzierten Zellen durchgeführt.

Die Titerbestimmung auf 293T-Zellen ergab für den mittels „Low Speed“ konzentrierten Virusüberstand den höchsten Titer mit $5,0 \pm 0,7 \times 10^8$ IU/ml. Mit Ultrazentrifugation wurde ein Wert von $3,8 \pm 1,2 \times 10^8$ IU/ml und mit Fractoflow® einer von $7,3 \pm 3,9 \times 10^7$ IU/ml ermittelt. Der Titer, der über TaqMan-PCR bestimmt wird, mißt die Anzahl der RNA-Genom Kopien im Überstand und ermittelt somit eine quantitative Anzahl der produzierten Partikel. Im Gegensatz dazu, gibt der auf Zellen bestimmte Titer die Anzahl der infektiösen Partikel und somit den „biologischen“ Titer wieder. Die höchsten Titer, die über TaqMan-PCR ermittelt wurden, enthielten jeweils $2,0 \pm 0,1$ beziehungsweise $2,0 \pm 0,5 \times 10^9$ Partikel/ml

(P/ml) und wurden mittels Ultrazentrifugation beziehungsweise Fractoflow® konzentriert. Für die Anreicherung von Partikeln mittels „Low Speed“-Zentrifugation wurden $1,6 \pm 0,3 \times 10^9$ P/ml detektiert. Die Ergebnisse der Titerbestimmung sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 4-9: Ergebnisse der Titerbestimmungen auf 293T-Zellen (biologischer Titer) und mittels TaqMan-PCR (quantitativer Titer). Der biologische Titer (IU/ml) wurde in Duplikaten, der quantitative Titer (Partikel/ml) in Triplikaten bestimmt. Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung. (KF – Konzentrierungsfaktor).

Zellpopulation	Titer [IU/ml] bzw. [P/ml]	KF	Σ Partikel [IU]	Ausbeute [%]
Biologischer Titer				
Vor Konzentrierung	$9,3 \pm 2,5 \times 10^6$	1	$9,3 \pm 2,5 \times 10^8$	100
„Low Speed“ Zent.	$5,0 \pm 0,7 \times 10^8$	54	$7,5 \pm 1,1 \times 10^8$	81
Ultrazentrifugation	$3,8 \pm 1,2 \times 10^8$	41	$5,7 \pm 1,8 \times 10^8$	61
Fractoflow®	$7,3 \pm 3,9 \times 10^7$	8	$1,1 \pm 0,6 \times 10^8$	12
Quantitativer Titer				
Vor Konzentrierung	$7,1 \pm 1,7 \times 10^7$	1	$7,1 \pm 1,7 \times 10^9$	100
„Low Speed“ Zent.	$1,6 \pm 0,3 \times 10^9$	23	$2,4 \pm 0,5 \times 10^9$	34
Ultrazentrifugation	$2,0 \pm 0,1 \times 10^9$	28	$3,0 \pm 0,3 \times 10^9$	42
Fractoflow®	$2,0 \pm 0,5 \times 10^9$	28	$3,0 \pm 0,8 \times 10^9$	42

In der FACS-Analyse zeigte sich, daß 25 % der CD34⁺-Zellen, die mit unkonzentriertem Virusüberstand transduziert wurden, GFP exprimierten. Bei Zellen, die mit Fractoflow® konzentriertem Überstand infiziert wurden, konnte ein Anteil von 21 % GFP positiver Zellen bestimmt werden. In der FACS-Messung zeigten 85 % der Zellen, die mit zentrifugiertem („Low Speed“-Zentrifugation) Virusüberstand infiziert wurden und 97 % der mit ultrazentrifugiertem Überstand behandelten Zellen, eine GFP-Expression. Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit der optischen Auswertung im Fluoreszenzmikroskop, bei der eine starke, teilweise diffuse Fluoreszenz beobachtet wurde. Die Daten der FACS-Analyse der transduzierten CD34⁺-Zellen sind in Abb. 4-22 dargestellt. Die FACS-Analyse der TF1-Zellen hingegen entsprach den Erwartungen nach optischer Auswertung im Fluoreszenzmikroskop. Hier zeigten 91 – 97 % der transduzierten Zellen eine GFP-Expression. Die entsprechenden Daten sind in Abbildung 4-23 dargestellt.

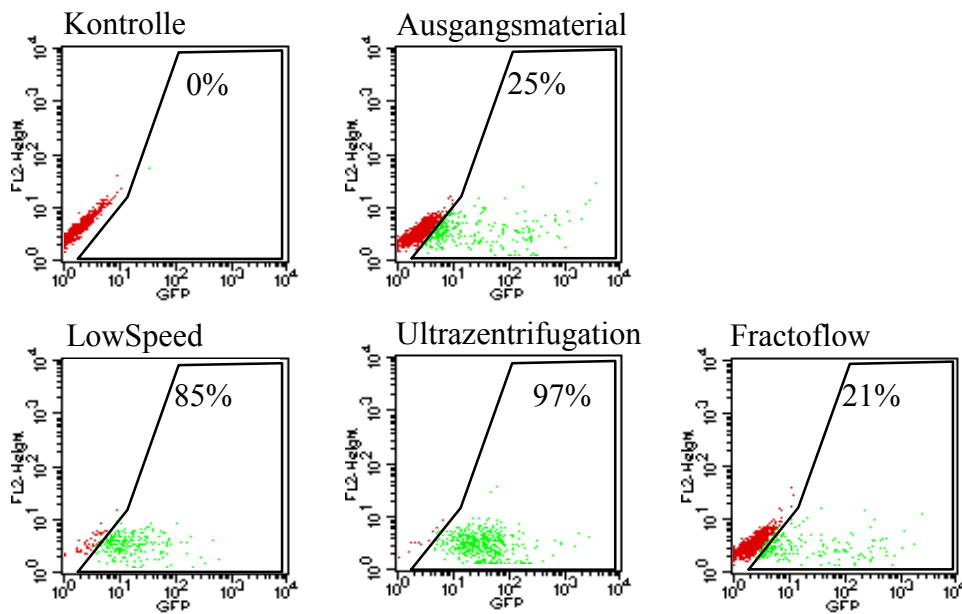


Abb. 4-22: Dot-Blot Darstellung transduzierter CD34⁺-Zellen. Die FACS-Analyse wurde sieben Tage nach Transduktion durchgeführt.

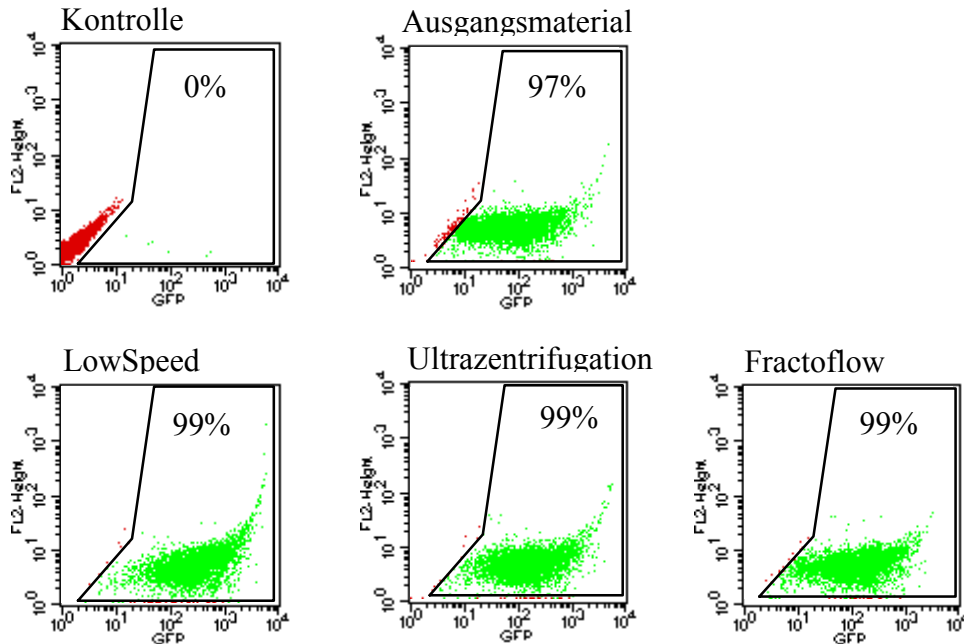


Abb. 4-23: Dot-Blot Darstellung transduzierter TF1-Zellen. Die FACS-Analyse wurde sieben Tage nach Transduktion durchgeführt.

Im Gegensatz zur FACS-Analyse konnte im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden, daß sich die CD34⁺-Stammzellen mit nicht-konzentriertem und mittels Fractoflow®

konzentriertem Virusüberstand am Besten transduzieren ließen. Die Zellen, die mit durch „Low Speed“-Zentrifugation sedimentierten Viruspartikeln transduziert wurden, zeigten die optisch schlechteste Transduktionseffizienz. Auffällig war hier das Auftreten einer Hintergrundfluoreszenz, die keine scharfen Konturen einer Zelle besaß, sondern ein diffuses Erscheinungsbild zeigte. Das gleiche Phänomen trat auch bei den mit ultrazentrifugierten Überstand transduzierten Stammzellen auf, wenngleich hier die Hintergrundfluoreszenz etwas andere Konturen zeigte. Die optische Auswertung im Fluoreszenzmikroskop ist in Abbildung 4-24 dargestellt. Die zur Kontrolle transduzierten TF1-Zellen zeigten zu über 95 % (Schätzwert) eine GFP-Expression. Aufgrund des sehr hohen Titers vor der Konzentrierung ist bei den Zellen, die mit dem ursprünglich geernteten Virusüberstand transduziert wurden, ein sehr effizienter Gentransfer erfolgt. Deshalb ist der Effekt der Konzentrierung bei den Zellen, die mit angereicherten Partikeln infiziert wurden, nicht so deutlich. Die transduzierten TF1-Zellen sind in Abbildung 4-25 dargestellt.

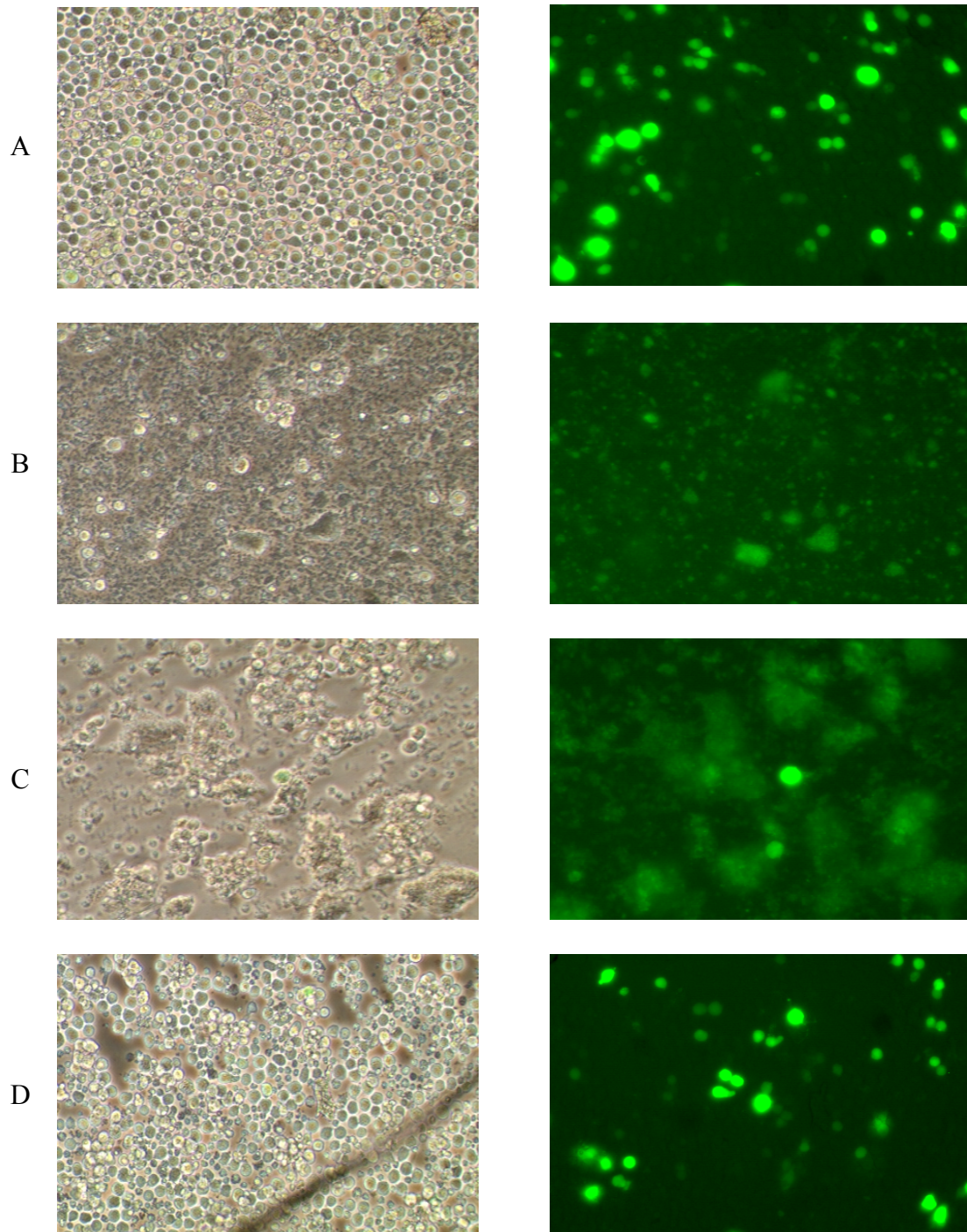


Abb. 4-24: Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der mit konzentriertem und unkonzentriertem Virusüberstand transduzierten $CD34^+$ -Zellen. Die Aufnahmen wurden fünf Tage nach Transduktion angefertigt. (A – Virusüberstand vor der Konzentrierung, B – Zentrifugation, C – Ultrazentrifugation, D – Fractoflow®).

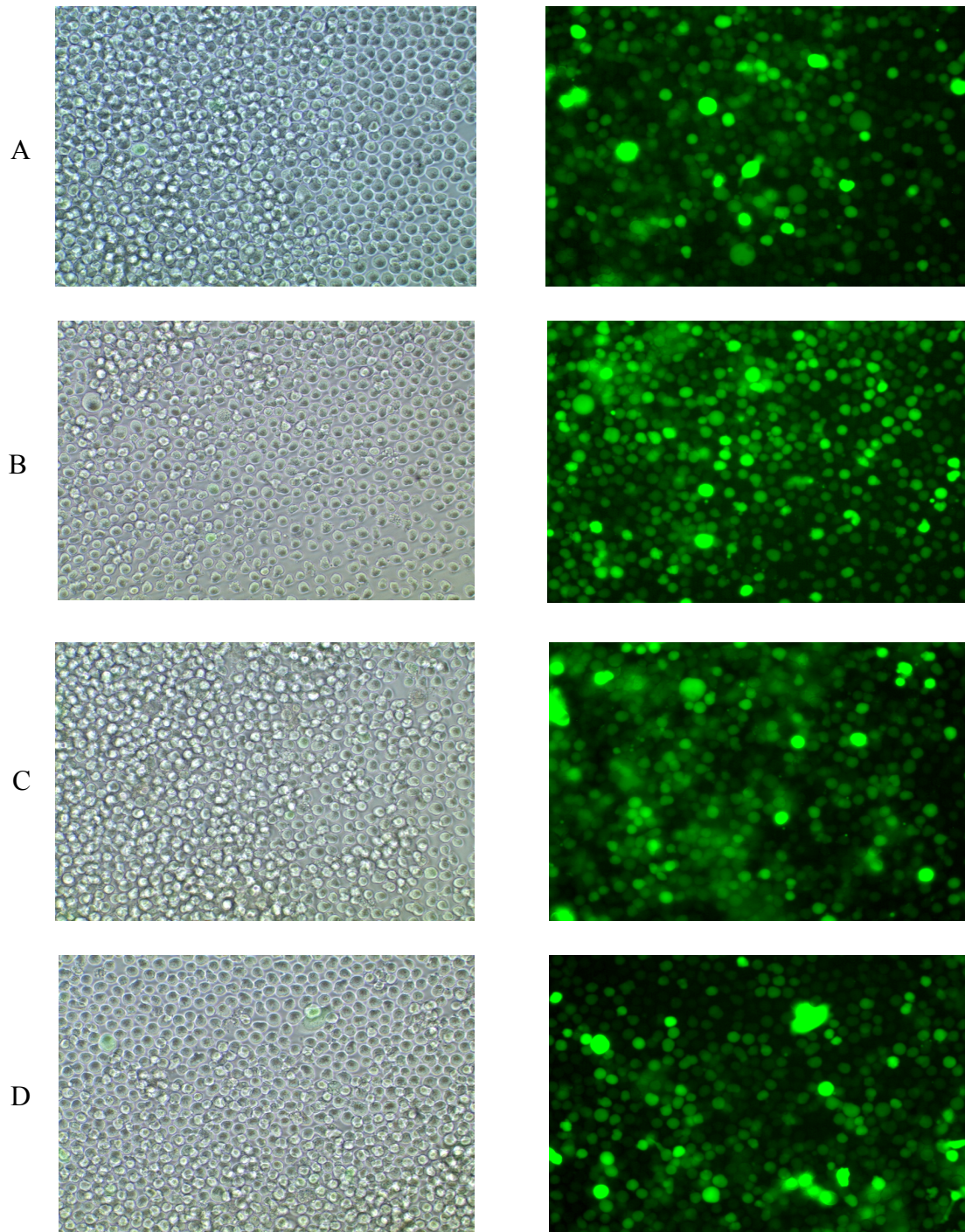


Abb. 4-25: Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der mit konzentriertem und unkonzentriertem Virusüberstand transduzierten TFI1-Zellen. Die Aufnahmen wurden fünf Tage nach Infektion der Zellen angefertigt. (A – Virusüberstand vor der Konzentrierung, B – Zentrifugation, C – Ultrazentrifugation, D – Fractoflow®).

Das Auftreten der diffusen Fluoreszenz in den zentrifugierten und ultrazentrifugierten Überständen war Anlaß, die Zellen mikroskopisch näher zu untersuchen. Bei stärkerer Vergrößerung zeigten die Konzentrate der durch Zentrifugation sedimentierten Partikel Rückstände unbekannter Zusammensetzung (Abb. 4-26), während bei dem mittels Fractoflow® angereichertem Virus keine Kontaminationen detektiert werden konnten. Durch „Low Speed“-Zentrifugation bildeten sich gröbere, eher flächige Partikel, während durch Ultrazentrifugation feinere, eher körnige Partikel zurückblieben. Im Zusammenhang damit wurde auch eine Hintergrundfluoreszenz beobachtet.

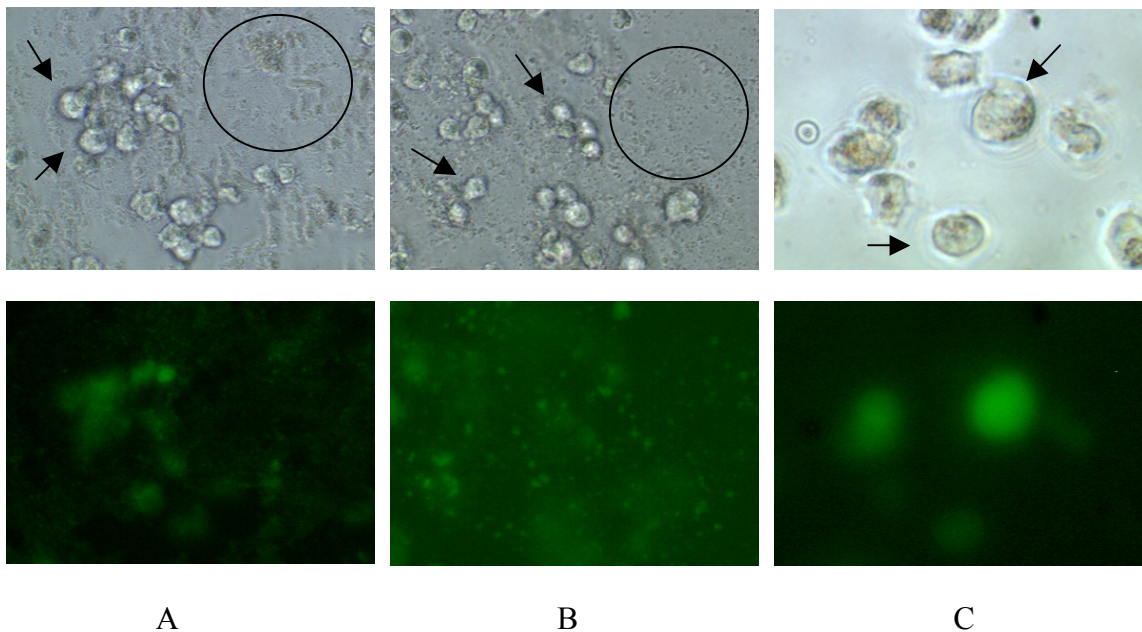


Abb. 4-26: Mikroskopische Aufnahmen der durch Konzentrierung hervorgerufenen Verunreinigungen im Virusüberstand. Aufgenommen in 40facher Vergrößerung fünf Tage nach Transduktion der $CD34^+$ -Zellen. (A – „Low Speed“-Zentrifugation, B – Ultrazentrifugation, C – Fractoflow®). Zellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet, die Rückstände durch Kreise hervorgehoben.

4. 2. Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität durch Transduktion mit lentiviralen gp91^{phox}-Vektoren

Die chronische Granulomatose (CGD) ist ein angeborener Defekt der phagozytierenden Leukozyten, durch den die membran-assoziierte NADPH-Oxidase gar keine beziehungsweise eine nicht ausreichende Menge antimikrobiell wirksamer Superoxide produzieren kann (Zhen et al., 1993). Die Folge ist eine erhöhte Anfälligkeit der Patienten für bakterielle Infekte und Pilzkrankungen. In 65 % der CGD-Erkrankungen ist die auf dem X-Chromosom kodierte gp91^{phox}-Untereinheit von Mutationen betroffen (X-CGD). Betroffene Patienten erleiden wiederholt lebensbedrohliche Infektionen und haben eine drastisch reduzierte Lebenserwartung (Curnutte, 1993).

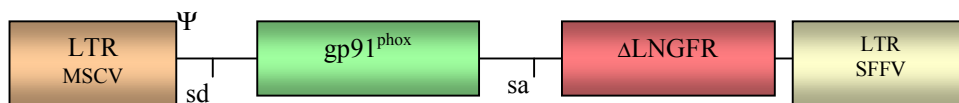
Der für eine substitutionelle Gentherapie geeignete Vektor sollte das therapeutische Gen über einen langen Zeitraum, idealerweise ein Leben lang, exprimieren. Darüber hinaus sollte die Integration des Transgens mit einer hohen Rekonstitutionsrate funktioneller NADPH-Oxidase verbunden sein. Außerdem muß das Vektorsystem Viruspartikel produzieren, die frühe, noch pluripotente Stammzellen mit der größtmöglichen Effizienz infizieren können. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden im zweiten Teil der Arbeit verschiedene Vektoren konstruiert und getestet.

X-CGD PLB-985-Zellen sind ein *in vitro* Modell der X-chromosomalen chronischen Granulomatose. Hierfür wurde via homologe Rekombination in PLB-985, eine humane promyeloische Zelllinie, das gp91^{phox} Gen gezielt ausgeschaltet (Zhen et al., 1993). Darüber hinaus können die Zellen durch Kultivierung für fünf bis sechs Tage in Medium mit 0,5 % DMF unter anderem zu Granulozyten ausdifferenziert werden.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen und die funktionellen Assays wurden jeweils 10^5 X-CGD PLB-985-Zellen mit 20fach konzentriertem Virusüberstand und 4µg/ml Protaminsulfat transduziert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen expandiert und für die Assays eine entsprechende Zellzahl durch Gabe von 0,5 % DMF ausdifferenziert. Mit den ausdifferenzierten Granulozyten konnten dann die Rekonstitutionsexperimente, die FACS-Messung und die Westernblot Analyse durchgeführt werden. Für den Nachweis der Integration wurde aus nicht-differenzierten Zellen genomische DNA isoliert und mittels PCR mit gp91^{phox} Oligos untersucht.

4. 2. 1. Konstruktion der lentiviralen Vektoren pSIN2-CMV-gp91 und pSIN2-CMV-gp91-WPRE

Zunächst wurde der Vektor pCgp91IGWS konstruiert. Hierfür wurde das gp91^{phox}-Gen aus dem Vektor MgSLΔS (siehe Abb. 4-27) mittels PCR amplifiziert, wobei die als Primer eingesetzten Oligonukleotide mit einer 3' liegenden Xho I - und einer 5' liegenden BamH I Schnittstelle ausgestattet wurden. Das PCR-Produkt konnte somit über diese Restriktionsschnittstellen in den pCIGWS Vektor (siehe Abschnitt 4. 1. 1.) in die multiple Klonierungsstelle (MCS) zwischen den CMV-Promotor und der IRES („internal ribosomal entry site“) eingebaut werden. Erste Tests mit diesem Vektor zeigten jedoch nur eine unregelmäßige GFP-Expression, und es konnte auch in funktionellen Untersuchungen keine Rekonstitution beobachtet werden. Eine Integration der viralen DNA konnte jedoch nachgewiesen werden. Aufgrund der schlechten Ergebnisse der Vorversuche wurde der parallel dazu entwickelte Vektor pSIN2-CMV-gp91 weiter verwendet und modifiziert.



pMgSLΔS

Abb. 4-27: Darstellung des retroviralen Vektors MgSLΔS.

Ausgehend vom lentiviralen Vektor pSIN2-CMV-LacZ (R. Zuffrey, Universität Genf) wurde das Markergen *lacZ* über Restriktionsendonuklease-Verdau mit BamH I und Kpn I entfernt. Dafür wurde das therapeutische Gen gp91^{phox} über die gleichen Schnittstellen eingebaut (S. Wasser, Kinderspital Zürich). Das etwa 1750 bp umfassende Gen wurde mittels PCR aus dem Plasmid MgSLΔS (S. Becker, GSH Frankfurt a. M.) amplifiziert, wobei 5' eine BamH I Schnittstelle und 3' eine Kpn I Schnittstelle generiert wurde.

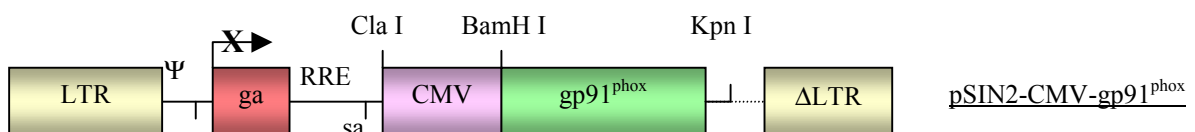


Abb. 4-28: Konstruktion des pSIN2-CMV-gp91^{phox} Vektors.

In das pSIN2-CMV-gp91^{phox} Konstrukt wurde zusätzlich die Sequenz für WPRE (vgl. 4. 1. 1.) eingebaut. Hierdurch sollte die Expression erhöht und somit auch die Rekonstitutionsrate der NADPH-Oxidase gesteigert werden. Dazu wurde der Vektor zunächst mit Kpn I geöffnet und die überstehenden Enden mit T4-DNA-Polymerase abgebaut. Parallel dazu wurde aus dem pCGWS Vektor mit EcoR I die etwa 600 bp große WPRE-Sequenz herausgeschnitten und die überstehenden Enden durch Behandlung mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Das so behandelte Fragment wurde über Gelelektion gereinigt und in einer Ligation eingesetzt.

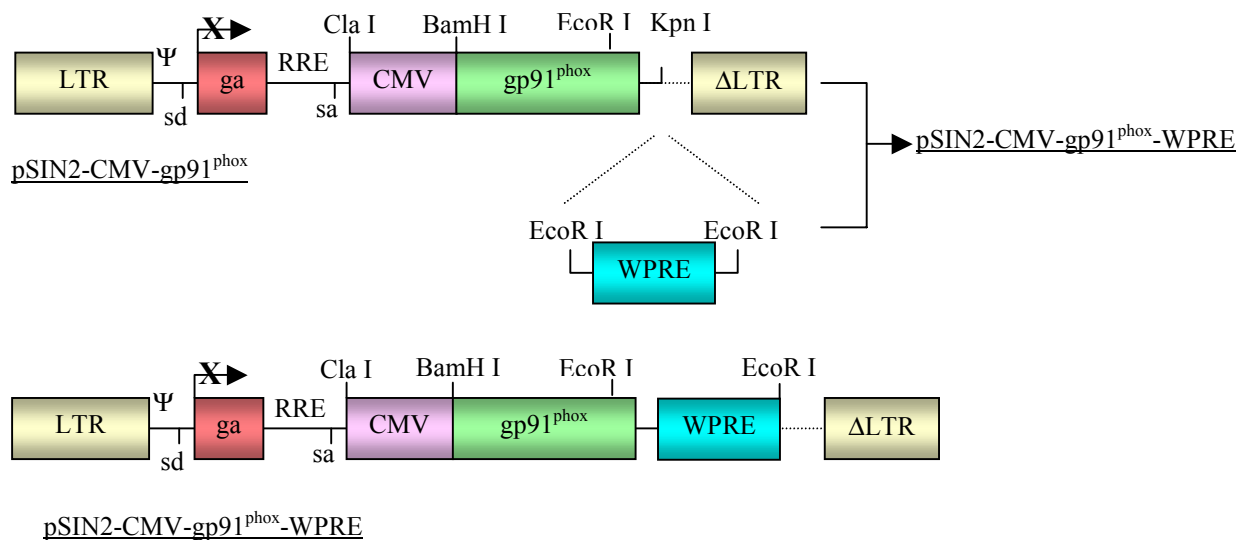


Abb.4-29: Konstruktion des pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE Vektors (pCMV-gp91-WPRE).

Beide Konstrukte wurden in der myeloischen Modellzelllinie X-CGD PLB-985 getestet. Neben den funktionellen Analysen wurde auch die Expression im FACS, die Integration über PCR auf genomischer DNA und das Protein immunologisch nachgewiesen. Darüber hinaus wurden Zellen mit retroviralem Virusüberstand einer etablierten „Producer“-Zelllinie transduziert.

Der lentivirale Virusüberstand wurde, wie unter 3. 2. 2. beschrieben produziert. Der retrovirale Virusüberstand wurde mit Hilfe der „Producer“-Zelllinie PG13iMgSLΔS (generiert von H. Knoeß, GSH Frankfurt a. M.) hergestellt. Diese Zelllinie ist mit drei Konstrukten stabil transformiert. Zum einen enthält sie das MgSLΔS Konstrukt als integriertes Provirus und zum anderen die Informationen für *gag* und *pol* des MoMuLV sowie das *env*-Gen des GALV („gibbon ape leukemia virus“). Von einer subkonfluenten Kultur wurde nach Medienreduktion Virusüberstand gesammelt. Die gesammelten retroviralen und lentiviralen

Überstände wurden mit Hilfe von Vivaspin15 Ultrafiltrationseinheiten (Vivascience, 100 kDa Ausschlußgrenze) auf etwa 1/10 bis 1/20 des Ausgangsvolumens konzentriert und die Infektion wie unter 3. 2. 4. beschrieben durchgeführt. Nach Expansion der Zellen wurde ein Teil der Zellen in Medium mit 0,5 % DMF für fünf bis sechs Tage ausdifferenziert. Anschließend wurden die funktionellen Assays, die FACS-Markierung und mit die Lysate für den immunologischen Nachweis im Westernblot am gleichen Tag und der gleichen Population durchgeführt. Der semiquantitative Nachweis der Integration des Provirus durch PCR-Analyse erfolgte mit genomischer DNA, die aus nicht differenzierten Zellen isoliert wurde.

4. 2. 2. Semiquantitativer Integrationsnachweis des gp91^{phox}-Transgens

Mit der semiquantitativen Integrationsanalyse soll die erfolgreiche Integration der viralen cDNA nachgewiesen und die relative Anzahl an Genkopien von gp91^{phox} in der transduzierten Mischpopulation der Zellen abgeschätzt werden. Hierfür wurde genomische DNA aus nicht differenzierten Zellen isoliert. Die PCR erfolgte wie unter 3. 2. 8. 5. beschrieben (Primerpaar R12P6MgSLΔS). Die genomische DNA wurde zuvor auf eine Konzentration von 100 ng/ µl eingestellt, diese wurde spektralphotometrisch überprüft. Als Vergleichsstandard wurde Plasmid-DNA des pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE-Vektors so verdünnt eingesetzt, daß sie einer, zwei und fünf Kopien pro Zelle entsprach (siehe 3. 2. 8. 5.). Der Standard wurde mit 1 µg genomischer DNA aus 293T-Zellen supplementiert. Zusätzlich wurden 10 pg Plasmid ohne Zusatz von genomischer DNA als Positivkontrolle für die PCR verwendet. Auf einem 1 %igem Agarosegel wurde dann ein Fünftel des Ansatzes aufgetragen. Zur Kontrolle wurde ein identischer PCR-Ansatz mit der gleichen Menge an genomischer DNA untersucht, in dem ein Fragment des GAPDH-Gens als Zielsequenz amplifiziert wurde. GAPDH wird standardmäßig in solchen semiquantitativen Analysen als Zielsequenz zur Normierung herangezogen, weil es zu den sogenannten „house-keeping“ Genen gehört, die in jeder Zelle unabhängig vom Zelltyp exprimiert werden.

Bei der semiquantitativen Analyse konnte in der genomischen DNA für nicht transduzierte X-CGD PLB-985 und PLB-985 Wildtyp-Zellen keine gp91^{phox}-Bande im Elektrophoresegel nachgewiesen werden (siehe Abb. 4-30 Spur 1 und 2). Der PCR-Ansatz mit genomischer

DNA aus retroviral (MgSLΔS) transduzierten Zellen zeigte eine schwache Bande, die in der Intensität vergleichbar war mit der Bande des Standards, die einer Integration pro Zelle in der Gesamtpopulation entsprach (Abb. 4-30 Spur 3). Die Intensität der Banden der lentiviral (pSIN2-CMV-gp91^{phox}, pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE) transduzierten Zellen war gleich beziehungsweise höher, als die des Standards für fünf Kopien (Abb. 4-30 Spur 4 und 5). Rechts neben den Proben wurden die Kontrollen aufgetragen. Der GAPDH-Standard zeigte, daß gleiche Mengen an genomischer DNA eingesetzt wurden.

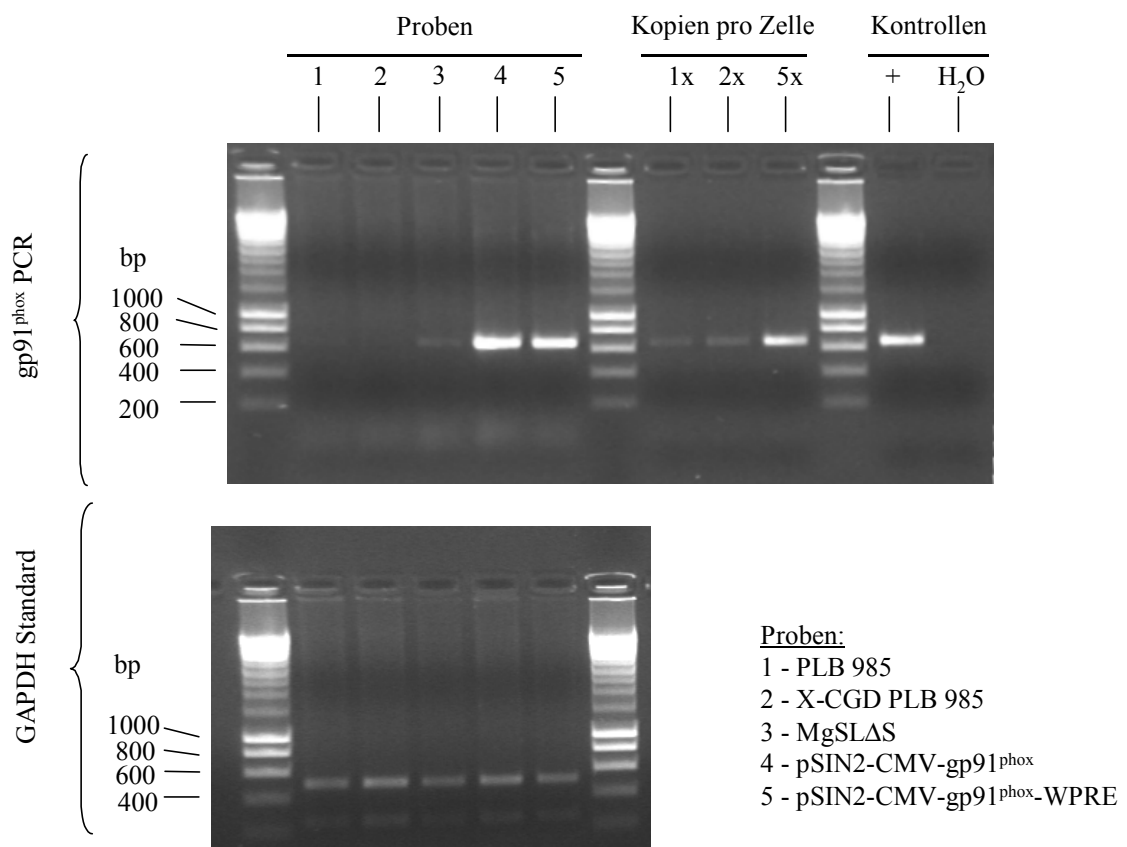


Abb.4-30: Semiquantitative PCR-Analyse mit genomischer DNA aus transduzierten Zellen und den entsprechenden Kontrollpopulationen. Für die PCR wurde von jeder Probe 1 µg genomische DNA eingesetzt. Der Mengen-Standard wurde mit 1 µg genomischer DNA aus 293T-Zellen versetzt. Die Amplifikation umfaßte 30 Zyklen. Der GAPDH-Standard entstand unter gleichen Bedingungen. (1. PLB-985, 2. X-CGD PLB-985, 3. MgSLΔS, 4. CMV-gp91^{phox}, 5. CMV-gp91^{phox}-WPRE).

4. 2. 3. Westernblot Analyse der Expression des gp91^{phox}-Proteins

In der Westernblot Analyse sollte untersucht werden, ob die unterschiedliche Anzahl an Kopien integrierter, viraler cDNA (siehe 4. 2. 2.) im Wirtsgenom auch auf Ebene der Expression Auswirkungen zeigt. Für Hinweise auf die Expressionsstärke wurden von transduzierten Zellen sowie den entsprechenden Kontrollen nach sechs Tagen Differenzierungskultur Lysate hergestellt (siehe 3. 2. 8. 4.). Dafür wurden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen verwendet, die aus einer Population ausdifferenzierter Zellen stammten, mit der sowohl der Westernblot als auch die FACS-Analyse und die funktionellen Assays durchgeführt wurden. Die Gesamtmenge an Protein wurde in einem Bradford-Test (siehe 3. 8. 2. 4.) bestimmt. Auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurden dann 40 μg Gesamtprotein pro Probe aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran gebロットet (3. 8. 2. 4.). Für den immunologischen Nachweis (3. 8. 2. 4.) wurde ein 1:1000 verdünnter monoklonaler Antikörper gegen humanes gp91^{phox} verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Görlach, Universitätsklinik Frankfurt).

Im Westernblot konnte für die X-CGD PLB-985-Zellen erwartungsgemäß keine Expression der gp91^{phox}-Untereinheit nachgewiesen werden (siehe Abb. 4-31 Spur 1). Bei den PLB-985 Wildtyp-Zellen hingegen konnte der für den verwendeten Antikörper charakteristische diffuse Bande über einen Bereich von etwa 75 bis etwa 91 kDa (Roos et al., 1996) sowie eine Bande des Proteins um 56 kDa (A. Görlach, persönliche Mitteilung) detektiert werden (siehe Abb. 4-31 Spur 2). Die MgSLΔS transduzierten Zellen zeigten insgesamt schwächere Banden (siehe Abb. 4-31 Spur 3) als die Wildtyp-Zellen. Das stärkste Signal wurde bei den lentiviral transduzierten Zellen erhalten (siehe Abb. 4-31 Spur 4 und 5). Die Intensität des Signals war hier um ein vielfaches stärker als die der Wildtyp-Zellen. Die Bande um 56 kDa zeigte bei dem WPRE-Konstrukt die geringste Intensität (Abb. 4-31 Spur 5).

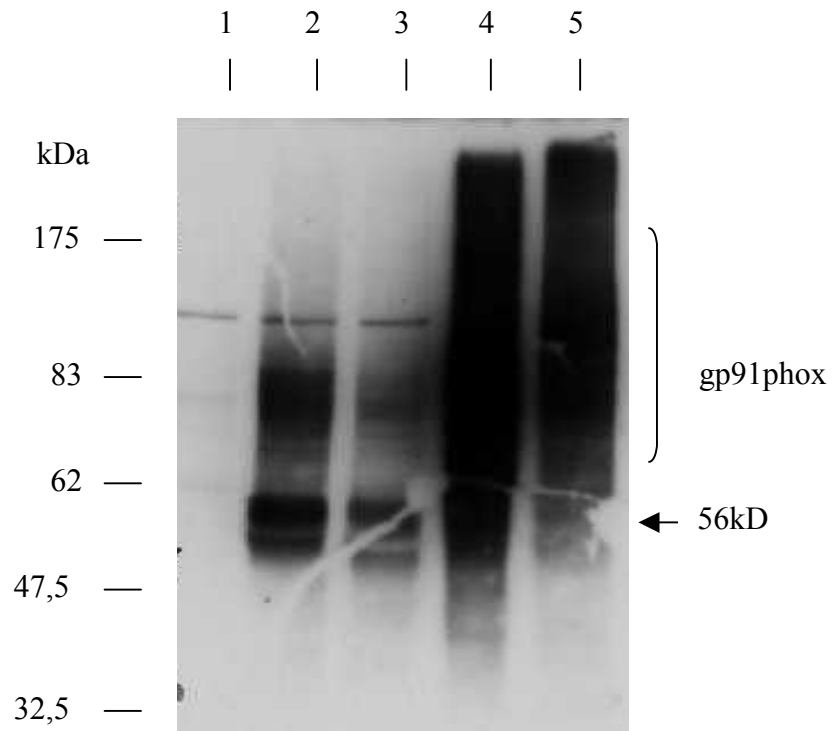


Abb. 4-31: Westernblot der transduzierten Zellen, sowie der X-CGD PLB-985 (Negativkontrolle) und der PLB-985 Wildtyp-Zellen (Positivkontrolle). Aufgetragen wurde eine Menge von 40 μg Protein pro Spur. Die Proteinmenge wurde in einem Bradford-Test bestimmt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem 1:1000 verdünnten monoklonalen Antikörper (etwa 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (1. X-CGD PLB-985, 2. PLB-985 Wildtypzellen; X-CGD PLB-985 transduziert mit 3. MgSLAS, 4. CMV-gp91^{phox}, 5. CMV-gp91^{phox}-WPRE).

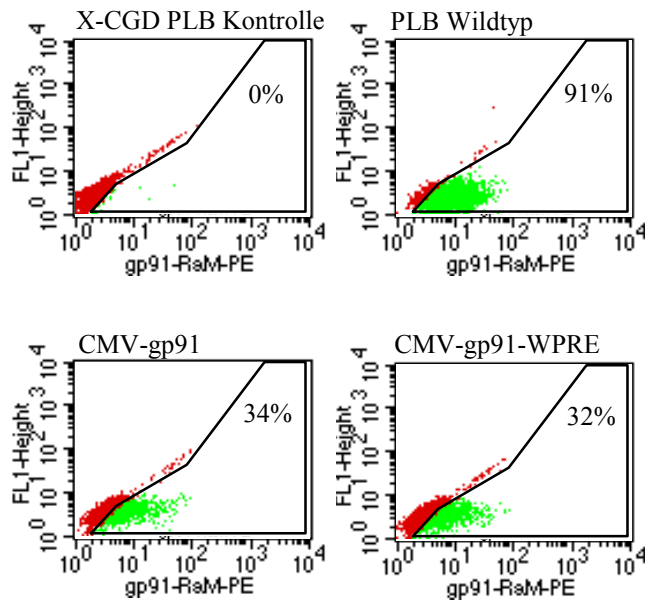
4. 2. 4. Analyse der Expression mittels FACS

Um die in den molekularbiologischen Untersuchungen erhaltenen Daten genauer zu charakterisieren, wurde der Anteil an gp91^{phox} exprimierenden Zellen durch FACS-Analyse ermittelt. Zwei unabhängig voneinander generierte Populationen von transduzierten Zellen wurden zunächst für fünf Tage ausdifferenziert. Dabei wurden in einem Experiment X-CGD-PLB Zellen mit Virusüberstand behandelt, der zum einen mit pSIN2-CMV-gp91^{phox} und zum anderen mit pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE als Transgenvektor generiert wurde (Transduktion A). In einem zweiten, unabhängigen Experiment wurde neben den oben beschriebenen lentiviralen Virusüberstand auch retroviraler Virusüberstand für die Infektionen der X-CGD Modellzelllinie verwendet (Transduktion B). Mit den ausdifferenzierten Populationen der Transduktion A und B wurden dann die Lysate für den Westernblot (siehe 4. 2. 3.) hergestellt und die FACS-Analyse sowie die funktionellen Assays durchgeführt. Für die durchflußzytometrische Messung wurden die Zellen zunächst mit Maus-Antikörper markiert, der gegen ein Epitop im extrazellulären Bereich der gp91^{phox} Untereinheit gerichtet ist (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Nemet, Ungarn). Als Zweitantikörper wurde ein PE-konjugierter Ratte-Anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Markierung erfolgte wie unter 3. 2. 6. 2. beschrieben.

Die FACS-Analyse der Zellen aus Transduktion A ergab, daß 34 % der mit pSIN2-CMV-gp91^{phox} und 32 % der mit pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE infizierten Zellen gp91^{phox} exprimierten. Für die X-CGD PLB-985-Zellen konnte keine Expression nachgewiesen werden. Die PLB-985 Wildtyp-Zellen zeigten 91 % Expression der NADPH-Oxidase Untereinheit. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-32 graphisch dargestellt.

In der Negativkontrolle (nicht transduzierte X-CGD PLB) von Transduktion B konnte keine Expression von gp91^{phox} detektiert werden. Im Gegensatz dazu exprimierten 68 % der Zellen der Positivkontrolle (PLB-985 Wildtyp-Zellen) gp91^{phox}. Für die transduzierten X-CGD PLB-985-Zellen wurden unterschiedliche Expressionsraten gemessen. So exprimierten 30 % der retroviral transduzierten (MgSLAS) Zellen gp91^{phox}, wohingegen 20 % (CMV-gp91^{phox}) beziehungsweise 14 % (CMV-gp91^{phox}-WPRE) der mit lentiviralem Überstand behandelten Zellen die Expression des Transgens zeigten. In Abbildung 4-32 sind die Ergebnisse als Dot-Blot Graphik dargestellt. Dabei wurden wie bei Transduktion A die Fluoreszenzintensitäten des ersten (FL1) und des zweiten (FL2) Meßkanals gegeneinander aufgetragen.

Transduktion A



Transduktion B

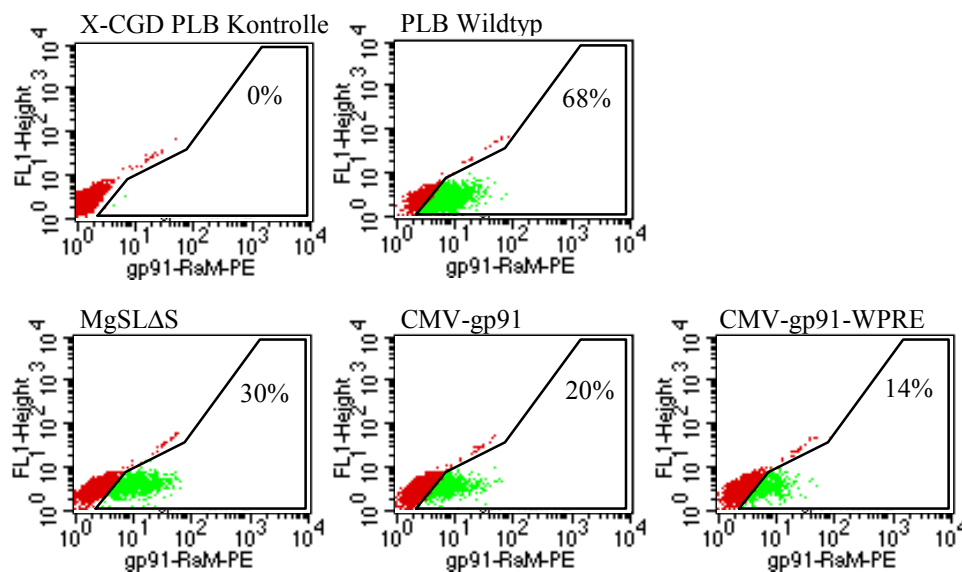


Abb. 4-32: FACS-Analyse der gp91^{phox}-exprimierenden Zellen der Transduktionen A und B. Die X-CGD PLB-985-Zellen wurden mit Überständen infiziert, die mit unterschiedlichen Transgenvektoren generiert wurden. Nach Expansion der transduzierten Zellen wurden diese in Medium mit 0,5 % DMF ausdifferenziert. fünf Tage später wurde die FACS-Markierung angesetzt.

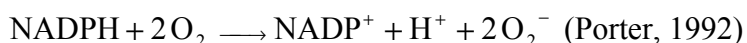
4. 2. 5. Funktionelle Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität

Mit Hilfe der X-CGD PLB-985 Modellzelllinie (Zhen et al., 1993) sollte die Rekonstitutionsfähigkeit der NADPH-Oxidase nach Transduktion eines intakten gp91^{phox}-Gens in Zellen dieser Zelllinie getestet werden. Dazu wurden unterschiedliche virale Konstrukte verwendet (siehe 4. 2. 1.). Nach erfolgter Transduktion mußten die Zellen zu Granulozyten ausdifferenziert werden. Dann konnte die funktionelle Rekonstitution des Enzymkomplexes nach Stimulation mit PMA durch Nachweis von Sauerstoffradikalbildung verfolgt werden.

Für die Rekonstitutionsversuche wurden jeweils 10^5 X-CGD PLB-985- Zellen mit 20fach konzentriertem Virusüberstand und 4 µg/ml Protaminsulfat transduziert. Hierbei dienten die nicht transduzierten X-CGD PLB-985 als Negativ- und die PLB-985 Wildtyp-Zellen als Positivkontrolle. Dafür wurden die Transduktionsansätze zunächst zentrifugiert (90 min., 1215 x g, 32 °C) und anschließend für 2,5 Stunden beziehungsweise über Nacht inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen expandiert und für den Assay eine entsprechende Zellzahl durch Gabe von 0,5 % DMF zur Differenzierung gebracht. Mit den ausdifferenzierten Zellen konnten neben den molekularbiologischen Untersuchungen auch die funktionellen Analysen durchgeführt werden.

4. 2. 5. 1. Chemilumineszenz-Assay der lentiviral transduzierten Modellzelllinie

Die NADPH-Oxidase als ein Multi-Komponenten System ist in der Lage, molekularen Sauerstoff in das freie Superoxid-Anion Radikal O_2^- umzusetzen, gemäß der Gleichung:



Phagozytierende Zellen erkennen und antworten auf eine ganze Reihe von Stimuli einschließlich opsonisierter Mikroorganismen, chemotaktischer Peptide, Immunkomplexen und ungesättigter Fettsäuren (Mayo, 1990). Werden die Zellen beispielsweise mit PMA stimuliert, kommt es zur Bildung der Sauerstoffradikale, die mit zugesetztem Luminol reagieren. Die in dieser Reaktion frei werdende Energie wird in Form von Chemilumineszenz abgegeben, die mit einem Luminometer gemessen werden kann. Diese Methode ist sensitiver als vergleichsweise die Umsetzung von Zytochrom *c*.

Der Test wurde, wie unter 3. 2. 8. 1. beschrieben mit den Zellpopulationen der Transduktionen A und B (siehe 4. 2. 4.) durchgeführt. Die Proben der Transduktion A wurden in einer Vierfach-, die Proben der Transduktion B in einer Doppelbestimmung gemessen. Eingesetzt wurden PLB-985 Wildtyp-Zellen als Positivkontrolle, untransduzierte X-CGD PLB-985-Zellen als Negativkontrolle sowie mit pSIN2-CMV-gp91^{phox} Vektor und pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE Vektor transduzierte Zellen. Außerdem wurden die Zellen untersucht, die in Transduktion B mit dem retroviralen Konstrukt MgSLΔS transduziert wurden.

Die nicht transduzierten X-CGD PLB-985-Zellen zeigten in der Untersuchung der Zellen der Transduktion A keine NADPH-Oxidase Aktivität. Der für PLB-985 Wildtyp-Zellen gemessene Maximalwert an relativen Lichteinheiten (RLU) der Chemilumineszenzreaktion wurde für die Berechnung der relativen Enzymaktivität gleich 100 % gesetzt. Für die mit pSIN2-CMV-gp91^{phox} transduzierten Zellen konnte eine Aktivität von 81 % der Wildtypzellen gemessen werden. Die Zellpopulation, die mit dem pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE Konstrukt transduziert wurde, erreichte 94 % der Aktivität der Wildtyp-Zellen. Die Werte dieser Untersuchung sind in Tabelle 4-10 zusammengefaßt.

Auch in der Messung der Proben von Transduktion B konnte keine Aktivität des Multienzymkomplexes für X-CGD PLB-985 Zellen beobachtet werden. Bei der Messung der mit pSIN2-CMV-gp91^{phox} transduzierten Zellen konnte eine relative NADPH-Oxidase Aktivität von 67 % gemessen werden. Die mit MgSLΔS infizierten Zellen erreichten 75 % der Aktivität der Wildtyp-Zellen. Die beste Rekonstitution erreichten die Zellen mit dem pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE Konstrukt. Hier konnte eine relative Aktivität von 89 % beobachtet werden. Die Ergebnisse des Chemilumineszenz Assays sind in Tabelle 4-11 aufgeführt.

Vergleicht man die beiden unabhängig voneinander durchgeführten Transduktionen, so erhält man in den luminometrischen Messungen für die jeweilige Probe (PLB-985 wt, pSIN2-CMV-gp91^{phox}, pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE) sehr ähnliche Werte. Auch die aus der maximalen Chemilumineszenz errechneten relativen Aktivitäten zeigen nur geringe Abweichung, die im Rahmen der Ungenauigkeit der Meßmethode liegen.

Tab. 4-10: NADPH-Oxidase Aktivität der Zellen von Transduktion A. Die Zellen wurden nach Infektion expandiert und anschließend für 5 Tage in Medium mit 0,5 % DMF ausdifferenziert. Die in Prozent angegebene relative Aktivität des Enzyms bezieht sich auf den jeweils höchsten gemessenen Wert der Chemilumineszenz. Der erreichte Maximalwert ist der Mittelwert der vierfachen Bestimmung und ist zusammen mit seiner Standardabweichung angegeben.

Zelllinie	Erreichter Maximalwert [RLU]	Relative NADPH-Oxidase Aktivität [%]
PLB-985 wt	102.639 ± 27.625	100
pSIN2-CMV-gp91 ^{phox}	82.926 ± 17.890	81
pSIN2-CMV-gp91 ^{phox} -WPRES	96.654 ± 7.827	94

Tab. 4-11: Die Oxidase Aktivität von Zellen der Transduktion B. Die Zellpopulationen wurden nach Expansion in einer ausreichenden Zellzahl für fünf Tage unter 0,5 % DMF ausdifferenziert. Die relative Aktivität bezieht sich auf den erreichten Maximalwert der Chemilumineszenz. Hier aufgeführt ist der Mittelwert der Doppelbestimmungen, sowie die Standardabweichung als Fehler.

Zelllinie	Erreichter Maximalwert [RLU]	Relative NADPH-Oxidase Aktivität [%]
PLB-985 wt	128.440 ± 650	100
MgSLAS	96.250 ± 224	75
pSIN2-CMV-gp91 ^{phox}	85.990 ± 9.196	67
pSIN2-CMV-gp91 ^{phox} -WPRES	114.068 ± 20.749	89

Die graphische Darstellung der Kinetik der Transduktion A in Abbildung 4-33 zeigt, daß die Wildtyp-Zellen und die pSIN2-CMV-gp91^{phox} transduzierten Zellen ihren Maximalwert der Chemilumineszenz nach etwa vier Minuten erreichten, während die Zellen, die mit dem pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRES Konstrukt infiziert waren, rund fünf Minuten brauchten, um ihr Maximum zu erreichen. Nach etwa 12 Minuten war die Aktivitäten aller Proben auf ≤ 50 % des Maximalwertes gesunken. Danach sanken die Werte langsamer, erreichten jedoch bis zum Schluß der Messung nach 25 Minuten nicht mehr die Ausgangswerte zum Zeitpunkt 0, unmittelbar nach Stimulation mit PMA.

In der kinetischen Messung der Transduktion B (siehe Abb. 4-34) erreichten die PLB-985 Wildtyp-Zellen ihr Maximum nach etwa fünf Minuten. Die mit dem WPRES-Konstrukt

transduzierten Zellen benötigten die gleiche Zeit. Die beiden anderen Zellpopulationen, mit MgSL Δ S und mit pSIN2-CMV-gp91^{phox}, brauchten mehr als sechs Minuten, bis sie ihren Maximalwert der Chemilumineszenz und somit den maximalen Substratumsatz erreichten. Alle Proben erreichten nach etwa 15 Minuten ein Minimum, wobei nur noch Aktivitäten von $\leq 46\%$ gemessen wurden. Danach stieg die Chemilumineszenz wieder geringfügig an, zeigte jedoch bei Beenden der Messung nach 25 Minuten wieder eine sinkende Tendenz.

Der Vergleich der Kinetiken beider Messungen zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf. Der Zeitpunkt, an dem das Maximum erreicht wurde unterscheidet sich nicht wesentlich voneinander. Bei der Messung der Zellen von Transduktion B wurde ein Minimum nach 15 Minuten erreicht, welches bei der Messung der Proben von Versuch A nicht deutlich ausgeprägt war. Der Bereich, um den die Werte nach etwa 12–15 Minuten bis zum Ende der Messung schwankten, war jedoch in beiden Fällen in etwa gleich.

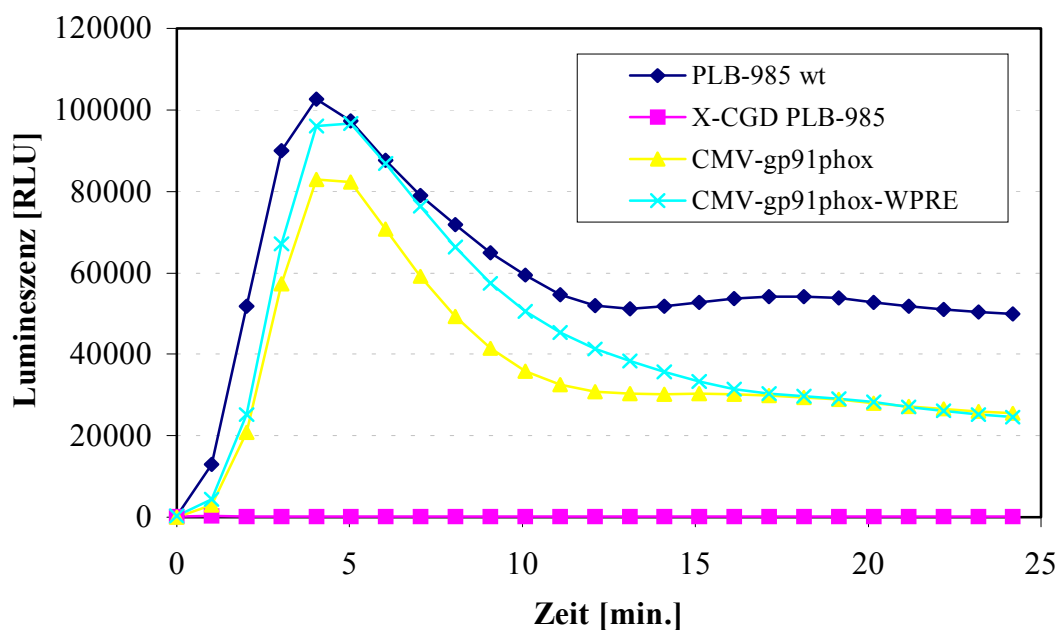


Abb. 4-33: Kinetik der Superoxidproduktion der Zellen der Transduktion A nach sechs Tagen Differenzierungskultur. Nicht transduzierte X-CGD PLB-985 Zellen dienen als Negativkontrolle beziehungsweise PLB-985 Wildtyp-Zellen (PLB-985 wt) als Positivkontrolle. Die Aufnahme der Kinetik begann unmittelbar nach Zugabe von PMA.

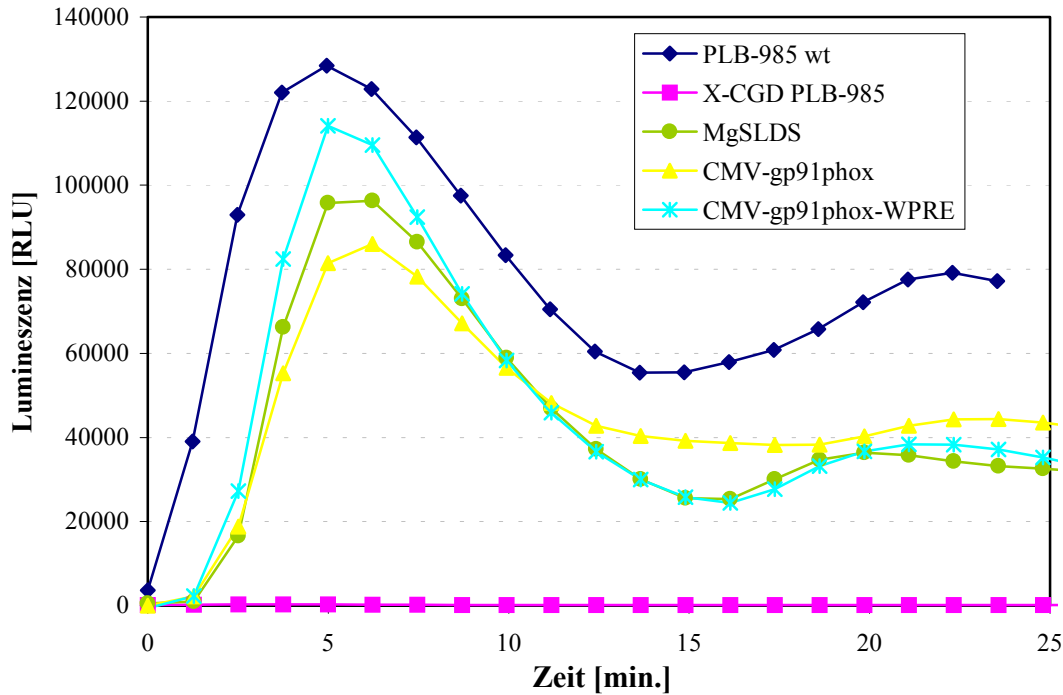
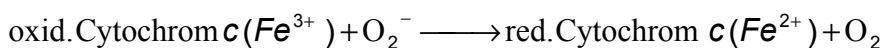


Abb. 4-34: Darstellung der Kinetiken der PMA induzierten Superoxid-Produktion der transduzierten X-CGD PLB-985-Zellen des Versuches B, im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrolle beziehungsweise nicht transduzierten Zellen als Negativkontrolle. Die Messung erfolgte fünf Tage nach Differenzierung in DMF-haltigen Medium.

4. 2. 5. 2. Untersuchung transduzierter Zellen im Zytochrom *c*-Assay

Einer der üblichen Assays, bei denen die Bildung von O_2^- quantitativ erfaßt wird, ist der Zytochrom *c*-Assay (Mayo und Curnutte, 1990). Grundlage dieses Tests ist die Umsetzung von Ferro-Zytochrom *c*, welches durch die gebildeten Radikale zu Ferri-Zytochrom *c* reduziert wird.



(Mayo und Curnutte, 1990)

Diese Reaktion kann bei 550 nm spektralphotometrisch mit einem ELISA-Reader verfolgt werden. Mit dieser Methode erhält man eine Aussage über die Geschwindigkeit und die kumulativ gebildete Menge an Superoxid-Radikalen bis zum quantitativen Umsatz des Substrates (Mayo und Curnutte, 1990).

Der Versuch wurde, wie unter 3. 2. 8. 2. beschrieben, als Vierfachbestimmung für Transduktion A und als Doppelbestimmung für Transduktion B (siehe 4. 2. 4.) durchgeführt und die Rekonstitutionsrate als relative NADPH-Oxidase Aktivität durch den V_{\max} -Wert ermittelt. Dieser Wert stellt die höchste Geschwindigkeit des Substratumsatzes im Reaktionsansatz durch die gebildeten Superoxid Radikale zwischen einer definierten Anzahl von Meßpunkten dar. Dabei ist maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) proportional zur vorhandenen Enzymmenge. Der Wert V_{\max} entspricht der größten Steigung einer Auftragung der Änderung der Menge an gebildetem O_2^- gegen die Zeit. Hierbei wurden bei der Berechnung jeweils sechs Meßpunkte berücksichtigt. Mit der Annahme, daß reduziertes Zytochrom *c* und die produzierte Menge O_2^- in einem äquimolaren Verhältnis zueinander stehen, errechnet sich die Menge an gebildetem O_2^- aus der Absorption des letzten Meßpunktes dividiert durch die Steigung einer Eichgerade. Für diese Standardkurve werden über einen Bereich von 20 bis 120 μM unterschiedliche Konzentrationen an Zytochrom *c* eingesetzt, quantitativ mit Peroxidase umgesetzt und die Absorption bei 550 nm gemessen.

Um die Fähigkeit der Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität in den transduzierten Zellen zu testen, wurden die Zellen für sechs Tage in Gegenwart von 0,5 % DMF kultiviert. Die so zu Granulozyten differenzierten Zellen wurden dann mit einer Zellzahl von 10^6 Zellen/Ansatz in einer Vierfach- beziehungsweise Doppelbestimmung im Zytochrom *c*-Assay eingesetzt. Parallel dazu wurden auch PLB-985 Wildtyp-Zellen als Positiv- und X-CGD PLB-985 als Negativkontrolle ausdifferenziert und im Assay untersucht.

Die Probenauswertung der Messung von Transduktion A zeigte, daß die mit pSIN2-CMV-gp91^{phox} transduzierten Zellen 49 % der NADPH-Oxidase Aktivität in Relation zu PLB-985 Wildtyp-Zellen erreichten. Die mit pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE transduzierten Zellen konnten 74 % der Aktivität von Wildtyp-Zellen rekonstituieren. Sowohl die PLB-985 Wildtyp-Zellen als auch die Zellen mit WPRE-Sequenz zeigten nach 25 Minuten keine weitere Steigerung der kumulativen O_2^- -Produktion. Die Zellen, die mit dem Konstrukt einer Kassette aus internem Promotor und Transgen transduziert wurden, konnten nur 79 % des zugesetzten Zytochrom *c* reduzieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-12 aufgeführt.

In der Messung von Transduktion B wurde die geringste Rekonstitution von 43 % der Aktivität in Relation zu Wildtyp-Zellen bei den retroviral transduzierten Zellen beobachtet. Die lentiviral infizierten Zellen erreichten 77 % (pSIN2-CMV-gp91^{phox}) und 84 %

(pSIN2CMV-gp91phox-WPRE) der NADPH-Oxidase Aktivität von PLB-985 Zellen. Alle im Test verwendeten Zellen, ausgenommen der Negativkontrolle, konnten 95 – 99 % des im Reaktionsansatzes vorhandenen Zytochrom *c* umsetzen. Die Daten sind in Tabelle 4-13 zusammengefaßt.

Beim Vergleich der beiden Messungen fällt auf, daß bei den Zellen der Transduktion B annähernd doppelt so hohe V_{max} -Werte gemessen wurden, als bei Transduktion A. Auch die relativen Aktivitäten des Enzymkomplexes lagen in diesem Versuch höher. Hier wurde eine 10 – 28 % höhere Umsatzrate für das rekonstituierte Enzym beobachtet. Außerdem war auch die Menge an kumulativ produzierten Sauerstoffradikalen auf die gesamte Messung betrachtet beim zweiten Versuch höher.

Tab. 4-12: Vergleich von V_{max} , kumulativ produzierter Menge O_2^- und der relativen Aktivität der NADPH-Oxidase (bezogen auf V_{max}) nach Ausdifferenzierung der transduzierten X-CGD PLB-985-Zellen für fünf Tage. Die Werte wurden für Zellen der Transduktion A gemessen. Die Werte wurden aus den Mittelwerten einer Vierfach-Bestimmung berechnet.

Zelllinie	V_{max} [$\mu\text{mol } O_2^-/\text{min.}/10^6\text{Zellen}$]	kum. O_2^- -Produktion [$\mu\text{mol } O_2^-/25\text{min.}/10^6\text{Zellen}$]	Rel. Aktivität [%]
PLB-985 wt	8,1 ± 0,1	76,9 ± 8,6	100
pSIN2-CMV-gp91 ^{phox}	4,0 ± 0,1	60,9 ± 3,0	49
pSIN2-CMV-gp91 ^{phox} -WPRE	6,0 ± 0,1	77,1 ± 8,8	74

Tab. 4-13: Vergleich der Daten von Transduktion B aus der Messung der Zytochrom *c* Reduktion von retroviral und lentiviral transduzierten Zellen mit Wildtyp-Zellen. Die Zellen wurden vor dem Test fünf Tage unter 0,5 % DMF gehalten. Die relative Aktivität leitet sich aus V_{max} ab. Die Werte wurden aus den Mittelwerten einer Doppelbestimmung berechnet.

Zelllinie	V_{max} [$\text{nmol } O_2^-/\text{min.}/10^6\text{Zellen}$]	kum. O_2^- -Produktion [$\text{nmol } O_2^-/25\text{min.}/10^6\text{Zellen}$]	Rel. Aktivität [%]
PLB-985 wt	14,5 ± 0,1	94,1 ± 2,1	100
pMgSLAS	6,3 ± 0,1	89,2 ± 4,1	43
pSIN2-CMV-gp91 ^{phox}	11,1 ± 0,2	94,0 ± 0,4	77
pSIN2-CMV-gp91 ^{phox} -WPRE	12,2 ± 0,2	89,2 ± 3,7	84

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Reaktion von Transduktion A (siehe Abb. 4-35), so wurde bei dieser Messung ein geringeres Rekonstitutionsvermögen des pSIN2-CMV-gp91^{phox} Konstruktes beobachtet. Der lentivirale Vektor mit WPRE-Sequenz zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Wildtyp-Zellen, jedoch erfolgten die Anstiege der Kurve zu späteren Zeitpunkten. So erreichte die Positivkontrolle nach etwa zehn Minuten erst ihre maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}). Die lentiviral transduzierten Zellen benötigten elf beziehungsweise zwölf Minuten bis sie diesen Punkt erreichten. Bis das gesamte, im Ansatz befindliche Zytochrom *c* umgesetzt war, vergingen rund 24 Minuten. Die Zellen, die mit dem Vektor ohne WPRE transduziert wurden, konnten bis zum Ende der Messung nicht das gesamte Substrat umsetzen.

Im Assay der Transduktion B zeigten die lentiviral transduzierten Zellen einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Wildtyp PLB-985-Zellen (siehe Abb. 4-36). In dieser Messung verliefen die Kurven der beiden Konstrukte fast identisch, wobei das Konstrukt mit dem WPR-Element eine steilere Kurve und somit auch die höheren Umsatzgeschwindigkeiten aufwies. Die retroviral transduzierten Zellen zeigten einen sehr langsamen Anstieg und benötigten 25 Minuten um 95 % des Substrates umzusetzen. Die lentiviralen Konstrukte brauchten dafür nur dreizehn Minuten und die Positivkontrolle nur zehn Minuten.

Der Vergleich beider Untersuchungen zeigt, daß der zweite Assay (Transduktion B) wesentlich effizienter in Bezug auf die Reaktionsgeschwindigkeit war und damit der Zeitraum bis zum Erreichen des Maximums kürzer war. Ausnahme bildeten hier nur die retroviral transduzierten Zellen. In der zweiten Bestimmung vergingen für alle Proben betrachtet, rund sieben Minuten bis zum Erreichen von V_{\max} , während im ersten Test bis zu diesem Zeitpunkt rund elf Minuten vergingen.

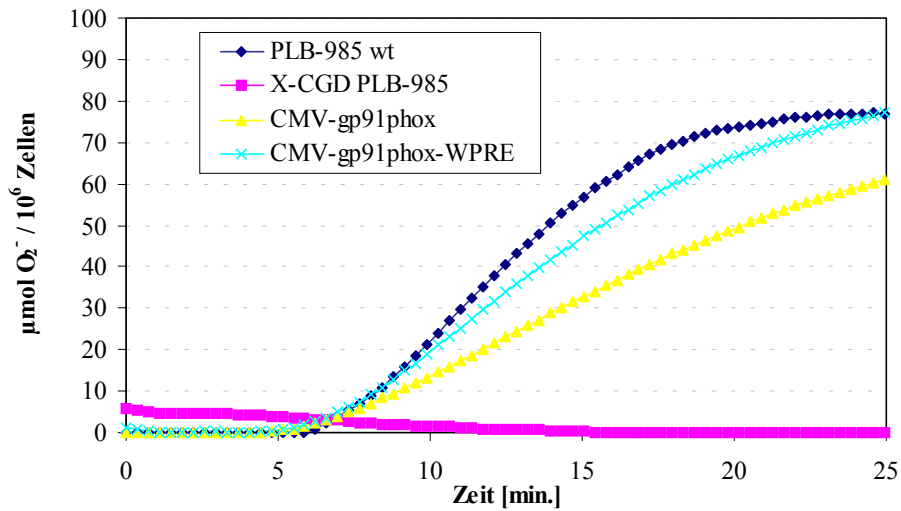


Abb. 4-35: Vergleich der Kinetik der PMA induzierten Superoxid-Produktion bei PLB-985-Zellen sowie nicht-transduzierten und transduzierten X-CGD PLB-985-Zellen im Zytocrom c-Assay nach fünf Tagen Differenzierungskultur. Der Assay wurde als Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Hier dargestellt sind die Werte der Transduktion A.

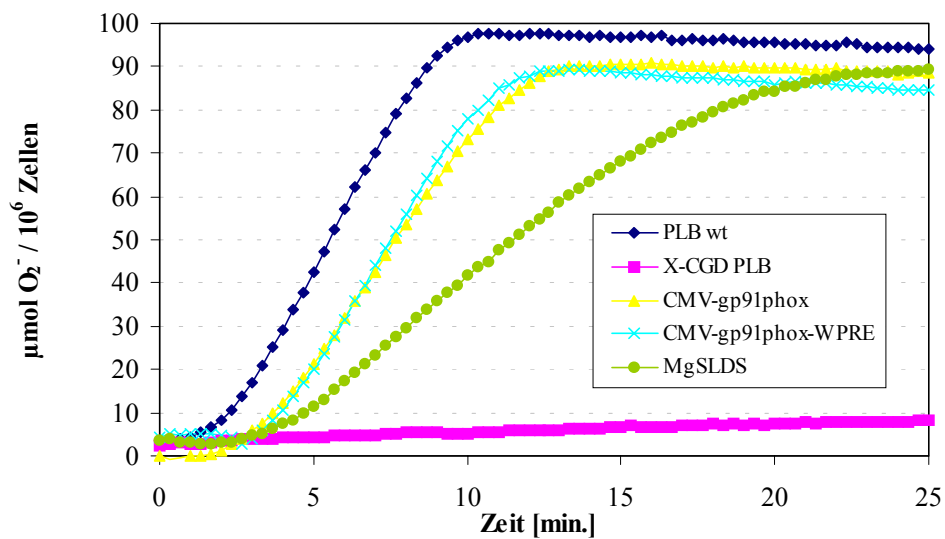


Abb. 4-36: Kinetik der Superoxid-Produktion der unterschiedlich transduzierten X-CGD PLB-985 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Transduktion B). Die Zellen wurden fünf Tage mit 0,5 % DMF nausdifferenziert. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung.

5. Diskussion

Die Gentherapie eröffnet neue Möglichkeiten, genetisch bedingte, angeborene oder erworbene Krankheiten zu therapieren. In den letzten Jahren wurden verschiedene Gentransfer-Systeme entwickelt, die jedoch häufig bestimmte Kriterien nicht erfüllen. Nicht virale Methoden erwiesen sich als ineffizient und bieten nur eine transiente Expression. Adenovirale Vektoren erlauben zwar einen effizienten Gentransfer, aber auch bei diesem System ist die Produktion von intaktem Protein nur transient möglich, da dieser Vektor-Typ nicht in das Wirtsgenom integriert wird. Darüber hinaus können immunologische Reaktionen auftreten, weil geringe Mengen an viralen Proteinen exprimiert werden. Vektoren, die auf Basis eines Onkoretrovirus entwickelt wurden, wie zum Beispiel dem MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), integrieren das Transgen in das Genom der Zielzellen ohne virale Gene mit zu übertragen. Diese Eigenschaften sind für eine fortdauernde Expression des Transgens unabdingbar. Jedoch wurde für diese Vektoren häufig auch ein Abschalten des übertragenen Gens nach Reimplantation *in vivo* beobachtet. Außerdem ist eine effiziente Integration des Transgens mit onkoretroviralen Vektoren nur möglich, wenn die Zielzellen sich innerhalb weniger Stunden teilen. Deshalb ist ihre Anwendung bei ruhenden beziehungsweise nicht-teilenden Zellen wie Leberzellen, Muskelzellen, Neuronen und hämatopoetischen Stammzellen nicht möglich.

Lentiviren gehören wie Onkoretroviren zur Familie der Retroviren. Deshalb besitzen Vektoren, die sich aus Lentiviren ableiten die gleichen Eigenschaften. Sie können stabil in das Genom der Zielzelle integrieren und so eine langfristige Expression des Transgens bewirken. Die Integration des Provirus in das Genom der Zielzelle birgt die Gefahr einer Insertionsmutagenese, die zur Aktivierung eines Onkogens führen kann. Aber auch im Vektor vorhandene Promotoren und regulatorische Sequenzen könnten zur unerwünschten Expression zellulärer Gene führen. Für human-klinische Versuche mit Retroviren wurde dies bisher nicht beschrieben. Bunting et al. (1998) berichteten jedoch über Mäuse, die nach Behandlung mit *ex vivo* expandierten humanen transduzierten Stammzellen ein myeloproliferatives Syndrom zeigten. Dies führten sie jedoch nicht auf den retroviralen Vektor oder eine Insertionsmutagenese zurück, sondern auf die Expression des Transgens MDR-1 im Zusammenhang mit der *ex vivo* Expansion der Stammzellen. Da lentivirale Vektoren keine viralen Gene mehr enthalten, wird die Gefahr einer immunologischen Reaktion durch Expression viraler Proteine reduziert. Der Transfer des Vektors in die Zielzelle kann jedoch immunogen wirken. Die lentiviralen Vektoren verfügen darüber hinaus

über eine große Klonierungskapazität, die für die meisten klinischen Anwendungen ausreichend ist. Lentivirale Vektoren besitzen im Gegensatz zu onkoretroviralen Vektoren jedoch einen großen Vorteil: sie können nicht-teilende Zellen transduzieren. Das macht diese Vektoren besonders attraktiv für genetische Modifikationen von Geweben wie Hirn, Muskel, Leber, Lunge und das hämatopoetische System.

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften wurde in den letzten Jahren sehr intensiv an der Entwicklung lentiviraler Vektorsysteme gearbeitet. Ziel war es, Viruspartikel zu produzieren, die einen effizienten Gentransfer und eine lang andauernde, wenn nicht gar lebenslange Expression des Transgens gewährleisten. Andererseits müssen die Vektoren und die Virusproduktion als solche eine größtmögliche Sicherheit in Bezug auf Pathologie und Immunologie bieten, um den stringenten Bedingungen für eine klinische Anwendung zu genügen. Die Gefahr replikationskompetente Viren während der Produktion durch Rekombination zu generieren, wurde durch Einführung des 3-Plasmid-Expressionssystems reduziert. Eine der jüngsten Generationen von Vektoren umfaßt vier Plasmide. Das Verpackungskonstrukt enthält alle Strukturgene, die für die effiziente Produktion und Integration des Virus notwendig sind. In weiter entwickelten Versionen blieben die Gene *gag* und *pol* im Verpackungskonstrukt enthalten, das Gen für das regulatorisch wirkende *rev* wurde in ein separates Plasmid integriert (Dull et al., 1998). Die viralen Partikel sind pseudotypisiert mit Hüllproteinen anderer Viren. In den meisten Fällen wird hierfür das Glycoprotein G des Vesikular Stomatitis Virus (VSV-G) verwendet. Der Transgenvektor enthält nur noch die essentiellen *cis*-aktiven Sequenzen und das Transgen, das häufig über einen internen Promotor getrieben wird.

Humane hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind ein wichtiges Ziel für die Gentherapie von angeborenen oder erworbenen genetischen Erkrankungen des Blutsystems. Denn diese Zellen haben die Fähigkeit das gesamte hämatopoetische System zu regenerieren. Das heißt, sie sind nicht nur in der Lage sich selbst zu erneuern, sondern sie können darüber hinaus auch in alle Typen von Blutzellen ausdifferenzieren. Aber auch die Differenzierung in nicht-hämatopoetische Gewebe zeigt die hohe Plastizität von Stammzellen (Mertelsmann, 2000). Die bisher angewandten retroviralen Transduktionsmethoden in klinischen Studien mit hämatopoetischen Zellen hatten bislang eine zu geringe Effizienz, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Kürzlich gelang es jedoch der Arbeitsgruppe um Fischer (2000), SCID-Patienten erfolgreich mit einem retroviralen Vektor zu therapieren. Dies war unter anderem auf die verbesserten Kulturbedingungen zurückzuführen. Ausschlaggebend war jedoch, das

die Transgen-Expression zu einem selektiven Vorteil der transduzierten Zellen führte. Lentiviren haben den Vorteil, daß sie - im Gegensatz zu retroviralen Vektoren - keine Stimulation der Proliferation benötigen, um ruhende Zellen zu transduzieren. Somit kann die mit der Proliferation verbundene Differenzierung, die zum Verlust der Repopulierungsfähigkeit führt, umgangen werden. In den letzten zwei Jahren konnte mehrfach eine erfolgreiche Transduktion von unstimulierten CD34⁺-Zellen mit lentiviralen Vektoren nachgewiesen werden (Sutton et al., 1998; Uchida et al., 1998; Miyoshi et al., 1999; Case et al., 1999; Guenechea et al., 2000; Scherr et al., 2002).

Ein Modell zur Entwicklung einer somatischen *ex vivo* Gentherapie in hämatopoetischen Stammzellen ist die chronische Granulomatose (CGD). Die Krankheit beruht auf der genetisch bedingten Fehlfunktion der NADPH-Oxidase und ist mit wiederkehrenden, schweren und lebenslang auftretenden Infektionen verbunden. Eindringende Mikroorganismen wie Pilze und Bakterien werden aufgenommen, können jedoch in den phagozytierenden Vakuolen nicht abgetötet werden, da keine Sauerstoffradikale, Wasserstoffperoxid oder Folgeprodukte gebildet werden. Die Oxidase ist ein aktivierbarer Enzymkomplex, der Hauptbestandteil des antimikrobiellen Systems der phagozytierenden Zellen (Eosinophile, Neutrophile, Monozyten) ist. In etwa zwei Drittel der Fälle beruht diese Erkrankung auf einem Defekt des X-chromosomalen Gens für die gp91^{phox} Untereinheit (X-CGD). Dieses Protein ist die größere Untereinheit des Flavocytochroms *b*₅₅₈, einem in der Membran eingebetteten Heterodimer, welches das Redoxzentrum der Oxidase bildet. Weil CGD die Zellen des hämatopoetischen Systems betrifft, wurde es exemplarisch zur Entwicklung von Protokollen für den Gentransfer in HSCs ausgewählt.

Basierend auf den Arbeiten zur Optimierung der Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen (Dissertation H. Knoeß, 1999) und der Entwicklung einer somatischen Gentherapie für die x-chromosomal gebundene chronische Granulomatose (Dissertation S. Becker, 1998), wurde in dieser Arbeit die Produktion von lentiviralen Partikeln optimiert, die Fähigkeit CD34⁺-Zellen effizient zu transduzieren getestet und funktionelle Untersuchungen zur Anwendbarkeit dieser Vektoren für eine Gentherapie von X-CGD durchgeführt. Die Diskussion der vorliegenden Arbeit unterteilt sich in folgende Abschnitte:

- Entwicklung eines lentiviralen Gentransfer-Protokolls für CD34⁺-Zellen
- Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität mittels lentiviraler Vektoren in X-CGD PLB-985-Zellen.

5. 1. Entwicklung eines lentiviralen Transduktionsprotokolls für CD34⁺-Zellen

Ausgehend von den Arbeiten von H. Knoeß und A. Schilz (Dissertation H. Knoeß, 1999; Dissertation A. Schilz, 1998, Schilz et al., 1998) sollte ein Transduktionsprotokoll für CD34⁺-Zellen entwickelt werden. Zum einen wurde durch Einsatz von lentiviralen Vektoren die Kulturzeit *ex vivo* bei der Transduktion deutlich verkürzt, um die maximale Repopulierungskapazität der HSCs zu erhalten. Zum anderen sollte so die Transduktionseffizienz verbessert werden. Dafür wurden zunächst bereits entwickelte Vektoren (Zuffrey et al., 1998) modifiziert und anschließend die Methoden zur Generierung und Anreicherung der Viruspartikel optimiert. Nach Austesten von Überständen in Zelllinien wurden die Transduktionsbedingungen für CD34⁺-Zellen untersucht.

5. 1. 1. Konstruktion lentiviraler Vektoren

Die ersten, ursprünglich für Untersuchungen der Infektiosität von HIV-1 benutzten lentiviralen Vektoren (Page et al., 1990; Landau et al., 1991), führten zur Entwicklung von Vehikeln, die zum Gentransfer genutzt wurden (Parolin et al., 1994). Durch die Pseudotypisierung mit dem Glycoprotein G des Vesikular Stomatitis Virus (VSV-G) konnten die lentiviralen Partikel durch Ultrazentrifugation konzentriert und das Wirtsspektrum erweitert werden (Reiser et al., 1996). Die Arbeitsgruppe um Luigi Naldini (Science, 1996) entwickelte ein Expressions-System, das drei Plasmide umfaßt. Das Verpackungskonstrukt enthielt die Gene *gag* und *pol*, sowie die Informationen für essentielle regulatorisch wirksame Proteine. Das Hüllprotein-Plasmid enthielt ein entsprechendes Gen aus MLV (Maus Leukämie Virus) oder VSV-G. Der Transgenvektor umfaßte die essentiellen *cis* aktiven Sequenzen und ein Markergen. Die akzessorischen Proteine *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef* sind für eine effiziente Virusproduktion und Transduktion nicht notwendig (Kim et al., 1998), deshalb wurden diese Sequenzen eliminiert. Auch der Transaktivator *tat* konnte aus dem Verpackungskonstrukt eliminiert werden, nachdem die Promotor/Enhancer-Region (U5) in der 5' LTR des Transgenvektors durch einen konstitutiv aktiven Promotor ersetzt wurde (Dull et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, daß die hauptsächlich an der Polyadenylierung beteiligten Sequenzen stromaufwärts der R-Region liegen (DeZazzo et al., 1991; Valsamakidis et al., 1991, 1992), was zur Entwicklung von selbst-inaktivierenden (SIN) lentiviralen

Vektoren führte (Zuffrey et al., 1998). Eine 400 bp große Deletion in der U3-Region der 3' LTR führt nach reverser Transkription zu einer proviralen DNA, die keine viralen Promotor- oder Enhancersequenzen mehr aufweist. Das bedeutet, daß nach Integration die Transkription nur noch über den internen Promotor initiiert wird.

Da für lentivirale Vektoren gezeigt wurde, daß sie ruhende Zellen transduzieren können und darüber hinaus eine andauernde Expression zeigen (Naldini et al., 1996), wurden in der vorliegenden Arbeit solche Vehikel für die Transduktion von HSCs verwendet. Der pSIN2-CMV-LacZ (R. Zuffrey, Genf) ist ein selbst-inaktivierender Vektor und wurde als Ausgangsvektor verwendet. Für die ersten Experimente wurde zunächst LacZ als Markergen durch GFP ausgetauscht. Der Vorteil von GFP ist, daß es ohne zusätzliche Färbung oder Antikörper-Markierung im Fluoreszenzmikroskop oder im FACS nachweisbar ist. Damit ist die Analyse von Transfektions- und Transduktionseffizienz schneller und einfacher durchzuführen. Im Gegensatz zur LacZ-Färbung, die erst nach der Virusernte durchgeführt werden kann, läßt die Expression von GFP schon während der Virusproduktion Rückschlüsse auf die Transfektionseffizienz zu. Um die Vektoren in Bezug auf biologische Sicherheit und Expression zu verbessern, wurde der pCGWS-Vektor konstruiert. Als Grundlage diente der pRRL-PGK-GFP-SIN Vektor. Bei diesem Vektor wurde die Promoter/Enhancer-Region im U5-Bereich der 5' LTR durch eine vergleichbare Region aus Rous Sarkom Virus ersetzt. Mit der Entfernung der U5-Sequenzen von HIV wurde auch die Erkennungssequenz für den Transaktivator *tat* eliminiert. Der Vektor war somit *tat*-unabhängig, weshalb diese Sequenz im Verpackungskonstrukt ebenfalls eliminiert wurde. Ausgehend von diesem Vektor wurde der pCGWS-Vektor konstruiert, indem zunächst der interne PGK-Promotor gegen einen CMV-Promotor ausgetauscht und zwischen dem Markergen und der 3' LTR die Sequenz des WPRE eingefügt wurde. Der CMV-Promotor wurde eingebaut, um den Titer zu erhöhen. Dull et al. (1998) konnten zeigen, daß ein Vektor mit internem CMV-Promotor mehr RNA-Transkripte in transfizierten und transduzierten Zellen enthielt, als ein Vektor mit dem PGK-Promotor. Ein Überschuß an Vektor-RNA in den partikelproduzierenden Zellen scheint ein limitierender Faktor zu sein. Der quantitative Partikelaustritt variiert mit der Art des Vektors und dem verwendeten internen Promotor (Dull et al., 1998). Soriano et al. (1991) konnten zeigen, daß die Aktivität von verschiedenen internen Promotoren abhängig von der Sequenz und nicht von der transkriptionellen Aktivität einer LTR abhängig ist. Tatsächlich konnte mit dem CMV-Promotor ein erhöhter Titer beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der Einbau der Sequenz für WPRE sollte die Expression des Transgens steigern. Tatsächlich wurde auch

eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität beobachtet. Zuffrey et al. (1999) zeigten, daß diese Steigerung der Expression in Zusammenhang mit einer Akkumulation zellulärer mRNA-Transkripte steht. Außerdem wurde eine geringfügige höhere Stabilität der RNA festgestellt. Nach dem sich das System zur Produktion von viralen Partikeln als effizient erwiesen hatte, wurde dann der pCIGWS-Vektor konstruiert. Hierbei wurde zwischen dem Promotor und dem GFP eine multiple Klonierungsstelle (MCS) und eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) kloniert. Dieser Vektor sollte die Translation eines Transgens und des Gens für GFP von einer bicistronischen mRNA ermöglichen. Der Vektor zeigte mit und ohne Transgen eine starke GFP Expression. Die Ergebnisse zu diesen Experimenten werden im zweiten Abschnitt der Diskussion erläutert. Die Vektoren wurden parallel zur Optimierung der Methoden zur Produktion und Konzentrierung der lentiviralen Partikel konstruiert, und jeweils nach Fertigstellung in diesen Prozeß mit eingebunden.

Die im vorangegangenen Abschnitt diskutierte Entwicklung von lentiviralen Vektoren ist nicht abgeschlossen. Derzeit wird intensiv an weiteren Modifikationen der Vektoren gearbeitet, um eine größere biologische Sicherheit und eine höhere Effizienz zu erzielen. Eine der Gefahren ist die Generierung replikationskompetenter Rekombinanten (RCR), die während der reversen Transkription am wahrscheinlichsten ist und die Verpackung unterschiedlicher RNA-Typen bedingt (Hu und Temin, 1990). Dieses Risiko kann durch Deletion von überlappenden Sequenzen und/oder dem gezielten Einbau von Sequenzen heterologer Lentiviren vermindert werden (Vigna und Naldini, 2000). Neuere Vektoren beinhalten zusätzlich einen Polypurintrakt (cPPT), der eine Erhöhung der Genomintegration in den Zielzellen durch effizientere Translokation in den Kern bewirkt (Vigna und Naldini, 2000). Diese cPPT-Sequenz ist ursprünglich Bestandteil des *pol* Gens und essentiell für die Replikation des Virus (Charneau et al., 1992 und 1994; Ilyinskii und Desrosiers, 1998). Durch die Auswahl geeigneter Promotoren, die Gewebe-spezifisch (Miyoshi et al., 1997) oder aus MLV abgeleitet sind (Kung et al., 2000), kann die Expression zusätzlich erhöht werden. Die Minimierung von Risiken durch Entfernen überlappender Sequenzen und die Nutzung bestimmter *cis* aktiver Sequenzen zur Optimierung der Expression sind Voraussetzungen, um diese Vektoren für gentherapeutische Anwendungen akzeptabel zu machen.

5. 1. 2. Methoden zur Generierung von Virusüberstand mit hohem Titer

Neben der Entwicklung der Vektoren und der Etablierung von Methoden zur Anreicherung von viralen Partikeln, wurden die Transfektionsbedingungen optimiert. Dazu wurden zum einen unterschiedliche Verhältnisse der drei verwendeten Plasmide (siehe Tabelle 4-1) ausgetestet. Die Auswahl der Kombinationen orientierten sich an Angaben in der Literatur (Naldini et al., 1996; Miyoshi et al., 1998; Dull et al., 1998; Zufferey et al., 1998). Die Unterschiede der Titer für die einzelnen Variationen hatten eine Größenordnung, die im Bereich der Abweichungen bei transienter Transfektion liegen. Dennoch können auch andere Ursachen zu Grunde liegen. Bei den Transfektionsansätzen, die nicht mit Natriumbutytrat behandelt wurden, zeigten sich größere Schwankungen im Titer. Hierbei könnten die unterschiedlichen Verhältnisse der drei Plasmide zueinander eine Rolle spielen. So müssen auf der einen Seite genügend RNA-Kopien vorhanden sein, aber auch ausreichend viele Partikel gebildet werden.

Das Hüllprotein-Konstrukt sollte nur in geringen Mengen verwendet werden, da für VSV-G ein zytopathischer Effekt beobachtet wurde, der in Zusammenhang mit einer Destrukturierung des Zytoskeletts (Roberts et al., 1999) steht. Mit der Erhöhung der DNA-Menge an Hüllprotein Plasmid konnte auch in diesem Versuch eine vermehrte Bildung von Synzytien beobachtet werden, die sich negativ auf den Titer auswirkte (eigene Beobachtung auch in anderen Experimenten).

Die Quantität der Expression des Transfervektors scheint ein limitierender Faktor für die Titer von Vektoren zu sein, die durch transiente Transfektion produziert werden (Dull et al., 1998). Farson et al. (2001) führte dies auf die Verhältnisse zwischen Verpackungskonstrukt und Transgenvektor zurück. Bei der Entwicklung einer induzierbaren stabilen virusproduzierenden Zelllinie stellten sie fest, daß die Infektiosität nicht proportional zum Vektorausstoß stieg, wenn die Verpackungszelllinie mehrfach mit Transgenvektor infiziert wurde. Die Arbeitsgruppe um Naldini (Farson et al., 2001) sieht eine mögliche Erklärung in einer verbleibenden Interaktion zwischen dem *Gag* Protein und seiner mRNA bei einem Mangel an RNA mit einem intakten Verpackungssignal. Die RNA-bindende Aktivität von *Gag* ist mitverantwortlich für die Verpackung des viralen Genoms was möglicherweise mit einer effizienteren Translation von *Gag* überlagert ist. Die stufenweise Erhöhung der Menge an Transgenvektor-RNA führt zu einer zunehmenden Verdrängung der RNA des

Verpackungskonstruktes von den Bindeplätzen am *Gag* Protein und führt so zu einer effizienteren Verpackung der Vektorgenome (Farson et al., 2001). In diesem Experiment sind die Verhältnisse der Plasmide nur geringfügig verändert worden. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet, ob durch weitere Erhöhung der Menge an Transgenvektor bei gleichbleibender Menge an Verpackungskonstrukt und Hüllprotein-Plasmid zu einer Titererhöhung führt. Ein Grund dafür war, daß in diesem Experiment Titer erzielt wurden, die mit den durchschnittlichen Angaben in der Literatur übereinstimmten.

Des weiteren konnte nach Behandlung der Transfektionsansätze mit Natriumbutyrat (NaBut) bei vier von fünf Ansätzen eine deutliche Steigerung des Titers beobachtet werden, wobei die Steigerung nicht mit dem Titer der ohne NaBut erreicht wurde, korreliert. So erreichte der Ansatz mit dem geringsten Titer ohne Behandlung im Ansatz mit Butyrat die höchste Steigerung, nämlich um das vierfache. Der Ansatz mit dem höchsten Titer ohne NaBut erzielte mit Aktivierung nur eine Steigerung um das zweifache. Obwohl einiges über die Wirkung von NaBut auf Zellen bekannt ist, sind die molekularen Mechanismen dieser Vorgänge noch weitgehend ungeklärt. NaBut bewirkt zum einen die prozentuale Erhöhung der Expression exogener DNA, was wahrscheinlich durch Einflüsse auf den Zellzyklus verursacht wird (Soneoka et al., 1995). Zum anderen inhibiert diese Substanz die Histon Deacetylase. Was im Zusammenhang steht mit dem Beweis, das eine Anhäufung von hoch acetyliertem Chromatin für eine effiziente Transkription notwendig ist (Sakoda et al., 1999). Darüber hinaus beeinflusst NaBut die Genexpression in Abhängigkeit von Enhancersequenzen und aktiviert eine Anzahl von eukaryotischen Promotoren, unter anderem den CMV-Promotor (Soneoka et al., 1995).

Soneoka et al. (1995) konnte durch die Stimulation mit Natriumbutyrat Steigerungen des Virustiters um das 8- bis 22fache erzielen. Das der Effekt im vorliegenden Versuch nicht so hoch lag, ist vermutlich auf die längere Inkubationszeit in Gegenwart von Natriumbutyrat zurückzuführen. Sakoda et al. (1999) konnten an einem analogen 3-Plasmid System auf 293T-Zellen zeigen, daß die optimale Konzentration von Natriumbutyrat bei 10 mM und die optimale Inkubationsdauer bei acht bis zehn Stunden liegt. In den folgenden Versuchen wurde deshalb die Behandlungsdauer auf acht bis zehn Stunden reduziert.

Im Experiment zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Kulturmedien auf den Titer, wurden für die verwendeten Medien keine großen Unterschiede festgestellt (siehe Abb. 4-5). Die geringfügigen Unterschiede der unterschiedlichen Medien sind eher mit den Schwankungen der transienten Transfektion zu erklären, als mit der unterschiedlichen Medienformulierung. Auffällig war der Abfall des Titers an Tag drei nach Transfektion, der wahrscheinlich durch den zytotoxischen Effekt des exprimierten VSV-Gs und durch das Erreichen eines konfluenten Stadiums der Zellen bedingt wurde. Ein weiterer Grund war, daß Plasmid-DNA, die bis in den Kern vordringt und exprimiert wird, durch Zellteilung und nukleolytischen Abbau verloren geht (Koch-Brandt, 1993).

Die Konzentrierung von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln durch Ultrazentrifugation wurde schon im Zusammenhang mit retroviralen Vektoren beschrieben (Yee et al., 1994). In der Literatur werden die lentiviralen 3-Plasmid Systeme zur Produktion von VSV-G pseudotypisierten Partikeln und deren Konzentrierung durch Ultrazentrifugation am häufigsten beschrieben (bspw.: Sutton et al., 1998; Miyoshi et al., 1999; Case et al., 1999; Douglas et al., 1999). Deshalb wurde diese Methode im Hinblick auf die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen als erstes getestet (siehe 4. 1. 2. 3.). Nach Präparation des Überstandes konnte durch Ultrazentrifugation eine Anreicherung an infektiösen Partikeln um den Faktor der Volumenreduktion beobachtet werden. Auch die damit verbundene Steigerung der Transduktionseffizienz in TF1-Zellen konnte fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 4-6). Die FACS-Analyse ergab eine Steigerung der Transduktionseffizienz, wonach nahezu alle Zellen transduziert wurden (Abb. 4-7). Da VSV-G ein breites Wirtsspektrum aufweist und TF1-Zellen sich mit den so pseudotypisierten Partikeln gut transduzieren ließen, zeigten auch die mit nicht-konzentriertem Überstand behandelten Zellen eine hohe Transduktionseffizienz. Die erzielten Effizienzen bei der Transduktion sind vergleichbar mit den Angaben der Literatur, sind aber auch abhängig vom Zelltyp der transduziert wird (Sutton et al., 1998; Zuffrey et al., 1998; Kafri et al., 1999).

Obwohl die ersten Experimente gute Resultate auf Zelllinien ergaben, konnte eine solche Ausbeute ($\Sigma IU_{\text{vor Konz.}} / \Sigma IU_{\text{nach Konz.}}$; IU- infektiöse Einheiten) nicht reproduzierbar erreicht werden. Bei Transduktionen von hämatopoetischen Stammzellen, die später diskutiert werden, traten Verunreinigungen in den Kulturen auf, die vermutlich aus der Konzentrierung resultierten. Deshalb wurden alternative Reinigungsstrategien getestet, wie die Anreicherung von Viruspartikeln durch Anionenaustauschchromatographie mit Fractoflow®. In vier nacheinander durchgeführten Konzentrierungen konnte mit dieser Methode eine Erhöhung

des Titers erzielt werden. Dabei lag der Faktor der Konzentrierung ($\text{Titer}_{\text{vorKonz.}}/\text{Titer}_{\text{nachKonz.}}$) meist deutlich unter dem Faktor der Volumenreduktion ($\text{Vol.}_{\text{vorKonz.}}/\text{Vol.}_{\text{nachKonz.}}$). Die Ausbeute ($\Sigma \text{IU}_{\text{vor Konz.}}/\Sigma \text{IU}_{\text{nach Konz.}}$) nach der Chromatographie schwankte in einem großen Bereich und sank in allen Versuchen nach Ultrafiltration noch einmal deutlich ab. Die Ultrafiltration ist notwendig, um die Salzkonzentration in der Viruslösung auf einen für Zellen physiologischen Wert zu senken. Der Verlust an infektiösen Partikeln könnte durch eine unspezifische Bindung des Virus an das Säulenmaterial und/oder dem Filtermaterial der Ultrafiltrationseinheit verursacht werden. Ein weiterer möglicher Grund könnte auch ein Verlust an Infektiosität sein, der aus der angewandten Methode resultiert, zum Beispiel aufgrund der chemischen und oder physikalischen Einflüsse während der Konzentrierung. Für eine unspezifische Bindung spricht zum einen der weite Bereich in dem die Ergebnisse schwanken und zum anderen die Beobachtung, daß in Titerbestimmungen zu hohe Titer bestimmt wurden, wenn für die serielle Verdünnung des Virus ein und dieselbe Kunststoff-Pipette verwendet wurde. Eine Steigerung der Transduktionseffizienz auf Zelllinien war fluoreszenzmikroskopisch deutlich zu erkennen. Den Nachteilen dieser Methode, wie dem Verlust an infektiösen Partikeln und der erhöhte apparative Aufwand, stehen eine Reihe von Vorteilen gegenüber. Zum einen ist die Volumen-Kapazität ausbaufähig und zum anderen kann dieses System leichter die stringenten Bedingungen für den klinischen Einsatz erfüllen. In der vorliegenden Arbeit zeigte diese Methode keine mikroskopisch sichtbaren Verunreinigungen in den Kulturen. In der Literatur wurden keine vergleichbaren Ergebnisse gefunden, jedoch ist die chromatographische Anreicherung von Viruspartikeln schon beschrieben worden (Prior et al., 1995, 1996, 1998; Goa et al., 2000). Da auch das in der vorliegenden Arbeit getestete System nicht zu den gewünschten Ergebnissen führte, nämlich die effiziente Transduktion von CD34⁺-Zellen und die reproduzierbare Herstellung eines reinen Virusüberstandes mit hohem Titer, wurden noch weitere Möglichkeiten getestet.

Eine weitere Variante, um Virus anzureichern, ist die Ultrafiltration. Neben Ultrafiltrationseinheiten mit geringer Kapazität (bis 15 ml), die keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten, wurde auch ein System mit höherer Kapazität (60 ml) getestet. Parallel dazu wurde Virusüberstand aus einer Präparation mit nach den im vorigen Abschnitten beschriebenen Methoden (Ultrazentrifugation, Anionenaustauschchromatographie) konzentriert, um die Verfahren miteinander zu vergleichen. Mit der Ultrafiltrationseinheit (JumboSep) konnte keine Erhöhung des Titers erreicht werden, obwohl das Volumen um das 90fache reduziert wurde. Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen mit onkoretroviralen

Überständen (H. Knoeß, persönliche Mitteilung). Im Filtrat der Ultrafiltrationseinheit konnte nur eine geringe Menge an Partikeln nachgewiesen werden. Ein mögliche Ursache für den Verlust an infektiösen Partikeln könnten unspezifische Bindungen an das Filtermaterial und/oder dem Kunststoff der Filtrationseinheit sein, wie sie im vorigen Abschnitt diskutiert wurden. Die Steigerung des Titters der Chromatographie war höher als die durch Ultrazentrifugation, jedoch waren die erzielten Ausbeuten sehr schlecht. Die Verluste an infektiösen Partikeln bei der Ultrazentrifugation ist unter anderem auf den zweiten Zentrifugationsschritt zurückzuführen. Die zweite Zentrifugation wurde durchgeführt, da das Sediment nach der 1. Zentrifugation zur quantitativen Resuspension in einem großen Volumen aufgenommen wurde. Weitere Gründe wurden bereits in den vorigen Abschnitten zu den Methoden diskutiert. In der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung von transduzierten TF1-Zellen war die Chromatographie den anderen Methoden überlegen, da die meisten Zellen eine deutliche GFP Expression zeigten (Abb. 4-10). Die Zellen, die mit resuspendierten Partikeln nach Ultrazentrifugation transduziert wurden, zeigten dagegen eine deutlich schwächere GFP Expression (Abb. 4-10). In diesem Vergleich der Methoden konnten durch Fractoflow® die besten Resultate erzielt werden. Die Ultrazentrifugation lieferte im Vergleich dazu nur mäßige Erfolge. Die Anreicherung von Viruspartikeln mittels Ultrafiltration (JumboSep) erwies sich für dieses Vektorsystem als ungeeignet, da keine Anreicherung von Virus erzielt werden konnte. Die Gründe hierfür sind nicht näher untersucht worden, da diese Methode nicht uneingeschränkt für klinische Zwecke erweiterbar ist. Für Versuche mit bis zu 60 ml Virusüberstand ist diese Methode eine Alternative, sofern sie für das gewählte Vektorsystem funktioniert. Nachteilig an dieser Methode ist die nur eingeschränkt sterile Handhabung.

In den vorangegangenen Experimenten wurde festgestellt, daß die volumenreduzierten Überstände eine viskosere Konsistenz annahmen und mitunter durch Phenolrot stark gefärbt waren (bei Fractoflow®). Auch mikroskopisch sichtbare Verunreinigungen wurden beobachtet (bei Ultrazentrifugation). Um auszuschließen das dieses Phänomen durch Medium, komplex zusammengesetztes fötales Kälberserum oder humanes Serumalbumin hervorgerufen wird, wurden verschiedene Medienvarianten getestet (siehe Tab. 4-4). In zwei unabhängigen Versuchen wurde Phenolrot-freies X-VIVO 10 Medium mit und ohne HSA und Phenolrot-haltiges DMEM mit und ohne FCS getestet. Die erste Ernte der Überstände wurde durch Fractoflow® konzentriert. Die Titer vor und nach der Anreicherung lagen im Rahmen der Abweichungen, die sich durch transiente Transfektion und Titerbestimmung

ergaben. Obwohl die Ausbeuten und Konzentrierungsfaktoren wie in vorangegangenen Versuchen schwankten, konnte kein ausgeprägter Effekt des Mediums auf den Titer, oder die Anreicherung von Partikeln beobachtet werden. Eine zweite Virusernte 24 Stunden später wurde dann mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Auch hier lagen die Abweichungen des Titers im Rahmen dessen, was für transiente Transfektion und Titerbestimmung bisher beobachtet wurde. Genau wie bei der Chromatographie konnte hier kein deutlicher Effekt des Mediums auf den Titer, oder die Konzentrierung von Virus beobachtet werden. Eine ausgeprägte Viskosität des konzentrierten Virusüberstandes, oder eine Anreicherung von Phenolrot konnte in beiden Experimenten nicht beobachtet werden. In diesem Versuch konnte kein Zusammenhang zwischen den bislang verwendeten Medien und den beobachteten Phänomenen höherer Viskosität beziehungsweise Verunreinigungen gefunden werden. Eine vergleichbare Untersuchung ist in der Literatur nicht beschrieben.

Mit den bisher beschriebenen Methoden gelang keine zufriedenstellende Transduktion von CD34⁺-Zellen. Dies wurde unter anderem auf eine mangelhafte Qualität durch Rückstände, teilweise viskose Konsistenz und der Verlust an infektiösen Partikeln des präparierten und konzentrierten Virus zurückgeführt. Deshalb wurden als weitere Methoden zur Anreicherung von Viruspartikeln „Low Speed“-Zentrifugation und die Sedimentation durch Fällung getestet. Außerdem wurden ultrazentrifugierte Sedimente in anderen Puffersystemen mit und ohne Zusatz von Detergenzien resuspendiert, da als möglicher Grund für die beobachteten Rückstände eine ungenügende Löslichkeit der Partikel durch Resuspension des Virus-Sedimentes in Betracht gezogen wurde.

Die durch Zentrifugation konzentrierten Viren zeigten auf den getesteten Zelllinien (TF1 und PLB-985), unabhängig von der angewandten Methode oder des verwendeten Puffers, eine beträchtliche Steigerung der Transduktionseffizienz in der FACS-Analyse. Diese war vor allem durch eine Verschiebung zu hoher Fluoreszenzintensitäten geprägt, wie in der Dot-Blot-Darstellung der FACS-Analyse deutlich zu erkennen war (Abb. 4-13 und 4-14). Eine 1:2 Verdünnung des Virus führte nicht zu einer proportionalen Abnahme der Transduktionseffizienz. Der prozentuale Anteil transgenexprimierender Zellen nahm nur geringfügig oder gar nicht ab. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß sich das Sediment nur teilweise in einem geringen Volumen löst. Anhand der FACS-Analyse konnte keine der Zentrifugationsmethoden oder Pufferkombination als besser oder weniger geeignet identifiziert werden. Die Sedimentation der Viruspartikel durch Fällung erwies sich für dieses System als zytotoxisch. Im FACS konnten nur wenig vitale Zellen nachgewiesen werden,

wobei die lebenden TF-1 Zellen nur geringfügig und die lebenden PLB-985 Zellen nahezu alle eine GFP-Expression zeigten. Vermutlich wird der zytopathische Effekt durch die für die Fällung zugesetzten Reagenzien ausgelöst. Für onkoretrovirale Vektoren konnte eine fünffache Steigerung des Virustiters und eine 50fache Steigerung der Infektion gegenüber des Standardprotokolls der Infektion unter Zusatz von Polybrene gezeigt werden, wenn die Viruspartikel mit Kalziumphosphat kopräzipitiert wurden (Morling und Russell, 1995). Ein Grund, daß die von Morling und Russell (1995) beschriebene Methode im verwendeten System nicht zum Erfolg führte, ist vermutlich die erhöhte Salzkonzentration, die die Fällung mit sich bringt und von den verwendeten promyeloischen Zellen nicht toleriert wurde. Möglicherweise wurden die Partikel nicht quantitativ präzipitiert, da die Retroviren von Morling und Russell (1995) anders pseudotypisiert wurden, als in dieser Arbeit die Lentiviren. Die Veränderung der Kulturbedingung durch Zusätze Medium ist jedoch der wahrscheinlichere Grund, da die Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten. Für eine ineffektive Fällung der Viruspartikel wäre eher eine geringe Transduktionseffizienz zu erwarten.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse konnten im Fluoreszenzmikroskop nicht beobachtet werden. Dort wurden weniger fluoreszierende Zellen beobachtet. So konnte bei den Zellen, die mit nicht-konzentriertem Virus behandelt wurden, gar keine oder nur ganz wenige fluoreszierende Zellen gefunden werden. Mit „Low Speed“-Zentrifugation angereicherte Partikel führten zu wenigen stark und deutlich mehr schwach GFP exprimierenden Zellen. Diese Beobachtung ist konsistent mit dem Ergebnissen der FACS-Analyse, bei der die Fluoreszenz der transduzierten Zellen nicht so hohen Intensitäten zeigte, wie die der Zellen, die mit ultrazentrifugiertem Überstand transduziert wurden. Diese zeigten alle die höchsten Fluoreszenzintensitäten und mikroskopisch nahezu vollständig eine GFP-Expression. Die Unterschiede sind zum einen dadurch bedingt, daß die FACS-Analyse sensitiver ist als die mikroskopische. Demnach gibt es jedoch im Hinblick auf die Transduktionseffizienz keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Zentrifugationsmethoden. Vermutlich werden durch Ultrazentrifugation mehr infektiöse Partikel angereichert und deshalb mehr Virusgenome pro Zelle integriert. Die „Low Speed“-Zentrifugation ist aufgrund der geringeren Zentrifugationsgeschwindigkeit ineffizienter in der Sedimentation der Viruspartikel, was aber auch den Vorteil haben könnte, daß weniger Verunreinigungen sedimentierten. Möglich ist auch, daß sich die längere mechanische Beanspruchung der Partikel durch die deutlich längere Zentrifugationsdauer negativ auf deren Stabilität auswirkt und zu einem Verlust an Infektiosität führt. Da in diesem Versuch keine Titerbestimmung auf 293T-Zellen gemacht

wurde, konnten hier keine Vergleiche gezogen werden. Ein Titer aufgrund der FACS-Ergebnisse konnte nicht errechnet werden, da hierfür weitere Verdünnungen des Überstandes erforderlich gewesen wären.

Betrachtet man die Ergebnisse des Versuchs, so wird deutlich, daß „Low Speed“-Zentrifugation eine Alternative zur Konzentrierung von Viruspartikeln ist, die gegenüber der Ultrazentrifugation eine höhere Volumenkapazität hat, aber mehr Zeit in Anspruch nimmt. Da in diesem Versuch nur geringfügige Verunreinigungen zu sehen waren, kann bei schnell proliferierenden Zellen nicht beurteilt werden, ob die „Low Speed“-Zentrifugation weniger oder mehr Rückstände zeigt. Die Verunreinigungen sind verstärkt in den Versuchen mit CD34⁺-Zellen beobachtet worden. Die Verwendung eines anderen Resuspensionspuffers mit oder ohne Detergenz zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Transduktionseffizienz. Jedoch konnte mikroskopisch festgestellt werden, daß Detergenz einen geringfügigen Effekt auf die Zellen hatte. Die Zellen sahen nicht so rund und vital aus wie die ohne Detergenz und zeigten eine erhöhte Tendenz zur Clusterbildung. Die Präzipitation von lentiviralen Viruspartikeln stellte sich als nicht geeignet für dieses System heraus. So konnte im Fluoreszenzmikroskop keine GFP-Expression beobachtet werden. Im Mikroskop waren die Zellen durch ein granuliertes Erscheinungsbild geprägt, was darauf hindeutet, daß die Zellen nicht mehr vital sind. Dies wurde durch die FACS-Analyse bestätigt. Wie bereits oben erwähnt konnten Morling und Russell (1995) zeigen, daß der Titer und damit die Transduktionseffizienz von onkoretroviralen Vektoren durch Präzipitation der Viruspartikel erhöht werden kann. Diese gegensätzlichen Ergebnisse sind vermutlich auf unphysiologische Kulturbedingungen durch Zusatz von Komponenten zur Fällung zurückzuführen, die, abhängig vom verwendeten Zelltyp, nicht toleriert werden.

Abschließend kann festgestellt werden, daß Ultrazentrifugation, „Low Speed“-Zentrifugation und Fractoflow® sich als Methoden zur Konzentrierung von Viruspartikel im hier geschilderten Maßstab bewährt haben. Die Zentrifugation ist die einfachste und preiswerteste Methode zur Virus-Anreicherung von. Sie ist jedoch aufgrund der vorgegebenen Kapazität nicht beliebig im Maßstab zu vergrößern. Im Hinblick auf klinische Anwendungen ist ein „up scaling“ mit Fractoflow® denkbar. Hier bedarf es jedoch weiterer Optimierungen. So könnte das Elutionsprofil weiter geschärft und durch Fraktionierung das Elutionsvolumen verringert werden. Möglicherweise bieten alternative Säulenmaterialien, zum Beispiel für eine Affinitätschromatographie, günstigere Bedingungen für die Anreicherung von Partikeln. Die Entwicklung alternativer Strategien zur Entsalzung der Eluate mittels Ultrafiltration, durch

beispielsweise eine Gelfiltration, könnte zu einer vereinfachten Methode mit zwei Säulen führen. Für das Erreichen hoher Titer sind die Transfektionsbedingungen entscheidend. Hier kommt es auf ein Zusammenspiel von Menge an Plasmid, Zellzahl sowie der Menge und Inkubationsdauer mit Natriumbutyrate an. Für eine Anwendung in klinischen Versuchen sind weitere Verbesserungen der Virusproduktion notwendig, da zum einen für eine *ex vivo* Gentherapie sehr viele Viruspartikel benötigt werden, und zum anderen definierte Bedingungen in Bezug auf die biologische Sicherheit eingehalten werden müssen. Eine Gefahr ist die Generierung replikationskompetenter Rekombinanten bei der Virusproduktion, die durch Eliminierung oder Substitution überlappender Bereiche weiter reduziert werden. Darüber hinaus kann die Rekombinationswahrscheinlichkeit durch Generierung stabiler, induzierbarer virusproduzierender Zelllinien, wie sie in jüngster Zeit publiziert wurden (Farson et al., 2001; Xu et al., 2001), weiter gesenkt werden. Sie bieten den Vorteil, daß sie eine genotypisch einheitliche Zellpopulation sein können, wenn sie aus Einzelzellklonen generiert werden.

5. 1. 3. Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen

Nachdem mehrere Verfahren zur Konzentrierung von lentiviralem Virusüberstand erfolgreich auf Zelllinien getestet wurden, sollte untersucht werden, welche die geeignetste Methode ist, um hämatopoetische Stammzellen effizient zu transduzieren. Dazu wurden die entsprechenden Methoden zunächst in eigenständigen Versuchen optimiert, um danach in einem Experiment direkt miteinander verglichen zu werden.

Zunächst wurden CD34⁺-Zellen aus peripherem Blut mit Virus infiziert, das durch Ultrazentrifugation konzentriert wurde. Im Fluoreszenzmikroskop wurde nur eine geringe Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen beobachtet, während in der FACS-Analyse mehr als die Hälfte der Zellen eine Expression des Transgens zeigten. Dieses Ergebnis wurde aufgrund der bis dahin durchgeführten Experimente auf Zelllinien als nicht zufriedenstellend bewertet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte eine geringe Transduktionseffizienz (ca. 5 %), wobei die durchflußzytometrischen Daten zunächst als Bestätigung dieser Beobachtung interpretiert wurden. Demnach wurden nur Zellen, die eine relative Fluoreszenzintensität über 100 zeigten, als tatsächlich GFP-exprimierend angesehen, während die Zellen darunter als

GFP-negative Zellen gewertet wurden. Da bei der Auswertung der FACS-Daten keine distinkten Zellpopulationen zu erkennen waren, wurde die Verbreiterung des Signals von etwa 3 – 4 relativen Fluoreszenzeinheiten in der Negativkontrolle zu dann bis 100 relativen Fluoreszenzeinheiten in den transduzierten Zellen als ein Population GFP-negativer Zellen interpretiert. Die Ursache hierfür wurde auf den Zeitpunkt der Messung und/oder artifizielle Phänomene, wie möglicherweise transient mitgeschlepptes grünes Fluoreszenz-Protein bei der Transduktion, zurückgeführt. Die Zellen wurden drei Tage nach Transduktion für die Analyse fixiert. Das Markergen EGFP besitzt eine hohe Stabilität und wird im Mittel erst nach etwa 72 Stunden abgebaut (Angaben von Clontech). Die FACS-Analyse könnte durch einen als Pseudotransduktion bezeichneten Effekt verfälscht worden sein, wie es für VSV-G pseudotypisierte MoMuLV-Vektoren gezeigt wurde (Liu et al., 1996). Bei der Pseudotransduktion kommt es zu einem Transfer von Protein aus der partikelproduzierenden Zelle in die Zielzelle, was zu einer transienten Detektion von exprimiertem Transgen führt (Case et al., 1999). Infolge dieser Erkenntnis wurden alle folgenden FACS-Markierungen, die GFP betreffen, frühestens vier bis fünf Tage nach Transduktion durchgeführt. Die Agarkulturen in diesem Versuch zeigten eine unterdurchschnittliche Klonogenität ($\approx 2\%$). In früheren Untersuchungen lag der Durchschnittswert bei 20 – 30 % (A. Schilz, persönliche Mitteilung). Eine Ursache könnte die Verwendung von länger bei 4 °C gelagerten Zytokinen sein, die möglicherweise in ihrer Aktivität reduziert waren. Eine weitere Ursache könnte die Verwendung von zu heißem Agar-Agar gewesen sein, der beim Ansatz der Kulturen zugegeben wurde. Die in diesem Assay bestimmte durchschnittliche Transduktionseffizienz von etwa 20 %, ist mit Bezug auf die geringe Anzahl an Kolonien als nicht aussagekräftig beurteilt worden. Zu einem späteren Zeitpunkt führten Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Naldini (Universität Torino) zu einer anderen Interpretation der FACS-Ergebnisse. Die durchflußzytometrische Analyse ist eine sensitivere Nachweismethode, als die fluoreszenzmikroskopische. Es sind nur zwei bis drei Moleküle EGFP pro Zelle für eine Detektion in der FACS-Analyse notwendig (nicht veröffentlichte Erfahrungswerte von Naldini und Mitarbeitern). Diese Beobachtungen führten zu einer erneuten, anderen Auswertung der FACS-Daten, wonach mehr als die Hälfte der Zellen GFP-positiv waren. In einer Population der Negativkontrolle wurden 2 % GFP-positiver Zellen nachgewiesen. Dies ist wahrscheinlich auf ein Verschleppen von transduzierten Zellen bei der Fixierung zurückzuführen. Weitere Transduktionen von CD34⁺-Zellen mit ultrazentrifugiertem Virusüberstand zeigten alle eine fluoreszenzmikroskopisch schlechte Transduktionseffizienz und teilweise Verunreinigungen, deren Ursprung nicht ermittelt werden konnte. Dies war

einer der Gründe, warum nach alternativen Methoden zur Generierung und Konzentrierung von Viruspartikeln gesucht, diese getestet und optimiert wurden.

Nach den Experimenten zur Anreicherung von Viruspartikeln durch Ultrazentrifugation, wurde die Transduktionseffizienz von chromatographisch konzentrierten Viren auf humanen hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmark getestet. Parallel dazu wurde der Einfluss von Zytokinen auf die Transduktion untersucht. In diesem Experiment konnte - im Gegensatz zur Ultrazentrifugation (siehe vorigen Abschnitt) - im Fluoreszenzmikroskop eine größere Anzahl transduzierter Zellen detektiert werden. Der Anteil war in Zellpopulationen, die vor und während der Infektion mit Zytokinen behandelt wurden, doppelt so hoch, wie in den Zellpopulationen, welche nicht mit Zytokinen behandelt wurden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Transduktion von HSCs mit HIV-1 abgeleiteten Vektoren abhängig vom Zellzyklus ist. Sutton et al. (1999) fanden heraus, daß sich die Transduktionseffizienz erhöht, wenn die CD34⁺-Zellen 48 Stunden vor der Transduktion in Gegenwart von Zytokinen kultiviert wurden. Bei der Untersuchung der möglichen Ursache, konnte die Arbeitsgruppe zeigen, daß Zellen in der G₀ Phase deutlich schlechter transduziert werden, als Zellen, die sich in der G₁ Phase oder der S/G₂/M Phase befinden. Durch Verdünnung des Virus sank die Anzahl GFP-positiver Zellen nachweislich ab (siehe Abb. 4-19). Im Widerspruch dazu konnte im FACS kein Unterschied in der Zahl transgenexpmierender Zellen in Abhängigkeit von der Zytokingabe festgestellt werden. Es wurde jedoch analog zu 4. 1. 2. 7. eine Rechtsverschiebung der Fluoreszenzintensität beobachtet ($<10^2 \rightarrow >10^2$). Dies erklärt die Beobachtung einer verminderten Anzahl GFP-positiver Zellen ohne Zytokingabe im Fluoreszenzmikroskop. Verglichen mit der Ultrazentrifugation (siehe vorigen Abschnitt), konnte durch chromatographische Anreicherung der Viruspartikel ein mikroskopisch besseres Ergebnis erzielt werden. In der durchflußzytometrischen Analyse wurde jedoch ein geringerer Anteil GFP exprimierender Zellen nachgewiesen. In weiteren Transduktionsexperimenten mit Fractoflow® konzentrierten Partikeln, konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Jedoch konnte auch durch veränderte Kulturbedingungen, z. B. durch Variation des Zytokincocktails, keine Steigerung der Transduktionseffizienz erzielt werden. Deshalb wurden weitere, alternative Konzentrierungsmethoden getestet.

Als Alternative zur Ultrazentrifugation und Anionenaustauschchromatographie wurden auch durch „Low Speed“-Zentrifugation angereicherte Viruspartikel zur Transduktion von CD34⁺-

Zellen getestet. Die Auswertung des Kolonie-Assays ergab nach fluoreszenzmikroskopischer Auswertung eine niedrigere Transduktionseffizienz im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen. Auch die FACS-Analyse zeigte nur durchschnittlich 15 % GFP exprimierende Zellen. Die mikroskopische Kontrolle fünf Tagen nach Transduktion bestätigte, dass die Zellen morphologisch in keinem guten Zustand waren. Abbildung 4-19 zeigt, daß der Anteil absterbender Zellen (kleiner, weniger rund) größer ist als der Anteil gesunder Zellen (größer, rund). Schon nach der kurzen Präinkubation konnten nur noch rund 50 % lebende Zellen mittels Trypanblau-Färbung gefunden werden. Nach fünf Tagen waren deutlich mehr als 50 % der Zellen abgestorben. Dennoch zeigte ein Teil der lebenden Zellen eine starke GFP-Expression. Hierbei konnten in der Population, die zweimal transduziert wurde, wesentlich mehr GFP-positive Zellen gefunden werden, als in der Population, die nur einmal transduziert wurde. Dies konnte durch die Durchflußzytometrie nicht bestätigt werden, da hier die Anzahl GFP-positiver Zellen in beiden Populationen ähnlich war. Da die Zellen in einem schlechten Zustand waren und nur eine geringe Anzahl lebender Zellen vorhanden waren, wurde zunächst nur der Kolonie-Assay durchgeführt. Von den restlichen Zellen wurde eine Differenzierungskultur angelegt. Die Ursache für den schlechten Zustand der Stammzellen könnte in der Präparation, der Kryokonservierung oder der Kultivierung, beziehungsweise der Summe aller drei Verfahren liegen. Durch Markierung mit anti-CD33 Antikörpern konnte in der FACS-Analyse gezeigt werden, daß 80 – 90 % der Zellen nach 14 Tagen eine deutliche myeloide Differenzierung aufwiesen. In diesem Versuch konnte zudem gezeigt werden, daß CD34⁺-Zellen durch „Low Speed“-Zentrifugation konzentrierte Partikel transduziert werden konnten. Ein Vergleich zu den anderen Methoden kann jedoch aufgrund des Zustandes der Zellen und der sehr unterschiedlichen Durchführung des Experimentes nicht gezogen werden.

In den vorangegangenen Experimenten wurde der Erfolg der einzelnen Methoden zur Konzentrierung von Viruspartikeln an CD34⁺-Zellen getestet. In einem weiteren Experiment sollten anschließend die einzelnen Methoden zur Viruspräparation von in einer Transduktion auf CD34⁺-Zellen miteinander verglichen werden. Dazu wurde für jede Konzentrierung identischer Überstand verwendet. Die Bestimmung der Titer erfolgte in diesem Experiment zum einen durch Endpunktverdünnung auf 293T-Zellen (biologischer Titer) und zum anderen durch Ermittlung der Anzahl an RNA-Kopien im Überstand (quantitativer Titer). Die quantitative PCR benutzt zur viralen Titration eine als „strong stop“-Spezies bezeichnete cDNA (Towers et al., 1999), die in einer frühen Phase der reversen Transkription gebildet wird, noch bevor das Virus in die Zielzelle eintritt (Trono, 1992; Zhang et al., 1995). Der

höchste biologische Titer wurde nach „Low Speed“-Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit ermittelt, während nach Ultrazentrifugation beziehungsweise Fractoflow® der höchste quantitative Titer gefunden wurde. Im direkten Vergleich wurden mit der quantitativen PCR etwa zehnmal mehr Partikel detektiert, als bei der Bestimmung der infektiösen Einheiten. Der Unterschied ergibt sich aus den Meßmethoden, da einerseits die biologisch infektiösen Partikel und andererseits die quantitative Menge an RNA-Genom Kopien gemessen wurde. Das es durch die Konzentrierung zu einem Verlust der Infektiosität kam, zeigten die Ausbeuten an Gesamtzahl der infektiösen Partikel in der Titerbestimmung auf 293T-Zellen. Die Höhe des Verlustes ist dabei wahrscheinlich abhängig von der Methode, die zur Konzentrierung angewandt wurde. Bei der Anreicherung durch Zentrifugation sind vermutlich die einwirkenden Scherkräfte maßgebend für den Verlust an Infektiosität. Der niedrige Konzentrierungsfaktor und die niedrige Ausbeute von Fractoflow® angereicherten Partikeln, kann eine Reihe von Ursachen haben. Da die Säule mehrfach verwendet wurde, könnten die gewählten Regenerationsbedingungen zu einer verminderten Bindekapazität geführt haben. Einen negativen Einfluß könnten auch die Elutionsbedingungen oder die anschließende Ultrafiltration ausgeübt haben. Diese Möglichkeiten sind nicht im Detail untersucht worden.

Die FACS-Analyse der transduzierten TF1-Zellen zeigte, daß bereits mit nicht-konzentriertem Virusüberstand nahezu alle Zellen GFP exprimierten. Dies war aufgrund des hohen Titers schon vor der Konzentrierung zu erwarten. Auch die Fluoreszenzmikroskopische Auswertung bestätigte, daß nahezu alle Zellen transduziert wurden. Bei näherer Betrachtung war eine Korrelation zwischen den FACS-Daten und der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zu beobachten. So zeigten die Zellen, die mit „Low Speed“-zentrifugiertem Überstand transduziert wurden, eine höhere Anzahl stark GFP-exprimierender Zellen als die übrigen TF1-Zellen. Parallel dazu lagen die meisten als Punkte im Dot-Blot abgebildeten Zellen im Bereich einer Fluoreszenzintensität (FI) zwischen 100 – 1000. Bei den anderen transduzierten Zellen streuten die Punkte im Bereich einer FI von 10 – 1000, was im Fluoreszenzmikroskop als Mischpopulation aus weniger und stärker exprimierenden Zellen zu sehen war. Dieser Zusammenhang konnte auch bei den transduzierten CD34⁺-Zellen hergestellt werden. Die FACS-Analyse zeigte, daß mit nicht-konzentrierten und chromatographisch angereicherten Partikeln etwa ein Fünftel der Zellen transduziert wurden, während mit den Zentrifugationsmethoden rund 90 % der Zellen GFP-positiv waren. Im Fluoreszenzmikroskop sah man analog zu den FACS Daten mehr exprimierende Zellen in den Populationen, die mit

nicht-konzentrierten und chromatographisch angereicherten Partikeln transduziert wurden. Hier waren in den Dot-Blots der FACS-Analyse mehr Dots im Bereich einer FI von 100 bis 1000 zu sehen, als in den anderen transduzierten Populationen. Dort lagen die Dots im Bereich einer FI von 10 bis 100 oder sogar darunter. In Korrelation dazu wurde im Mikroskop bei den Zellen, die mit zentrifugierten Partikeln transduziert wurden, überwiegend eine schwache und diffuse Fluoreszenz beobachtet. Darüber hinaus wurden in diesen Kulturen wieder Verunreinigungen beobachtet, die eine Hintergrundfluoreszenz zeigten. Diese nicht zellassoziierte Fluoreszenz könnte eventuell eine Verfälschung der FACS-Daten verursacht haben. Außerdem zeigten diese Populationen mikroskopisch weniger gesunde und lebende Zellen, als die übrigen Populationen (siehe Abb. 4-24). Eine schlechtere Qualität der so präparierten Viren war jedoch nicht der alleinige Grund für den schlechten Zustand der CD34⁺-Zellen. Bei den verwendeten Stammzellen handelte es sich um Zellen aus der gleichen Präparation, die im vorherigen Versuch verwendet wurden. Auch in diesem Versuch war der schlechte Zustand der Zellen nach dem Auftauen sichtbar. Dies wurde durch eine FACS-Analyse vor der Transduktion zur Bestimmung der CD34⁺-Reinheit bestätigt, bei der etwa 12 % lebende Zellen detektiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Erklärung für die schlechtere Verfassung der Zellen, die mit zentrifugiertem Virus behandelt wurden, ist die sehr hohe MOI, mit der die Infektion durchgeführt wurde. So wurden in diesem Versuch Partikelzahlen von 47 (ohne Konzentrierung), 365 (Fractoflow®) und rund 2000 („Low Speed“, Ultrazentrifugation) verwendet. Da die CD34⁺-Zellen direkt nach der Konzentrierung transduziert wurden, erfolgte die Titerbestimmung parallel dazu. Deshalb ließ sich die MOI erst im Anschluß an die Transduktion bestimmen. Da in diesem Versuch zunächst die Methoden, ausgehend von identischem Virusüberstand, qualitativ und quantitativ an CD34⁺-Zellen getestet werden sollten, spielte die MOI hier eine untergeordnete Rolle. In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob es bei den einzelnen Methoden mit hohen MOIs zu zytotoxischen Effekten kommen kann. Dieser Versuch sollte mit einer definierten MOI wiederholt werden, um die Unterschiede hinsichtlich der Transduktionseffizienz der einzelnen Konzentrierungsarten weiter zu untersuchen. In weiteren Untersuchungen könnte auch geklärt werden, ob die Stärke der Expression mit der Anzahl von integrierten Virusgenomen korreliert, und ob die auf unterschiedliche Art konzentrierten Partikel auch einen Einfluß auf den Zellzyklus haben. Möglicherweise kommt es durch die Anreicherung der Partikel aber auch zu einer Anreicherung von anderen Komponenten, die einen Einfluß auf das Virus hinsichtlich der Stabilität oder Infektiosität haben.

Zusammenfassend kann man sagen, daß für die Konzentrierung von lentiviralen Viruspartikeln für die Transduktion von CD34⁺-Zellen noch viele Punkte zu untersuchen und zu optimieren sind.

Die Angaben über erreichte Transduktionseffizienzen in CD34⁺-Zellen schwanken in der Literatur um 20 % bis 60 % (Sutton et al., 1998,1999; Uchida et al., 1998; Miyoshi et al., 1999; Case et al., 1999; Douglas et al., 1999; Eavans, 1999). Die Angaben in diesen Studien beziehen sich überwiegend auf FACS-Analysen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Ein direkter Vergleich mit den Studien ist nur bedingt möglich, da die Versuchsbedingungen recht unterschiedlich waren. Bei fast allen oben genannten Studien wurden die Viruspartikel über Ultrazentrifugation angereichert. Nur die Gruppen um Douglas (1999) und Uchida (1998) konzentrierten den Virusüberstand durch Ultrafiltration auf. Die Unterschiede der Untersuchungen lagen im Vektordesign (Promotor, LTR, Markergen, akzessorische Proteine), den Kulturbedingungen (MOI 12 – 2000, Zytokincocktail, Präinkubationsdauer und mit oder ohne Zytokine), dem Zeitpunkt der Analyse (drei bis sieben Tage) und den verwendeten primären Zellen (Knochenmark, Nabelschnurblut, peripheres Blut mit und ohne Prästimulation). Dabei spielt auch die Präparation und Reinheit der verwendeten CD34⁺-Zellen genauso eine Rolle, wie die verwendeten Transduktionsprotokolle (Sutton et al., 1999). Für eine Optimierung des Transduktionsprotokolls sollten weitere Kultur- und Transduktionsbedingungen getestet werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß drei Methoden zur Konzentrierung von Viruspartikeln etabliert wurden. Auch die Transduktion von CD34⁺-Zellen ist gelungen. Die bei der Konzentrierung aufgetretenen Verluste an Partikeln beziehungsweise Infektiosität kann eine Reihe von Gründen haben. Unspezifische Wechselwirkungen mit den verwendeten Materialien (Plastikgefäße, Filter, Säulenmaterial) sind denkbar. Weitere Hinweise auf mögliche Ursachen konnten in der Literatur gefunden werden. Sutton et al. (1999) konnte zeigen, daß eine Erhöhung der Partikelzahl nur bedingt zu einer gesteigerten Transduktionsrate führt, was die Autoren auf eine vom Zellzyklus abhängige Transduzierbarkeit von HSCs zurückführten. Es könnte aber auch, wie bereits diskutiert, zu einer Aufkonzentrierung anderer, von den Zellen sekretierter Komponenten kommen, die einen nachteiligen Effekt auf die Transduktion von Stammzellen haben (Le Doux et al., 1996). Forestell und Böhnlein (1995) konnten für ein onkoretrovirales System zeigen, daß die

Erhöhung des Titers nicht immer zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz führt. Sie vermuteten, daß eine Interferenz von infektiösen und nicht infektiösen Viruspartikeln die Ursache hierfür war. Die in dieser Arbeit etablierten Methoden waren Vorversuche zur Entwicklung von Methoden für präklinische und klinische Untersuchungen, die weiter optimiert werden müssen. Die verwendeten Vektoren werden gegenwärtig in Bezug auf ihre biologische Sicherheit und eine verbesserte Expression optimiert (Vigna und Naldini, 2000).

5. 2. Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität

Die im ersten Teil der Arbeit etablierten Methoden sollten im zweiten Teil am Modell der X-chromosomal gebundenen chronischen Granulomatose (X-CGD) durch Transfer eines therapeutischen Gens ($gp91^{phox}$) und Nachweis der Funktionalität getestet werden. Für die Rekonstitution der NADPH-Oxidase wurden lentivirale Vektoren konstruiert, die $gp91^{phox}$ als therapeutisches Gen enthalten. Die Fähigkeit dieser Vektoren, den Enzymkomplex funktionell zu rekonstituieren, wurde mit der Modellzelllinie X-CGD PLB-985 (Zhen et al., 1993) im Vergleich zu PLB-985 Wildtypzellen getestet. Beide Zelllinien sind humane myeloische Leukämie-Zelllinien, die nach einer Dimethylformamid-Induktion zu funktionellen Granulozyten und Makrophagen ausdifferenzieren können. Zusätzlich dazu wurden die Vektoren mit einem onkoretroviralen Konstrukt verglichen, mit dem in vorangegangenen Arbeiten gute Ergebnisse erzielt wurden (Dissertation S. Becker, 1998).

5. 2. 1. Klonierung lentiviraler $gp91^{phox}$ -Vektoren

Die somatische Gentherapie von X-CGD durch Einbringen therapeutisch wirksamer Gene mittels onkoretroviraler Konstrukte in $CD34^+$ -Zellen, konnte bislang nur bedingt erreicht werden. Eine hohe Transduktionseffizienz kann mit einem solchen System nur durch eine mehrere Tage andauernde *ex vivo* Kultivierung erreicht werden, wodurch die Repopulierungsfähigkeit der Stammzellen erheblich reduziert wird. Als Alternative dazu wurde der lentivirale Vektor pSIN2-CMV- $gp91$ kloniert. Vor das $gp91^{phox}$ -Transgen wurde ein interner CMV-Promotor inkloniert. In der 3' LTR wurden 400 bp der U3-Region deletiert, wodurch nach erfolgter reverser Transkription und Integration keine viralen

Promotor- und Enhancersequenzen mehr vorhanden sind. Damit werden die viralen Sequenzen 5' vom CMV-Promotor nicht mehr transkribiert. In einem weiteren Konstrukt, dem pSIN2-CMV-gp91-WPRE, wurde zwischen dem gp91^{phox}-Gen und der 3' LTR die WPRE-Sequenz eingebracht, um eine Erhöhung der Expression von gp91^{phox} und damit auch eine verbesserte Rekonstitution zu erzielen. Um die Ergebnisse der Experimente besser einschätzen zu können, wurde parallel dazu der Vektor pMgSLΔS (S. Becker, GSH) verwendet, der als RNA-Genom in GALV pseudotypisierten Partikeln aus einer Produzenten-Zelllinie, den PG13iMgSLΔS (H. Knoeß, GSH), geerntet werden konnte.

Wie in Kapitel 4. 2. 1. erwähnt, wurde das gp91^{phox}-Gen als PCR-Fragment aus pMgSLΔS isoliert und in den pCIGWS Vektor eingebaut. In den ersten Experimenten konnte jedoch keine Rekonstitution nachgewiesen werden, obwohl eine Integration anhand einer PCR mit genomischer DNA gezeigt werden konnte. Auch eine GFP Expression wurde fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Die Ursache für das Scheitern der Rekonstitution ist wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Genkopie des gp91^{phox} zurückzuführen. Dies kann entweder durch die PCR-Amplifikation oder durch die Klonierung entstanden sein. Da die anderen Vektoren eine Rekonstitution zeigten, wurde auf eine nähere Untersuchung der Ursache, beispielsweise durch Sequenzierung, verzichtet. Eine andere mögliche Begründung ist eine Wechselwirkung des IRES-Elementes mit anderen Komponenten des Vektors, die eine Expression des Transgens behindern, obwohl durchaus das Markergen exprimiert werden kann. So konnte gezeigt werden, daß eine Inhibierung der „Cap“-abhängigen Translation des ersten Cistrons *in vivo* oder *in vitro* die Translation des IRES getriebenen Leserasters unbeeinflusst lassen, oder sogar stimulieren kann (Liebig et al., 1993; Ohlmann et al., 1996). Wie oben bereits erwähnt, wurde die Ursache für die fehlende Rekonstitution nicht näher untersucht, da zwei andere Vektoren zur Verfügung standen.

5. 2. 2. Molekularbiologische Untersuchungen der lentiviralen Vektoren

Um die Integration des Virus nachzuweisen, wurde eine semiquantitative PCR mit genomischer DNA durchgeführt. Dabei konnten in den lentiviral transduzierten X-CGD PLB-985 Zellen Signale mit einer Intensität von durchschnittlich fünf Kopien pro Zelle detektiert werden. Die retroviral transduzierten Zellen zeigten eine Bande, die in ihrer Intensität mit

dem Standard für eine Kopie pro Zelle vergleichbar war. Bei der angegebenen Kopienzahl handelt es sich um einen Mittelwert, der sich auf die gesamte Population transduzierter Zellen bezieht. Für eine statistisch relevante Aussage müßte ein klonaler Assay durchgeführt werden. Bei diesem Transduktionsexperiment stand jedoch die Rekonstitutionsfähigkeit im Vordergrund. Die molekularbiologischen Untersuchungen dienten primär als Hinweis darauf, ob und worauf mögliche Unterschiede zurückzuführen sind. Mit der semiquantitativen PCR konnte gezeigt werden, daß es in den Mischpopulationen der lentiviral transduzierten Zellen zu einer mehrfachen Integration des gp91^{phox} Gen gekommen ist. Gemäß den Unterschieden in der Anzahl integrierter Genkopien pro Zelle, sollte auch auf Proteinebene Unterschiede in Abhängigkeit zum verwendeten Vektor nachzuweisen sein.

In einer Westernblot-Analyse wurde die Korrelation zwischen der Anzahl integrierter Virusgenome und der gp91^{phox}-Expression untersucht. Verglichen mit den PLB-985-Wildtypzellen zeigten die onkoretroviral transduzierten Zellen ein schwächeres Signal bei gleicher Menge Gesamtprotein, während die mit lentiviralen Partikeln infizierten X-CGD PLB-985 Zellen in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der semiquantitativen PCR ein stärkeres Signal zeigten. Das Bandenmuster ist für diesen Antikörper charakteristisch (Zhen et al., 1993). So erscheint das Protein nicht als eine distinkte Linie, sondern als diffuse Bande von etwa 75 – 91 kDa. Die Ursache hierfür ist die starke Glykosilierung des Enzyms (Dusi et al., 1998). Ein weiteres Signal wurde bei etwa 56 kDa detektiert, was vermutlich einer deglykolisierten Variante entspricht (DeLeo et al., 2000). Die schwächere aber distinkte Bande bei etwa 100 kDa ist unspezifisch und wird wahrscheinlich durch eine Kreuzreaktivität eines anderen Proteins verursacht (Maly et al., 1989). Auffällig war in diesem Experiment, daß die 56 kDa Bande bei dem lentiviralen Konstrukt, das WPRE enthielt, am schwächsten war. Die Ursache hierfür könnte mit einem veränderten Ablauf der Expression zusammenhängen. Für WPRE wurde, wie bereits erwähnt, gezeigt, daß es zu einer Kumulation ungespleißter RNA-Transkripte des Virusgenoms im Zytosol kommt. Außerdem wurde ein stabilisierender Effekt auf das RNA-Transkript beobachtet (Zufferey et al., 1999). Möglicherweise führen diese Effekte auch zu einer veränderten Prozessierung des Proteins, etwa durch einen zügigen Transport zum endoplasmatischen Retikulum oder durch Begünstigung der Komplex-Bildung mit p22^{phox}. Dieser Komplex wird vor der Prozessierung von gp91^{phox} gebildet (DeLeo et al., 2000). Die genauen Prozesse und Interaktionspartner von WPRE sind bis jetzt jedoch nur wenig untersucht. Weitere Hinweise auf ähnliche Phänomene wurden in der Literatur nicht gefunden.

In zwei unabhängigen Versuchen wurden X-CGD PLB-985 Zellen mit den Vektoren pSIN2-CMV-gp91^{phox} und pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE transduziert (Transduktion A und B, siehe Kapitel 4. 2. 4.). In einem der zwei Experimente wurden die Modellzellen darüber hinaus mit Virusüberstand der „Producer“-Zelllinie PG13iMgSLΔS infiziert (Transduktion B, siehe Kapitel 4. 2. 4.). Nach Ausdifferenzierung der Zellen aus den Transduktionen A und B wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. In der durchflußzytometrischen Analyse der Transduktion A konnte für durchschnittlich eine Drittel der Zellen der mit pSIN2-CMV-gp91^{phox} und pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE transduzierten Populationen gp91^{phox} Protein nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Vektoren konnten nicht beobachtet werden. In der als Positivkontrolle verwendeten PLB-985 Wildtyp-Population konnte in 91 % der Zellen gp91^{phox} nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die FACS-Analyse der Transduktion B sehr unterschiedliche Ergebnisse. Bei den Wildtyp-Zellen konnten 68 % gp91^{phox} positive Zellen gemessen werden. Bei den Vektoren schwankte der Anteil positiver Zellen zwischen 14 % und 30 %, wobei die onkoretroviral transduzierte Population den höchsten und die lentiviral transduzierten Zellen mit WPRE den geringsten Anteil gp91^{phox} positiver Zellen enthielt. Die starke Differenz der gp91^{phox} Expression der PLB-985 Wildtyp-Zellen kann verschiedene Gründe haben. Zum einen korreliert die Erhöhung der Expression und in Folge dessen die Translation der Untereinheit mit der Differenzierung zu reifen Granulozyten (Zhen et al., 1993), zum anderen muß das gp91^{phox} Protein auf der Zelloberfläche für den Antikörper zugänglich sein. In ruhenden Neutrophilen ist das Flavohämprotein in den Membranen von spezifischen Granula und sekretorischen Vesikeln lokalisiert (Roos et al., 1996). Während der Zellaktivierung fusionieren diese Zellorganellen mit der Plasmamembran und führen dort zu einer Ansammlung der Oxidase (Roos et al., 1996). Der Nachweis von gp91^{phox} kann mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (7D5) nur erfolgen, wenn das spezifische Epitop an der Zelloberfläche zugänglich ist. Dazu muß die Untereinheit mit p22^{phox} als Komplex assoziiert vorliegen (Burrit et al., 2001). Die Expression von p22^{phox} ist unabhängig von der Expression von gp91^{phox}, jedoch ist die Menge an p22^{phox} Protein in den X-CGD PLB-985 Zellen deutlich geringer. Die Menge des in der Zelle vorhanden p22 ist abhängig von der Menge an gp91^{phox} Molekülen. Da beide nur als Komplex stabil sind, fehlt der Assoziationspartner und die Proteine werden schnell degradiert (DeLeo et al., 2000). Der jeweils geringere Anteil gp91^{phox} positiver Zellen in den transduzierten X-CGD PLB-985 Populationen ist wahrscheinlich auf eine entsprechende Transduktionseffizienz zurückzuführen. Mit der FACS-Analyse in diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß in den transduzierten Zellen gp91^{phox} exprimiert und in der

Plasmamembran integriert wurde. Eine genaue Bestimmung der Transduktionseffizienz wurde nicht durchgeführt, da der qualitative Nachweis der Rekonstitution im Vordergrund stand. Ob und in welchem Umfang die Zellen differenzieren, kann man anhand vom Oberflächenproteinen nachweisen, deren Expression abhängig vom Grad der Zelldifferenzierung ist. Man nennt diese Proteine auch „lineage marker“. Ein solcher Marker ist CD11b, welcher auf Granulozyten, Monozyten, NK Zellen und Subpopulationen von T und B Zellen vorkommt (Kuby Immunology, 2000). Untersuchungen haben ergeben, daß im Mittel 80 % und mehr PLB-985-Zellen zu Neutrophilen ausdifferenzieren, wenn sie in Gegenwart von DMF kultiviert werden (Stefan Stein, mündliche Mitteilung).

In der semiquantitativen PCR-Analyse zeigten die lentiviral transduzierten X-CGD PLB-985 Banden eine Intensität, die vergleichbar mit der Intensität der Bande des Standards für 5 Kopien pro Zellen war. Das läßt den Schluß zu, daß die cDNA des Provirus mehrfach integriert wurde. Dafür sprechen auch die FACS Ergebnisse. In beiden Transduktionsansätzen war der Anteil gp91^{phox} positiver Zellen geringer als bei den Wildtypzellen. Geht man demnach davon aus, das nicht alle Zellen transduziert wurden, so ließe sich eine Bande mit einer Intensität, vergleichbar mit dem Standard für eine Genkopie pro Zelle, am wahrscheinlichsten mit einer Mehrfachtransduktion von einem Teil der Zellpopulation, erklären. Die Westernblot-Analyse zeigte für die lentiviral transduzierten Zellen eine Bande, die in ihrer Intensität deutlich stärker war als die der Wildtypzellen oder onkoretroviral transduzierten Populationen. Auch dieses Ergebnis spricht für eine mehrfache Integration des Provirus, aber auch für eine hohe Effizienz der lentiviralen Vektoren in Bezug auf die Expression. Der Blot zeigte auch, daß die Expression des WPRE Vektors im Vergleich zu den anderen Vektoren am höchsten war.

5. 2. 3. Funktionelle Untersuchungen zur Rekonstitution der NADPH-Oxidase

Bei der Entwicklung eines Vektors für die somatische Gentherapie von X-CGD Patienten genügt es nicht nur, intakte Kopien des gp91^{phox}-Gens in die Zielzellen zu integrieren und das Protein zu exprimieren, sondern darüber hinaus muß auch eine Assemblierung des Multikomponenten-Komplexes der NADPH-Oxidase erfolgen und die Aktivität des Enzyms rekonstituiert werden. Die lentiviralen Vektoren wurden deshalb in der Modellzelle X-

CGD PLB-985 auf die Fähigkeit getestet, Sauerstoffradikale zu bilden. Dafür wurden zwei verschiedene Assays durchgeführt. Der Chemilumineszenz-Assay beruht auf der Umsetzung von exogen zugegebenem Luminol durch endogen gebildete Sauerstoffradikale, wobei die in Form von Chemilumineszenz frei werdende Reaktionsenergie der gemessen wird. Im Zytochrom c-Assay wird exogen zugeführtes Zytochrom *c* durch die von den stimulierten Zellen gebildeten Peroxide von seiner oxidierten Form in die reduzierte Form umgesetzt, was mit Hilfe eines Photometers quantitativ verfolgt werden kann.

Im Chemilumineszenz-Assay wurde nach Ausdifferenzierung der Zellen und Stimulation mit PMA im Chemiluminometer die auftretende Chemilumineszenz in relativen Lichteinheiten gemessen. PLB-985 Wildtyp-Zellen, die eine intakte NADPH-Oxidase aufweisen, dienen als Positivkontrolle. In beiden Transduktionen zeigte die mit pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE Vektor transduzierten Zellpopulationen eine annähernd vollständige Rekonstitution der NADPH-Oxidase. Die Zellen, die mit dem Vektor ohne WPR-Element transduziert wurden, zeigten eine geringfügig niedrigere Aktivität der NADPH-Oxidase. Die onkoretroviral transduzierten Populationen erreichten 75 % der relativen Oxidase-Aktivität verglichen zu den Wildtypzellen. Die Aktivitäten der Transduktion B lagen unter denen der Transduktion A. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der FACS-Analyse. Wie bereits erwähnt, steht die Expression von gp91^{phox} in Zusammenhang mit der Differenzierung der Zellen. Bei der Transduktion B konnten weniger gp91^{phox} positive Zellen nachgewiesen werden, als auf den Wildtypzellen. Dies zeigt, daß bei dieser Transduktion vermutlich weniger Zellen ausdifferenziert waren als bei Transduktion A. Die durchflußzytometrische Analyse läßt auch eine geringere Transduktionseffizienz der Transduktion B vermuten. Demnach waren auch für die Rekonstitution der transduzierten Zellen geringere Aktivitäten zu erwarten. Die FACS-Analyse der Transduktion B zeigte bei den PLB-985 Wildtyp-Zellen eine kleinere gp91^{phox}-positive Zellpopulation als bei der Transduktion A (siehe Abb. 4-32). Im Verhältnis zum Anteil gp91^{phox} exprimierender Zellen, die in der FACS-Analyse gemessen wurden, sind die Rekonstitutionsraten relativ hoch. Die Ursache hierfür liegt vermutlich an der hohen gp91^{phox}-Expression (siehe Abb. 4-30) in Folge der Mehrfach-Transduktion (siehe Abb.4-29) und dem Vorhandensein der WPRE-Sequenz im Vektor pSIN2-CMV-gp91^{phox}-WPRE. Im Vergleich zu anderen Methoden ist die Chemilumineszenzmessung mit Luminol die sensitivste Methode. Wohin gegen der Zytochrom c-Assay quantitativ genauer ist und kinetische Daten leichter gemessen werden können (Porter et al., 1992).

In einem zweiten Experiment wurden transduzierte Zellen aus identischen, differenzierten Populationen für einen Zytochrom *c*-Assay verwendet. Dabei zeigte die Messung der Proben zu Transduktion A durchgehend geringere V_{\max} -Werte als in Transduktion B. Das bedeutet, daß die gesamte Reaktion langsamer verlief. Dies verdeutlichen auch die graphischen Darstellungen der Kinetiken (siehe Abb. 4-34 und 4-35). Während bei Transduktion A die Reaktion erst nach etwa sechs bis sieben Minuten startet und rund zehn min. benötigt, begann die Reaktion der Transduktion B schon nach drei bis vier Minuten und benötigte insgesamt etwa nur fünf Minuten. Die berechnete relative NADPH-Oxidase Aktivitäten der Transduktion B korrelierten in etwa mit den durchschnittlichen Werten die im Chemilumineszenz Assay ermittelt wurden. Bei den Proben der Transduktion A lagen die Werte durchschnittlich 10 - 20 % (49 % pSIN2-CMV-gp91 und 74 % pSIN2-CMV-gp91-WPRE) unter denen der Transduktion B (77 % pSIN2-CMV-gp91 und 84 % pSIN2-CMV-gp91-WPRE). Die mit dem Vektor MgSLΔS transduzierten Zellen erreichten lediglich 43 % der Enzymaktivität der Positivkontrolle, und zeigten außerdem einen ähnlich verzögerten Verlauf wie die Proben der Transduktion A. Die Abweichungen der Werte zwischen Transduktion A und B lassen sich zum einen mit der Messungenauigkeit des Tests an sich begründen. So mußten kleine Mengen (mg) Zytochrom *c* für jeden Test frisch eingewogen und verdünnt werden. Zum anderen wurde der Test mit lebenden, nicht fixierten Zellen durchgeführt, wobei zwischen der Entnahme der Zellen, deren Aufbereitung und der anschließenden Messung nicht exakt der gleiche Zeitraum lag. Auch der Zustand der Zellen spielt vermutlich eine Rolle. Die Zellen sollten vor der Zugabe von DMF in einer logarithmischen Wachstumsphase sein und eine Zellzahl aufweisen, die drei bis vier Teilungen erlaubt, ohne das die Zellen in die Plateauphase übergehen. Die funktionelle Rekonstitution, die in diesem Test nachgewiesen wurde, lag im Rahmen dessen, was auch schon für retrovirale Vektoren an dieser Modellzelllinie gezeigt werden konnte (Zhen et al., 1993).

Betrachtet man die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen und die Nachweise der funktionellen Rekonstitution, so ist es gelungen, Vektoren zu generieren, die gute Voraussetzungen für die Entwicklung einer somatischen Gentherapie für X-CGD Patienten mitbringen. Versuche mit Vektoren, die anstelle des gp91^{phox}-Gens das Markergen GFP tragen, zeigten in X-CGD PLB-985 Zellen Transduktionsraten von 30 bis 40 %. Geht man nun von ähnlichen Effizienzen bei den gp91-Vektoren aus, so konnte trotzdem eine Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität von rund 80 % und mehr erreicht werden.

Dieser Effekt kann der hohen Genexpression, die unter anderem durch Mehrfachintegration entsteht, zugeschrieben werden. Studien mit CD34⁺-Zellen und Stammzellen von X-CGD Patienten sind im weiteren notwendig, um die therapeutische Relevanz zu belegen. Parallel dazu müssen jedoch auch die Vektoren weiter entwickelt werden. Sie enthalten noch eine Reihe von überlappenden Sequenzen, die als präventive Maßnahmen zur Vermeidung von replikationskompetenten Viren bei der Produktion eliminiert werden sollten. Darüber hinaus zeigen jüngste Studien, daß der Einbau eines Polypurintraktes zu einem effizienteren Transport der viralen cDNA beziehungsweise des Präintegrationskomplexes in den Kern führen (Follenzi et al., 2000). Neben der Fortentwicklung des Vektors muß auch die Methodik zur Generierung und Anreicherung der viralen Partikel, sowie das Transduktionsprotokoll der Stammzellen weiter optimiert werden.

6. Zusammenfassung

Der lentivirale Gentransfer in humane blutbildende Stammzellen ist in Hinblick auf eine kurative Gentherapie von angeborenen und erworbenen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems und der Krebstherapie von Bedeutung. Die Fähigkeit, sowohl zu proliferieren als auch in alle hämatopoetischen Linien zu differenzieren, macht die pluripotenten CD34⁺-Stammzellen zu einem idealen Ziel für die dauerhafte Präsenz von Transgenen. Der Erfolg einer Gentherapie ist nicht nur abhängig von der Effizienz des Transfers des therapeutischen Gens in hämatopoetischen Stammzellen, sondern auch von der dauerhaften Expression des Transgens. Ein Modell zur Entwicklung einer somatischen *ex vivo* Gentherapie in hämatopoetischen Stammzellen ist die chronische Granulomatose (CGD). Die Krankheit beruht auf der genetisch bedingten Fehlfunktion der NADPH-Oxidase und ist mit wiederkehrenden, schweren und lebenslang auftretenden Infektionen verbunden. Eindringende Mikroorganismen wie Pilze und Bakterien werden aufgenommen, können jedoch in den phagozytierenden Vakuolen nicht abgetötet werden, da keine Sauerstoffradikale, Wasserstoffperoxid oder Folgeprodukte gebildet werden. Eine somatische Gentherapie, die eine autologe Knochenmarktransplantation mit genetisch modifizierten Zellen vorsieht, könnte CGD-Patienten die Möglichkeit einer kurativen Therapie eröffnen.

Als Grundlage für die Entwicklung einer lentiviralen Gentherapie wurden zunächst lentivirale Vektoren konstruiert und mit diesen die Bedingungen der transienten Transfektion im Hinblick auf einen hohen Virustiter optimiert. Diese Vektoren wurden auf Basis des humanen Immundefizienzvirus (HIV) konstruiert und waren alle aufgrund von Deletionen in 3' LTR selbst-inaktivierend. Das bedeutet, daß nach der reversen Transkription kein viraler Promotor mehr enthalten war, und damit die Transgen-Expression über einen internen Promotor initiiert wurde. Der pSIN-GFP Vektor enthielt grünes Fluoreszenzprotein (GFP) als Markergen und einen internen Cytomegalievirus(CMV)-Promotor. Durch Austausch der Promotor-/“Enhancer“-Sequenzen in der 5'LTR entstand der pCGWS Vektor, der unabhängig vom *Tat*-Transaktivator war. Die Expressionsrate konnte durch Insertion des posttranskriptionell regulatorisch wirkende Element (WPRE), das hinter das Transgene kloniert wurde, erhöht werden. Der pCIGWS Vektor wurde durch Einfügen einer multiple Klonierungsstelle und eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) zwischen dem internen Promotor und dem Transgen generiert. Dieser Vektor erlaubte jedoch nicht, wie gewünscht, die gleichzeitige Detektion der Expression eines Transgens und des Markerproteins.

Die im Rahmen der Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden unterschiedliche Verhältnisse der zur Virusproduktion notwendigen drei Plasmide zueinander ausgetestet. Die beobachteten Schwankungen des Virustiters waren bei den gewählten Verhältnissen nicht

signifikant. Mit der Erhöhung der DNA-Menge an Hüllprotein Plasmid konnte auch in diesem Versuch eine vermehrte Bildung von Synzytien beobachtet werden, die sich negativ auf den Titer auswirkte. Die Behandlung der Transfektionsansätze mit Natriumbutyrat (NaBut) ergab eine deutliche Steigerung des Virustiters, wobei die Steigerung nicht mit dem Titer, der ohne NaBut erreicht wurde, korrelierte. Im Experiment zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Kulturmedien auf den Titer, wurden für die verwendeten Medien keine großen Unterschiede festgestellt.

Bei den Experimenten zur Konzentrierung von infektiösen Viruspartikeln haben sich Ultrazentrifugation, „Low Speed“-Zentrifugation und Anionenaustauschchromatographie als Methoden bewährt. Mit diesen Verfahren konnten konzentrierte Viruslösungen generiert werden, die sehr hohe Transduktionseffizienzen auf Zelllinien zeigten. Mit den angereicherten Viruspartikellösungen konnten auch CD34⁺-Stammzellen erfolgreich transduziert werden. Im Hinblick auf Angaben aus der Literatur konnten vergleichbare Transduktionseffizienzen erzielt werden, wobei hier fast ausschließlich ultrazentrifugierter Virusüberstand verwendet wurde. Mit der Etablierung des chromatographischen Verfahrens zur Anreicherung von Viren konnte ein alternatives System aufgezeigt werden.

Am Modell der X-chromosomal gebundenen chronischen Granulomatose (X-CGD) konnte durch lentiviralen Transfer eines therapeutischen Gens (gp91^{phox}) die funktionelle Rekonstitution der NADPH-Oxidase nachgewiesen werden. Dazu wurden lentivirale Vektoren konstruiert, die gp91^{phox} als therapeutisches Gen enthielten. In molekularbiologischen Untersuchungen konnte zum einen die Integration des Transgens und zum anderen eine hohen Expression des gp91^{phox}-Proteins gezeigt werden. In der durchflußzytometrische Untersuchung konnte für weniger als die Hälfte Zellen einer Modellzelllinie (X-CGD PLB-985-Zellen) eine Transduktion nachgewiesen werden. In den funktionellen Untersuchungen wurde eine Rekonstitution der NADPH-Oxidase Aktivität von 80% und mehr im Vergleich zu PLB-985-Wildtypzellen detektiert. Die hohe funktionelle Rekonstitution bei geringer Transduktionseffizienz war auf eine hohe Expression aufgrund von Mehrfachintegration des Transgens zurückzuführen.

Die Untersuchungen mit den lentiviralen gp91^{phox}-Vektoren haben gezeigt, daß diese gute Voraussetzungen für die Entwicklung einer somatischen Gentherapie für CGD-Patienten mitbringen. Studien mit CD34⁺-Zellen und Stammzellen von X-CGD Patienten sind im weiteren notwendig, um die therapeutische Relevanz zu belegen. Neben der Fortentwicklung des Vektors muß auch die Methodik zur Generierung und Anreicherung der viralen Partikel, sowie das Transduktionsprotokoll der Stammzellen weiter optimiert werden.

7. Literatur

Amado R. G. and Chen I. S. Y., (1999) Lentiviral Vectors – the Promise of Gene Therapy Within Reach?, **Science**, **285** 674.

Anderson W. F. (1992). Human Gene Therapy. **Science**, **256**, 808-813.

Anderson W. K. (1995). End-of-the-year potpourri-1995. **Hum Gene Ther**, **6**, 1505–1506.

Ash J. (1986). Butyrate-induced reversal of herpes simplex virus restriction in neuroblastoma cell. **Virology**, **155**, 584-592.

Asou H., Tashiro S., Hamamoto K., Otsuji A., Kita K. und Kamada N. (1991). Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosomal translocation.. **Blood**, **77**, 2031-2036.

Babior B. M. (1999). NADPH Oxidase: An Update. **Blood**, **93**, 1464-1476.

Bartz S. R., Rogel M. E. und Emerman M. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: *Vpr* is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. **J Virol**, **70**, 2324–2331.

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

Bell J. E. (1998). The neuropathology of adult HIV infection. **Rev Neurol**, **154**, 616-829.

Birnboim H. C. und Doly , J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. **Nucl Acids Res**, **7**, 1513-1523.

Blaese R. M., Culver K. W. und Anderson W. F. (1990). The ADA human gene therapy clinical protocol. **Hum Gene Ther**, **1**, 331–337.

Bohan C., York D. und Srinivasan A. (1987). Sodium butyrate acitvates human immunodeficiency long terminal repeat-directed expression. **Biochem Biophys Res Commun**, **148**, 899–905.

- Borregaard N., Heiple J. M., Simons E. R. und Clark R. A. (1983). Subcellular localization of the *b*-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase. **J Cell Biol**, **97**, 52-61.
- Burns J. C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M. und Yee J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, **90**, 8033–8037.
- Burritt J. B., DeLeo F. R., McDonald C. L., Prigge J. R., Dinauer M. C., Nakamura M., Nauseef W. M. und Jesaitis A. J. (2001). Phage Display Epitope Mapping of Human Neutrophil Flavocytochrome b558. **J Biol Chem**, **276**, 2053-2061.
- Carroll R., Lin J.T., Dacquell E. J., Mosca J. D., Burke D. S. und St. Louis D. C. (1994). A human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based retroviral vector system utilizing stable HIV-1 packaging cell lines. **J Virol**, **68**, 6047-6051.
- Case S. S., Price M. A., Jordan C. T., Yu X. J., Wand L., Bauer G., Haas D. L., Xu D., Stripecke R., Naldini L., Kohn D. B. und Crooks G. M. (1999). Stable transduction of quiescent CD34⁺CD38⁻ human hematopoietic cells by lentiviral vectors. **Proc Natl Acad Sci USA**, **96**, 2988-2993.
- Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.-L., Bouso P., Le Deist F. und Fischer A. (2000). Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. **Nature**, **288**, 669-672.
- Chanock S. J., Faust L. R., Barret D., Bizal C., Maly F. E., Newburger P. E., Reudi J. M., Smith R. M. und Babior B. M. (1992). O₂⁻ production by B lymphocytes lacking the respiratory burst oxidase subunit p47^{phox} after transfection with an expression vector containing a p47^{phox} cDNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, **89**, 10174-10177.
- Chao N. J., Schriber J. R., Grimes K., Long G. D., Negrin R. S., Raimondi C. M., Horning S., Brown S. L., Miller L. und Blume K. G. (1993). Granulocyte colony-stimulating factor “mobilized” peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. **Blood**, **81**, 2031-2035.

- Charneau P., Alizon M. und Clavel F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. **J Virol**, **66**, 2814-2820.
- Charneau P., Mirambeau G., Roux P., Paulous S., Buc H. und Clavel F. (1994). HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. **J Mol Biol**, **241**, 651-662.
- Clark K. R., Liu X., McGrath J. P. und Johnson P.R. (1999). Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. **Hum Gene Ther**, **10**, 1031–1039.
- Clark R. A. (1999). Activation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. **JID**, **179**, 309-317.
- Coffin J. M., in Fields B. N., Knipe D. M. und Howley P. M. (1996). Virology Volume 2. **Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.**
- Cole-Strauss A., Yoon K., Xiang Y., Byrne BC., Rice M. C., Gryn J., Holloman W. K. und Kmiec E. B. (1996). Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonukleotide. **Science**, **273**, 1386–1389.
- Condon C., Watkins S. C., Celluzzi C. M., Thompson K. und Falo L. D. jr. (1996). DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. **Nature Med**, **2**, 122–1128.
- Costantini L. C., Bakowska J. C., Breakefield X. O. und Isacson O. (2000). Gene therapy in the CNS. Millennium Review. **Gene Ther**, **7**, 93–109.
- Cross A. R. und Curnutte J. T. (1995). The cytosolic activating factor p47^{phox} and p67^{phox} have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH-oxidase. **J Biol Chem**, **270**, 6543-6548.
- Dagleish A. G., Beverly P. C. L., Clapham P. R., Crawford D. H., Greaves M. F. und Weiss R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Science**, **312**, 763-768.
- Danthinne X. und Imperiale M. J. (2000). Production for first generation adenovirus vectors: a review. **Gene Therapy**, **7**, 1707–1714.

- DePolo N. J., Reed J. D., Sheridan PI L., Townsend L., Sauter S. L., Jolly D. J. und Dubensky T. W. (2000). VSV-G Pseudotyped Lentiviral Vector Particles Produced in Human Cells Are Inactivated by Human Serum. **Mol Therapy**, **2**, 218-222.
- DeZazzo J. D., Kilpatrick J. E. und Imperiale M. J. (1991). Involvement of long terminal repeat U3 sequences overlapping the transcription control region in human immunodeficiency virus type 1 mRNA 3' end formation. **Mol Cell Biol**, **11**, 1624-1630.
- Dinauer, M. C., Li, L. L., Björgvindóttir, H., Ding, C. und Pech, N. (1999). Long-Term Correction of Phagocyte NADPH Oxidase Activity by Retroviral-Mediated Gene Transfer in Murine X-Linked Chronic Granulomatous Disease. **Blood**, **94**, 3914-922.
- Donhaue R. E., Wersto R. P., Allay J. A., Agricola B. A., Metzger M. E., Nienhuis A. W., Persons D. A. und Sorrentino B. P. (2000). High levels of lymphoid expression of enhanced green fluorescent green protein in nonhuman primates transplanted with cytokine-mobilized peripheral blood CD34⁺ cells. **Blood**, **95**, 445-452.
- Douglas J., Kelly P., Evans J. T. und Garcia J. V. (1999). Efficient Transduction of Human Lymphocytes and CD34⁺ Cells via Human Immunodeficiency Virus-Based Gene Transfer Vectors. **Hum Gene Ther**, **10**, 935-945.
- Douglas J., Kelly P., Evans J. T. und Garcia J. V. (1999). Efficient Transduction of Human Lymphocytes and CD34⁺ Cells via Human Immunodeficiency Virus-Based Gene Transfer Vectors. **Hum Gene Ther**, **10**, 935-945.
- Doussiere J., Brandolin G., Derrien V. und Vignais P. V. (1993). Critical assessment of the presence of an NADPH-binding site on neutrophil cytochrome *b*₅₅₈ by photoaffinity and immunochemical labeling. **Biochemistry**, **32**, 8880-8887.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Phaik-Mooi, L., Miller, J. H., und Calos M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. **Mol Cell Biol**, **7**, 379-387.
- Dusi S., Nadalini K. A., Donini M., Zentilin L., Wientjes F. B., Roos D., Giacca M. und Rossi F. (1998). Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Assembly and Activation in EBV-Transformed B Lymphoblastoid Cell Lines of Normal and Chronic Granulomatous Disease Patients. **J Immunol**, 4968-4974.

- El Benna J., Dang P. M. C., Gaudry M., Fay M. Morel F., Hakim J. und Gougerot-Tocidal M.-A. (1997). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67^{phox} during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase c-dependent and independent pathways. **J Biol Chem**, **272**, 17204-17208.
- El Benna J., Faust L. P., Johnson J. L. und Babior B. M. (1996). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47^{phox} as determined by 2-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A and a mitogen-activated protein kinase (MAP-kinase). **J Biol Chem**, **271**, 6374-6378.
- Evans J. T., Kelly P. F., O'Neill E. und Garcia J. V. (1999). Human Cord Blood CD34⁺CD38⁻ Cell Transduction via Lentivirus-Based Gene Transfer Vectors. **Hum Gene Ther**, **10**, 479-489.
- Farson D., Witt R., McGuinness R., Dull T., Kelly M., Song J., Radeke R., Bukovsky A., Consiglio A. und Naldini L. (2001). A New-Generation Stable Inducible Packaging Cell Line for Lentiviral Vectors. **Hum Gene Ther**, **12**, 981-997.
- Faust L. P., El Benna J., Babior B. M. und Chanock S. J. (1995). The phosphorylation targets of p47^{phox}, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. **J Clin Invest**, **96**, 1499-1505.
- Fink D. J., DeLuca N. A., Yamada M., Wolfe D. P. und Glorioso J. C. (2000). Design and application of HSV vectors for neuroprotection. **Gene Ther**, **7**, 115-119.
- Follenzi A., Ailles L. E., Bakovic S., Geuna M. und Naldini L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 *pol* sequences. **Nature genetics**, **25**, 217-222.
- Forestell S. P., Böhnlein E. und Rigg R. J. (1995). Retroviral end-point titer is not predictive of gene transfer efficiency: implications for vector production. **Gene Ther**, **2**, 723-730.
- Gabig T. G., Crean C. D., Mantel P. L. und Rosli R. (1995). Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. **Blood**, **85**, 804-811.
- Gao G., Qu G., Burnham M. S., Huang J., Chrimule N., Joshi B., Yu Q.-C., Marsh J. A., Conceicao C. M. und Wilson J. M. (2000). Purification of Recombinant Adeno-

- Associated Virus Vectors by Column Chromatograph and Its Performance *in vivo*. **Hum Gene Ther**, **11**, 2079-2091.
- Goldsby R. A., Kindt T. J und Osborne B. A. (2000). Kuby Immunology. **W. H. Freeman and Company, Fourth edition**, 594.
- Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., HillenW. und Bujard H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. **Science**, **268**, 1766-1769.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W.C., und Naish, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol**, **36**, 59-72.
- Grunstein M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature**, **389**, 349–352.
- Hanahan D. (1983). Studies on Transformation of Escherichia coli with plasmids. **J Mol Biol** **166**, 557-580.
- Harui A., Suzuki S., Kochanek S. und Mitani K. (1999). Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. **J Virol**, **73**, 66141–6146.
- Hauswirth W. W., Lewin A. S., Zolotukhin S. und Muzyczka N. (2000). Production and purification of recombinant adeno-associated virus. **Meth Enz**, **316**, 743–761.
- Henderson L. M., Chappell J. B. und Jones O. T. G. (1987). The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel. **Biochem J**, **246**, 325 -329.
- Henderson L. M., Chappell J. B. und Jones O. T. G. (1988). Superoxide generation by the electrogenic NADPH oxidase of human neutrophils is limited by the movement of a compensating charge. **Biochem J**, **255**, 285-290.
- Henon P. R., Liang H., Beck-Wirth G., Eisenmann J. C., Lepers M., Wunder E. und Kandel G. (1993). Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplant. **Bone Marrow Transplant**, **9**, 285-291.
- Hu W. S. und Temin H. M. (1990). Retroviral recombination and reverse transcription. **Science**, **250**, 1227-1233.

- Ilyinskii P. O. und Desrosiers R. C. (1998). Identification of a sequence element immediately upstream of the polypurine tract that is essential for replication of simian immunodeficiency virus. **EMBO J**, **17**, 3766-3774.
- Karfi T., van Praag H., Ouyang L., Gage F. H. und Verma I. M. (1999). A packaging cell Line for lentivirus vectors. **J Virol**, **73**, 576–584.
- Kaul M., Yu H., Ron Y. und Dougherty J. P. (1998). Regulated lentiviral packaging cell line devoid of most viral cis-acting sequences. **Virology**, **249**, 167–174.
- Kay M. A., Glorioso J. C. und Naldini L. (2001). Viral vectors for gene therapy the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nature Med**, **7**, 33–40.
- Kim V. N., Mitrophanou K., Kingsman S. M. und Kingsman A. J. (1995). Minimal Requirement for a Lentivirus Vector Based on Human Immunodeficiency Virus Type I. **J Virol**, **72**, 811-816.
- Kitamura T., Tojo A., Kuwaki T., Chiba S., Miyazoko K., Urabe A. und Takku F. (1989). Identification and analysis of human erythropoietin receptor on a factor-dependent cell line, TF-1. **Blood**, **73**, 375-380.
- Klimatcheva E., Rosenblatt J. D und Planelles V. (1999). Lentiviral Vectors and Gene Therapy. **Frontiers in Biosciences** **4**, June 1, d481-496.
- Knöß H. (1999). Einfluß biologischer und physikalischer Parameter auf die retrovirale Transduktion humaner hämatopoetischer Stammzellen. **Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main..**
- Koch-Brandt (1993). Gentransfer. Prinzipien – Experimente – Anwendung bei Säugern. **Thieme, Stuttgart, New York..**
- Konvalinka J., Litterst M. A., Welder R., Kottler H., Rippmann F., Heuser A. M. und Krausslich H. G. (1995). An activ-site mutation in the human immunodeficiency virus type 1 proteinase (PR) causes reduced PR activity and loss of PR-mediated cytotoxicity without apparent effect on virus maturation and infectivity. **J Virol**, **69**, 7180-7186.
- Krisky D. M. et al. (1998). Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons. **Gene Ther**, **5**, 1593–1603.

- Kung S. K., An D. S. und Chen I. S. (2000). A murine leukemia virus (MuLV) long terminal repeat derived from rhesus macaques in the context of a Lentivirus vector and MuLV *gag* sequence results in high-level gene Expression in human T lymphocytes. **J Virol**, **74**; 3668-3681.
- Landau N. R., Page K. A. und Littman D. R. (1991). Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. **J Virol**, **65**, 162-169.
- Le Doux J. M., Morgan J. R., Snow R. G. und Yarmush L. M. (1996). Proteoglycans Secreted by Packaging Cell Lines Inhibit Retrovirus Infection. **J Virol**, **70**, 6468-6473.
- Li C. J., Friedman D. J., Wang C., Metelev V. und Pardee A. B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-*Tat* protein. **Science**, **268**, 429-431.
- Li F., Linton G. F., Sekhsaria S., Whiting-Theobald N., Katkin J. Pl., Gallin J. I. und Malech H. L. (1994). CD34⁺ peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of the two flavocytochrome b558 defective forms of chronic granulomatous disease. **Blood**, **84**, 53-58.
- Li S. und Huang L. (2000). Nonviral gene therapy promises and challenges. **Gene therapy**, **7**, 31-34.
- Lieber A., Steinwaerder D., Carlson C. und Kay M. (1999). Integrating adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. **J Virol**, **73**, 9314-9324.
- Liebig H. D., Ziegler E., Yan R., Hartmuth K., Klump H., Kowalski H., Blass D., Sommergruber W., Frasel L., Lamphear B., et al. (1993). Purification of two picornaviral 2 A proteinases: interaction with eIF-4 γ and influence on *in vitro* translation. **Biochemistry**, **32**, 7518-7588.
- Liu M.-L., Winther B. L. und Kay M. A. (1996). Pseudotransduction of Hepatocytes by Using Concentrated Pseudotyped Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein (VSV-G)-Moloney Murine Leukemia Virus-Derived Retrovirus Vectors: Comparison of VSV-G and Amphotropic Vectors for Hepatic Gene Transfer. **J Virol**, **70**, 2497-2502.

- Lyles D. S. und McKenzie M. O. (1997). Activity of vesicular stomatitis virus M protein mutants in cell rounding is correlated with the ability to inhibit host gene expression and is not correlated with virus assembly function. **Virology**, **229**, 77-89.
- Malech H. L. et al. (1997). Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, **94**, 12133-12138.
- Maly F. E., Cross A. R., Jones O. T., Wolf-Vorbeck G., Walker C., Dahinden C. A. und De Weck A. L. (1988). The superoxide generating system of B cell lines. Structural homology with the phagocytic oxidase and triggering via surface Ig. **J Immunol**, **14**, 2334-2339.
- Maly F. E., Nakamura M., Gauchat J. F., Urwyler A., Walker C., Dahinden D. A., Cross A. R., Jones O. T. G. und De Weck A. (1989). Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome b₂₄₅ components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. **J Immunol**, **142**, 1260-1265.
- Maly F. E., Schuer-Maly C. C., Quillian L., Cochrane C. G., Newburger P. E., Curnutte J. T., Gifford M. und Dinauer M. C. (1993). Reconstitution of superoxide generation in autosomal cytochrome-negative chronic granulomatous disease (A22(0) CGD)-derived B lymphocyte cell lines by transfection with p22^{phox} cDNA. **J Exp Med**, **178**, 2047-2053.
- Matsushita T. et al. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. **Gene Ther**, **5**, 938-945.
- Mayo, A. L. und Curnutte, J. T. (1990). Kinetic Microplate Assay for Superoxid Production by Neutrophils and Other Phagocytic Cells. **Methods in Enzymology**, **186**, 567-575.
- McNeish I. A., Green N. K., Gilligan M. G., Ford M. J., Mautner V., Young L. S., Kerr D. J. und Searle P. F. (1998). Virus directed enzyme prodrug therapy for ovarian and pancreatic cancer using retrovirally delivered E. coli nitroreductase and CB 1954. **Gene Ther**, **5**, 1061-1069.
- Mertelsmann R. (2000). Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **J Hematother Stem Cell Res**, **9**, 957-960.

- Miller, A. D., Garcia, J.V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., und Eiden, M. V. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. **J Virol** **65**, 980-990.
- Miyazaki Y., Takamatsu T., Nosaka T., Fujita S., Martin T. E. und Hatanaka M. (1995). The cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 1 *Rev*: Implications for its interaction with the nucleolar protein B23. **Exp Cell Res**, **219**, 93-101.
- Miyoshi H., Smith K. A., Mosier D. E., Verma I. M. und Torbett B. E. (1999). Transduction of Human CD34⁺ Cells That Mediate Long-Term Engraftment of NOD/SCID Mice by HIV Vectors. **Science**, **283**, 682-686.
- Miyoshi H., Takahaschi M., Gage F. H. und Verma I. M. (1997). Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral Vector. **Proc Natl Acad Sci USA**, **94**, 10319-10323.
- Morling F. J. und Russell S. J. (1995). Enhanced transduction efficiency of retroviral vectors coprecipitated with calcium phosphate. **Gene Ther**, **2**, 504-508.
- Mullis K. B. und Faloona, F. (1986). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Meth Enzymol**, **155**, 335-350.
- Mullis K. B., Faloona, F., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn G. T und Erlich, H. A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : the polymersase chain reaction. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, **51 pt 1**, 263-273.
- Nabel G. J., Gordon D., Bishop D. K. et al. (1996). Immune response in human melanoma after transfer of an allogeneic class I major histocompatibility complex gene with DNA-liposome complexes. **Proc Natl Acad Sci USA**, **93**, 15388–15393.
- Nakauchi H. (1998). Hematopoietic stem cells: Are they CD34-positive or CD34-negative?. **Nat Med**, **4**; 1009-1010.
- Nanda A., Grinstein S. und Curnutte J. T. (1993). Abnormal activation of H⁺ conductance in NADPH oxidase-defective neutrophils. **Proc Natl Acad Sci USA**, **90**, 760-764.
- Nanda A., Romanek R., Curnutte J. T. und Grinstein S. (1994). Assessment of the contribution of the cytochrome b moiety of the NADPH oxidase to the transmembrane H⁺ conductance of leukocytes. **J Biol Chem**, **269**, 27280-27285.

- Nauseef W. M., Volpp B. D., McCormick S., Leidal K. G. und Clark R. A. (1991). Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. **J Biol Chem**, **266**, 5911-5917.
- Nisimoto Y., Otsuka-Murakami H. und Lambeth D. J. (1995). Reconstitution of flavin-depleted neutrophil flavocytochrome b558 with 8-mercapto-FAD and characterization of the flavin-reconstituted enzyme. **J Biol Chem**, **270**, 16428-16434.
- Nunoi H. und Ishibashi F. (1999). Gene therapy for inherited diseases using hematopoietic stem cells – gene therapy for patients with chronic granulomatous disease. **Hum Cell**, **12**, 103-108.
- Ohlmann T., Rau M., Pain V. M. und Morley S. J. (1996). The c-terminal domain of eucaryotic protein synthesis initiation factor (eIF)4G is sufficient to support cap independent translation in the absence of eIF4E. **EMBO J**, **15**, 1371-1382.
- Ory D. S., Neugeboren B. A. und Mulligan R. C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. **Proc Natl Acad Sci USA**, **93**, 11400-11406.
- Osanto S., Brouwenstyn N., Vaessen N., Figdor C. G., Melief C. J. und Schrier P. I. (1993). Immunization with interleukin-2 transfected melanoma cell. A phase I-II study in patients with metastatic melanoma. **Hum Gene Ther**, **4**, 323–330.
- Page K. A., Landau N. R. und Littman D. R. (1990). Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. **J Virol**, **64**, 5270-5276.
- Parolin C., Dorfman T., Palu G., Gottlinger H und Sodroski J. (1994). Analysis in human immunodeficiency virus Type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. **J Virol**, **68**, 3888-3895.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. **Proc Natl Acad Sci USA**, **90** 8392-8396.

- Porter C. D., Parkar M. H., Collins M. K. L., Levinsky R. J. und Kinnon C. (1996). Efficient retroviral transduction of human bone marrow progenitor and long-term culture-initiating cells: Partial reconstitution of cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease by gp91^{phox} expression. **Blood**, **87**, 3722-3730.
- Porter C. D., Parkar M. H., Collins M. K. L., Levinsky R. J. und Kinnon C. (1992). Superoxide production by normal and chronic granulomatous disease (CGD) patient-derived EBV-transformed B cell lines measured by chemiluminescence-based assays. **J Immun Meth**, **155**, 151-157.
- Porter, C. D., Parkar, M. H., Collins, M., Levinsky, R. J. und Kinnon, C. (1992). Superoxid production by normal and chronic granulomatous disease (CGD) patient-derived EBV-transformed B-Cell lines measured by chemiluminescence-based assays. **J Immunol Methods**, **155**, 151-157.
- Prior C., Bay B., Ebert B., Gore R., Holt J., Irisch T., Jensen F., Leone C., Mitschelen J., Siglitz M., Tarr C., Trauger R. J., Weber D. und Hrinda M. (1995). Process Development for the Manufacture of Inactivated HIV-1. **BioPharm**, **8**, 25-35.
- Prior C., Gore R., Harter J., Berbaum M., Duffy C., Ferre F., Hancock R., Lowry P., Musil R., Siglitz M., Carlo D. J., Richieri S. P. und Maigetter R. Z. (1996). Inactivation and purification of human immunodeficiency virus-1 as antigen for the treatment of HIV-1 infection. **BioPharm**, **9**, 22-34.
- Radsak K., Fuhrmann R., Franke P., Schneider D., Kollert A., Brucher K. H., und Drenckhahn D. (1989). Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells. **Arch Virol**, **107**, 151 – 158.
- Ravel P. und Lederer F. (1993). Affinity-labeling of an NADPH-binding site on the heavy subunit of flavocytochrome *b*₅₅₈ in particulate NADPH oxidase from activated human neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun** **196**, 543-552.
- Recchia A., Parks R. J., Lamartina S., Toniatti C., Pieroni L., Palombo F., Ciliberto G., Graham F. L., Cortese R., LaMonica N. und Colloca S. (1999). Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector. **Proc Natl Acad Sci USA**, **96**, 2615–2620.

- Reiser J., Harminson G., Kluepfel-Stahl S., Brady R. O., Karlsson S. und Schubert M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type I particles. **Proc Natl Acad Sci USA**, **93**, 15266-15271.
- Richieri S., Bartholomew R., Aloia R. C., Savary J., Gore R., Holt J., Ferre F., Carlo D. J., Maigetter R. Z. und Prior C. (1998). Characterization of highly purified, inactivated HIV-1 particles isolated by anion exchange chromatography. **Vaccine**, **16**, 1403–1416.
- Rizzuto C. D., Wyatt R., Hernández-Ramos N., Kwong P. D. et al. (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. **Science**, **280**, 1949-1953.
- Rizzuto G., Cappelletti M., Maine D., Savino R., Lazzaro D., Costa P., Mathiesen I., Cortese R., Ciliberto G., Laufer R., LaMonica N. und Fattori E. (1999). Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. **Proc Natl Acad Sci USA**, **96**, 6417–6422.
- Roberts P. C, Kippermna T. und Compans R. W. (1999). Vesicular Stomatitis Virus G Protein Acquires pH-Independent Fusion Activity during Transport in a Polarized Endometrial Cell Line. **J Virol**, **73**, 10447-10457.
- Rols M. P., Delteil C., Golzio M., Dumond P., Cross S. und Teissie J. (1998). *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. **Nat Biotech**, **16**, 168–171.
- Romano G., Pacilio C. und Giordano A. (1999). Gene Transfer Technology in Therapy Current Applications and Future Goals. **Stem Cells**, **17**, 191–202.
- Roos D., de Boer M., Kuribayashi F., Meischl C., Weening R. S., Segal A. W., Åhlin A., Nemet K., Hossle J. P., Bernatowska-Matuszkiewicz E. und Middleton-Price H. (1996). Mutations in the X-Linked and Autosomal Recessive Forms of Chronic Granulomatous Disease. **Blood**, **87**, 1663-1681.
- Rosenberg S. A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R. A., Moen R., Karson E. M., Lotze M. T., Yang J. C., Topalian S. L. et al. (1990). Gene transfer into humans - immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **N Engl J Med**, **323**, 570–578.

- Rutter G. und Mannweiler K. (1977). Alterations of actin-containing structures in BHK-21 cells infected with Newcastle disease virus and vesicular stomatitis virus. **J Gen Virol**, **37**, 233-242.
- Saemundosen A. K., Kallin B. und Klein G. (1980). Effect of n-butyrate on cellular and viral DNA synthesis in cells latently infected with Epstein-Barr virus. **Virology**, **170**, 557-561.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn G. T., Mullis K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**, 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich, H. A und. Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, **230**, 1350-1354.
- Sakoda T., Kasahra N., Hamamori Y. und Kedes L. (1999). A high-titer lentiviral production system mediates efficient transduction of differentiated cells including beating cardiac Myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, **31**, 2037-2047.
- Sambrock, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2nd edition). **Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, N. Y...**
- Sathyamoorthy M., de Mendez I., Adams A. G. und Leto T. L. (1997). p40^{phox} down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domains. **J Biol Chem**, **272**, 9141-9147.
- Saulnier S. O., Steinhoff D., Dinauer M. C., Zufferey R., Trono D., Seger R. A. und Hossle J. P. (2000). Lentivirus-mediated gene transfer of gp91^{phox} corrects chronic granulomatous disease (CGD) phenotype in human X-CGD cells. **J Gene Med**, **2**, 317-325.
- Schrenzel J, Serrander L., Banfi B., Nusse O., Fouyouzi R., Lew D. P., Demaurex N. und Krause K. H. (1998). Electron current generated by the human phagocyte NADPH oxidase. **Nature**, **392**, 734-737.
- Sekhsaria S., Gallin J. I., Linton G. F., Mallory R.M., Mulligan R. C. und Malech H. L. (1993). Peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of p47^{phox}-deficient chronic granulomatous disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, **90**, 7446-7450.

- Simon K. O., Whitaker-Dowling P. A., Younger J. S. und Widnell C. C. (1990). Sequential disassembly of the cytoskeleton in BHK-21 cells infected with vesicular stomatitis virus. **Virology**, **177**, 289-297.
- Smith R. M., Connor J. A., Chen L. M. und Babior B. M. (1996). The cytosolic subunit p67^{phox} contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH-oxidase. **J Clin Invest**, **98**, 977-.
- Sokolic R. A., Sekhsaria S., Sugimoto Y., Whiting-Theobald N., Linton G. F., Li F., Gottesman M. M. und Malech H. L. (1996). A bicistronic retrovirus vector containing a picornavirus internal ribosome entry site allows for correction of X-linked CGD by selection for MDR-1 expression. **Blood**, **87**, 42-50.
- Soneoka Y., Cannon P. M., Ramsdale E. E., Griffiths J. C., Romano G., Kingsman S. M. und Kingsman A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. **Nucleic Acid Res**, **23**, 628-633.
- Soriano P., Friedrich G. und Lawinger P. (1991). Promoter interactions in retrovirus vectors introduced into fibroblasts and embryonic stem cells. **J Virol**, **65**, 2314-2319.
- Srinivasakumar N., Chazal N., Helga-Maria C., Prasad S., Hammarskjold M. L. und Rekosh D. (1997). The effect of viral regulatory protein expression on gene delivery by human immunodeficiency virus type 1 vectors produced in stable packaging cell lines. **J Virol**, **71**, 5841-5848.
- Subramanian A., Ranganathan P und Diamond S. L. (1999). Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. **Nat Biotech**, **17**, 973-877.
- Sutton R. E., Reitsma M. J., Uchida N. und Brown P. O. (1999). Transduction of Human Progenitor Hematopoietic Stem Cells by Human Immunodeficiency Virus Typ 1-Based Vectors is Cell Cycle Dependent. **J Virol**, **73**, 3649-3660.
- Sutton R. E., Wu H. R. M., Rigg R., Böhnlein E. und Brown P. O. (1998). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vectors Efficiently Transduce Human Hematopoietic Stem Cells. **J Virol**, **72**, 5781-5788.

- Tang H., McDonald D., Mellesworth T., Hope T und Wong-Staal F. (1999). The carboxyl terminus of RNA helicase A contains a bidirectional nuclear transport domain. **Mol Cell Biol**, **19**, 3540-3550.
- Thrasher A., Chetty M., Casimir C. und Segal A. W. (1992). Restoration of superoxide generation to a chronic granulomatous disease-derived B-cell line by retrovirus mediated gene transfer. **Blood**, **80**, 1125-1129.
- Thrasher A., de-Alwis M., Casimir C., Kinnon C., Page , Lebkowski J., Segal A. W. und Levinsky R. J. (1995). Functional reconstitution of the NADPH oxidase by adeno-associated virus gene transfer. **Blood**, **86**, 761-765.
- Tom Hollon (2000). Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. **Nat Med**, **6**, 6.
- Trkola A., Dragic T., Arthos J., Binley J. M., Olson B. W., et al. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. **Nature**, **384**, 184-187.
- Trono D. (1992). Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. **J Virol**, **66**, 4893-4900.
- Tsunawaki S., Kagara S., Yoshikawa K., Qoshida L. S., Kuratsuji T. und Namiki H. (1996). Involvement of p40^{phox} in acitivation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not ist amino-terminal, with p67^{phox}. **J Exp Med**, **184**, 893-902.
- Uchida N., Sutton R. E., Freira A. M., He D., Reitsma M. J., Chang W. C., Veres G., Scollay R. und Weissman I. L. (1998). HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G₀/G₁ human hematopoietic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, **95**, 11939-11944.
- Ulmer J. B. et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral poein. **Science**, **259**, 1745–1749.
- Valsamakis A., Schek N. und Alwine J. C. (1992). Elements upstream of the AAUAAA within the human immunodeficiency virus polyadenylation signal are required for efficient polyadenylation *in vitro*. **Mol Cell Biol**, **12**, 3699-3705.

- Valsamakis A., Zeichner S., Carswell S. und Alwine J. C. (1991) The human immunodeficiency virus type I polyadenylation signal: a 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88** 2108-2112.
- Verhoeven, A. J., Bolscher B.G.J.M., Meerhof, L. J., Van Zwieten, R., Keijer, J., Weening, R. S. und Roos, D. (1989). Characterization of two monoclonal antibodies against cytochrome b₅₅₈ of human neutrophils. **Blood**, **73**, 1686-1692.
- Vigna E. und Naldini L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. **J Gene Med**, **2**, 308-316.
- Volkman, D. J., Buescher, E. S., Gallin, J. I. und Fauci, A. S. (1984). B cell lines as model for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxid generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Hagashi syndrome. **J Immunol**, **133**, 3006-3011.
- Volpp B. D. und Lin Y. (1993). *In vitro* molecular reconstitution of the respiratory burst in B-Lymphoblasts from p47^{phox}-deficient chronic granulomatous disease. **J Clin Invest**, **91**, 201-207.
- Walach T. M. und Segal A. W. (1996). Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b₅₅₈ of the NADPH oxidase of phagocytes. **Biochem J**, **320**, 33-38.
- Wiao X., Li J. und Samulski R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. **J Virol**, **72**, 2224-2232.
- Woods N.-B., Fahlman C., Mikkola H., Hamaguchi I., Olsson K., Zuffrey R., Jacobsen S. E., Trono D. und Karlsson S. (2000). Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. **Blood**, **96**, 3725-3733.
- Wu L., Gerard N.P., Wyatt R., Coe H., Parolin C., et al. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. **Nature**, **384**, 179-183.
- Yang N. S. 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.

- Yee J.-K., Meyanohara A., LaPorte P., Bouic K., Burns J. C. und Friedmann T.: (1994). A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: Highly efficient infection of primary hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**, **91**, 9564-9568.
- Yu H., Rabson A. B., Kaul M., Ron Y. und Dougherty J. P. (1996). Inducible human immunodeficiency virus type 1 packaging cell lines. **J Virol**, **70**, 4530-4537.
- Zaitseva M., Blauvelt A., Lee S., Lapham C. K., Klaus-Kovtun V., Mostowski H., Manischewitz J. und Gloding H. (1997). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. **Nat Med**, **3**, 1369-1375.
- Zennou V., Petit C., Guetard D., Nerhbass U., Montagnier L. und Charneau P. (2000). HIV-1 Genome Nuclear Import Is Mediated by a Central DNA Flap. **Cell**, **1001**, 173-185.
- Zentilin L., Tafuro S., Grassi G., Garcia R., Ventura A., Baralle F., Falaschi A. und Giacca M. (1996). Functional reconstitution of oxidase activity in X-linked chronic granulomatous disease by retrovirus-mediated gene transfer. **Exp Cell Res**, **225**, 257-267.
- Zentilin L., Tauro S., Serra C., Falaschi A. und Giacca M. (1998). Gene therapy of chronic granulomatous disease (CGD) by gene transfer into hematopoietic stem cells. **Ann Ist Super Sanita**, **34**, 447-455.
- Zhang H., Duan L. X., Dornadula G et al. (1995). Increasing transduction of endogenous reverse transcription: potential utility for genetic therapies. **J Virol**, **69**, 3929-3932.
- Zhang K., Papageorge A. G., Martin P., Vass W. C., Olah Z., Polakis P. G., McCormick F. und Lowy D. R. (1992). Heterogeneous amino acids in Ras and Rap1A specifying sensitivity to GAP proteins. **Science**, **254**, 1630-1634.
- Zhen L., King A. A. J., Xiao Y., Chanock S. J., Orkin S. H. und Dinuer M. C. (1993). Gene targeting of X chromosom-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91^{phox}. **Proc Natl Acad Sci USA**, **90**, 9832-9836.
- Zufferey R., Donello J. E., Trono D. und Hope T. J. (1999). Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors. **J Virol**, **73**, 2886-2892.

Zufferey R., Dull T., Mandel R. J., Bukovsky A., Quiroz D., Naldini L. und Trono D. (1998).
Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient *In vivo* Gene Delivery. **J
Virol**, **72**, 9873-9880.