



***Resistenz polyklonaler, reifer T-Zellen gegenüber der
Transformation durch retrovirale Transduktion***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15
Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Sebastian Newrzela
aus Dessau

Frankfurt am Main, 2008
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der
Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. von Laer

Datum der Disputation: 24.07.2008

Für Joanna und Tristan

"I wanna witness all of your dreams"

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt all jenen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz für die freundliche Betreuung und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit danken.

Ganz besonders danke ich Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer für die Überlassung des spannenden Themas und das Privileg meine Arbeit in Ihrer Gruppe anfertigen zu dürfen. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die intensive wissenschaftliche Betreuung waren für das Gelingen dieser Arbeit fundamental. Darüber hinaus möchte ich Ihre engagierte Förderung meiner Person hervorheben. Ich danke Ihr für alle wissenschaftlichen Möglichkeiten und kostbaren Erfahrungen. Ihre Arbeitsmoral, Ihr Tatendrang und Ihre Kreativität werden für mich immer vorbildlich sein.

Prof. Dr. Christopher Baum und Dr. Zhixiong Li an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) danke ich für die Bereitstellung des SF91- Δ TrkA Vektors und die freundliche Kooperation. Weiterhin danke ich Dr. Johann Meyer (MHH) für die Durchführung des Δ TrkA Western-Blots, sowie Dr. Martijn Brugman (MHH) für die bioinformatischen Integrationsanalysen.

Prof. Dr. Boris Fehse und Kerstin Cornils an dem Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität danke ich für die Durchführung der LM-PCR Reaktionen, sowie für die stetige Diskussionsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung.

Prof. M.-L. Hansmann und Dr. Sylvia Hartmann an dem Pathologischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität danke ich für die Beurteilung der histologischen Organpräparate und die freundliche Kooperation.

Ganz speziell danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Laer. Die einmalige Hilfsbereitschaft, freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre haben maßgeblichen Anteil am Erfolg meiner Dissertation. Besonders möchte ich mich bei Marianne Hartmann und Janine Kimpel für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche, die Diskussionsbereitschaft und das familiäre Arbeitsklima bedanken. Außerordentlich möchte ich mich bei Dr. Felix

Hermann bedanken, dessen immenses Wissen, Kreativität und freundschaftlicher Rat von unschätzbarem Wert waren. Für ihre Arbeiten am Immorto-Klon danke ich Julia Schläger, Ji-Hee Yi, Olga Lysenko und Tim Heinrich. Weiterhin möchte ich Dr. Roland Zahn, Dr. Alexander Szyroki und Dr. Gunda Brandenburg für ihre Freundschaft, die Einführung in einige Arbeitstechniken und die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Fragestellung danken. Für die Hilfe bei molekularbiologischen und Zellkulturexperimenten möchte ich mich bei dem unfassbaren Tefik Merovci und Patricia Schult-Dietrich bedanken.

Für die Pflege und Zucht der Versuchstiere danke ich besonders Sabrina Lehmen.

Allen Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses möchte ich für das hilfsbereite, kollegiale und wissenschaftlich stimulierende Umfeld danken.

Meinen Jungs: Nari (my man), Mike und Chris (oder: Mike, Chris und Nari; oder: Chris, Nari und Mike). Danke für alles, Ihr seid die Besten!

Zu ewiger Dankbarkeit bin ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern verpflichtet, die mich bei jedem Schritt meines Lebens unterstützt und diese Arbeit erst ermöglicht haben. Ich danke meinem Bruder Michael, auf dessen Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

Meiner Frau Joanna danke ich für Ihren großen Rückhalt und Ihre Geduld. Die aufbauenden Worte und Ihre liebevolle Unterstützung waren in den letzten Jahren eine Quelle der Inspiration und Kraft.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 GENTHERAPIE	3
1.1.1 DEFINITION DER GENTHERAPIE	3
1.1.2 ANFÄNGE UND ANWENDUNGSFELDER DER GENTHERAPIE	4
1.1.3 VIRALE GENTRANSFER-VEKTOREN	7
1.2 RETROVIREN	9
1.2.1 DIE ENTDECKUNG DER RETROVIREN	9
1.2.2 DIE KLASSEN DER RETROVIREN	10
1.2.3 VIRUSPARTIKEL UND GENOM DER RETROVIREN	10
1.2.4 REPLIKATIONSZYKLUS DER RETROVIREN	13
1.2.5 RETROVIRALE INTEGRATION	14
1.2.6 GEMEINSAME INTEGRATIONSSTELLEN (CIS)	16
1.3 RETROVIRALE VEKTOREN	17
1.4 HÄMATOPOETISCHE ZIELZELLEN DES RETROVIRALEN GENTRANSFERS	20
1.4.1 HÄMATOPOETISCHE STAMM- UND VORLÄUFERZELLEN (HSC/HPC)	20
1.4.2 REIFE T-ZELLEN IN DER GENTHERAPIE	22
1.4.2.1 Entwicklung reifer T-Zellen	23
1.4.2.2 Homeostatische Proliferation	24
1.4.3 SIMULATION DER HUMANEN HÄMATOPOESE: DAS MAUSMODELL	25
1.5 GENOTOXIZITÄT INTEGRIERENDER VEKTOREN AM BEISPIEL DER SCID-X1 GENTHERAPIE-STUDIE	26
1.6 LEUKÄMIE, DIE MALIGNEN HÄMATOPOESE	28
1.6.1 T-ALL UND DIE ROLLE DER (PROTO-)ONKOGENE LMO2 UND Δ TRKA	30
1.6.2 LYMPHOME UND REIFZELLIGE T-ZELL LEUKÄMIEN/LYMPHOME	32
1.6.3 LEUKÄMISCHE STAMMZELLEN, DAS POTENTIAL DER SELBSTERNEUERUNG	33
1.7 ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	35
2. MATERIAL	36
2.1 LABORCHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMITTEL	36
2.2 LÖSUNGEN, PUFFER UND KULTURMEDIENTEN	37
2.3 GERÄTE	39
	VI

2.4 VERWENDETE KITS	41
2.5 LABORMATERIALIEN	41
2.6 ANTIKÖRPER	42
2.7 PEPTIDE UND ZYTOKINE	43
2.8 VERWENDETE PLASMIDE UND VEKTOREN	44
2.9 BAKTERIEN	45
2.10 OLIGONUKLEOTIDE	45
2.11 ENZYME UND GRÖßENSTANDARDS	47
2.12 ZELLINIEN UND MEDIEN MIT ZUSÄTZEN	48
2.13 MATERIALIEN FÜR TIEREXPERIMENTE	48
2.13.1 MAUSSTÄMME UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	48
2.13.2 TIEREXPERIMENTELLE MATERIALIEN	49
3. METHODEN	50
<hr/>	
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	50
3.1.1 RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNA DURCH ENDONUKLEASEN	50
3.1.2 ERZEUGUNG VON „GLATTEN“ RESTRIKTIONSENDEN DURCH KLENOW	50
3.1.3 5' - DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA- FRAGMENTEN	50
3.1.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	51
3.1.5 GEL-EXTRAKTION ZUR ISOLIERUNG VON DNA	51
3.1.6 LIGATION VON DNA- FRAGMENTEN	52
3.1.7 TRANSFORMATION	52
3.1.8 PLASMIDPRÄPARATIONEN	53
3.1.8.1 Analytische Plasmidpräparation (Minipräp)	53
3.1.8.2 Präparative Plasmidpräparation	54
3.1.9 ANLEGEN VON GLYCERINKULTUREN	54
3.1.10 DNA-ISOLIERUNG AUS BLUT, ZELLSUSPENSIONEN UND GEWEBEN	55
3.1.11 POLYMERASENKETTENREAKTION (PCR)	55
3.1.12 RNA-ISOLIERUNG UND RT-PCR	57
3.1.13 SEQUENZIERUNGEN	57
3.1.14 LIGATIONSVERMITTELTE PCR (LM-PCR) UND INTEGRATIONSANALYSE	58
3.1.15 WESTERN-BLOT	62
3.1.15.1 Lyse von Zellen	62
3.1.15.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Zelllysate	62
3.1.15.3 Elektro-Blotting	63
3.1.15.4 Immundetektion durch Chemilumineszenz	64
3.1.15.5 Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen	65

3.2 ZELLKULTURARBEITEN	65
3.2.1 ALLGEMEINE ZELLKULTURBEDINGUNGEN	65
3.2.2 KULTIVIERUNG VON SÄUGETIERZELLEN	66
3.2.2.1 Passagierung adhärenter Zelllinien	66
3.2.2.2 Analyse einer immortalisierten T-Zell Population	66
3.2.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG	67
3.2.3.1 Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer	67
3.2.3.2 Zellzahlbestimmung mithilfe des Zellzählgeräts	68
3.2.4 ANLEGEN VON KRYOKULTUREN	68
3.2.5 AUFTAUEN VON KRYOKULTUREN	69
3.2.6 ISOLIERUNG UND STIMULIERUNG MURINER BLUT(STAMM)ZELLEN	69
3.2.6.1 Isolierung von primären, murinen MNCs	69
3.2.6.2 Beschichtung von Epoxy-Beads mit mAbs: α -CD3 und α -CD28	70
3.2.6.3 Stimulierung von primären, murinen T-Lymphozyten	70
3.2.6.4 Isolierung von murinen Sca1 ⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark	71
3.2.7 PRODUKTION ECOTROPER VIRUSPARTIKEL	72
3.2.7.1 Transiente Transfektion	72
3.2.7.2 Titration der produzierten Vektorpartikel auf SC1-Zellen	73
3.2.8 TRANSDUKTION MIT RETRONEKTIN BESCHICHTETEN PLATTEN	74
3.3 TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	75
3.3.1 TIERHALTUNGSBEDINGUNGEN	75
3.3.2 GENOTYPISIERUNG DER RAG-1 DEFIZIENTEN EMPFÄNGERTIERE	75
3.3.3 BLUTENTNAHME FÜR FACS UND HÄMOGRAMM	76
3.3.4 TÖTUNG UND SEKTION DER TIERE	77
3.3.5 AUFARBEITUNG DER ORGANE FÜR FACS UND HISTOLOGIE	77
3.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS-ANALYSE)	78
3.4.1 FÄRBUNG VON EINZELZELLSUSPENSIONEN	79
3.4.2 FÄRBUNG VON LEUKOZYTEN AUS BLUT	79
4. ERGEBNISSE	80
4.1 KLONIERUNG DER GAMMARETROVIRALEN VEKTOREN	80
4.2 VERWENDETES MAUSMODELL: TRANSPLANTATIONSPRINZIP UND ZEITLICHER ABLAUF	81
4.3 LIMITATIONEN DES VERWENDETEN MAUSMODELLS	82
4.3.1 STRAHLUNGSINDUZIERTER LYMPHOMENTWICKLUNG	82
4.3.2 MASSIVE KOLITIS NACH T-ZELL TRANSPLANTATION	83
4.4 VERGLEICHBARE RETROVIRALE TRANSDUKTION UND EXPRESSION DER ONKOGENE IN MURINEN STAMMZELLEN UND REIFEN T-ZELLEN BZW. DEREN UNREIFEN VORSTUFEN	84
4.4.1 TRANSDUKTIONSEFFIZIENZEN UND PERIPHERE REPOPULIERUNG	84
4.4.2 LYMPHATISCHE ORGANE UND DIREKTE ONKOGENEXPRESSSION	85

4.5 ONKOGENE TRANSFORMIEREN PRIMÄRE, MURINE BLUTSTAMM- ZELLEN NACH RETROVIRALER TRANSDUKTION	88
4.6 INTEGRATIONSANALYSE DER GAMMARETROVIRAL INDUZIERTEN LEUKÄMIEN/LYMPHOME	92
4.7 ROLLE DER RAG-1 INDUZIERTEN TCR-REKOMBINATION BEI DER LEUKÄMIEENTWICKLUNG IM VORLIEGENDEN VERSUCHSAUFBAU	95
4.8 POLYKLONALE, REIFE T-ZELL POPULATIONEN KÖNNEN NICHT DURCH RETROVIRALE TRANSDUKTION MIT ONKOGENEN TRANSFORMIERT WERDEN	96
4.9 MONOKLONALE T-ZELL POPULATIONEN KÖNNEN NACH RETROVIRALER TRANSDUKTION TRANSFORMIERT WERDEN	97
4.10 IMMORTALISIERUNG EINER REIFEN, POLYKLONALEN T-ZELL POPULATION IN KULTUR	100
4.11 KLONALITÄT UND WACHSTUMSVERHALTEN DER <i>IN VITRO</i> IMMORTALISIERTEN T-ZELL POPULATION	102
5. DISKUSSION	106
5.1 TRANSFORMATION MURINER BLUTSTAMMZELLEN NACH GAMMA- RETROVIRALER TRANSDUKTION	106
5.1.1 PHÄNOTYPEN DER HSC/HPC INDUZIERTEN TUMORE	107
5.1.2 INTEGRATIONSANALYSE DER GENERIERTEN LEUKÄMIEN/LYMPHOME	108
5.2 TRANSFORMATIONSRESISTENZ POLYKLONALER, REIFER T-ZELLEN	109
5.2.1 EXPRESSIONSPROFILE POLYKLONALER, REIFER T-ZELLEN IM VERGLEICH ZU MURINEN BLUTSTAMMZELLEN	109
5.2.2 MÖGLICHE MECHANISMEN/GRÜNDE FÜR DIE TRANSFORMATIONS-RESISTENZ POLYKLONALER, REIFER T-ZELLEN	110
5.3 EINSCHRÄNKUNGEN DES VERWENDETEN MODELLS	111
5.4 ENTWICKLUNG REIFER T-ZELL LEUKÄMIEN/LYMPHOME NACH TRANSDUKTION MONOKLONALER OT-I T-ZELLEN	113
5.5 IN VITRO IMMORTALISIERUNG POLYKLONALER, REIFER T-ZELLEN	116
5.6 SCHLUSSFOLGERUNGEN	117
6. LITERATURVERZEICHNIS	118
7. ANHANG	133
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	133
7.2 PLASMIDKARTEN	135

7.3 PHÄNOTYPEN DER HSC/HPC INDUZIERTEN TUMORE	138
7.4 INTEGRATIONSANALYSE DER HSC/HPC INDUZIERTEN TUMORE	142
<u>8. WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN UND VORTRÄGE</u>	<u>147</u>
8.1 WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN	147
8.2 VORTRÄGE	147
<u>LEBENS LAUF</u>	<u>148</u>
<u>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</u>	<u>149</u>

Zusammenfassung

Nach den ersten Erfolgen der Gentherapie bei angeborenen Immundefekten wurden einige Fälle von Leukämie nach gammaretroviralem Gentransfer in Blutstammzellen bei Patienten mit „severe combined immunodeficiency“ (SCID-X1) veröffentlicht. Diese entfachten eine Diskussion über das Risiko der Insertionsmutagenese bei der Verwendung gammaretroviraler Vektoren. Durch eine insertionsbedingte Transaktivierung potentieller Onkogene und damit verbundenen malignen Veränderungen können gammaretroviral transduzierte Blutstammzellen Leukämien hervorrufen.

Aber nicht nur Blutstammzellen werden als Zielzellen in der Gentherapie genutzt. In der Gruppe von Laer wurde in den letzten Jahren eine neue Gentherapie der HIV-1 Infektion entwickelt. Hierbei werden dem Patienten genetisch geschützte, autologe T-Lymphozyten infundiert. Die Gefahr einer Leukämie durch Insertionsmutagenese sollte im Zuge dieser Studie für reife T-Lymphozyten evaluiert werden.

In einer vergleichenden Analyse wurde untersucht, ob der gammaretrovirale Gentransfer in reife T-Lymphozyten die gleiche Genotoxizität birgt wie in hämatopoetische Stammzellen. Hierzu wurden reife T-Lymphozyten und hämatopoetische Progenitoren von C57BL/6(Ly5.1)-Mäusen mit multiplen Kopien gammaretroviraler Vektoren transduziert, die für die potenten T-Zell Onkogene LMO2, TCL1, Δ TrkA oder das Kontrollgen GFP kodierten. Es wurden sehr hohe Transduktionseffizienzen mit bis zu 70% für reife T-Lymphozyten und bis zu 98% für hämatopoetische Progenitoren erzielt, um möglichst leukämiefördernde Bedingungen zu schaffen. Nach Transplantation in kongene Rag-1 defiziente Empfängertiere (Ly5.2) entwickelten Onkogen-modifizierte Stammzellen nach einer charakteristischen Latenzperiode Leukämien/Lymphome. Am häufigsten wurden unreife, CD8+CD4+ doppelpositive T-Vorläufer Leukämien/Lymphome beobachtet. In einigen Rezipienten führte außerdem eine Überexpression von TCL1 in hämatopoetischen Stammzellen zu der Entwicklung von reifzelligen T-Zell Leukämien/Lymphomen und B-Zell Leukämien/Lymphomen. Die Integrationsanalyse ergab oligo- bis monoklonale Tumore, wobei keine offensichtlich tumorfördernden, die gammaretroviralen Insertionen flankierenden Gene identifiziert werden konnten. Bemerkenswerterweise entwickelte keines der T-Zell transplantierten Empfängertiere ein/e Lymphom/Leukämie, obwohl auch diese Zellen mit den gleichen Vektoren modifiziert wurden und über einen sehr langen Zeitraum persistierten.

Um die Kontrollmechanismen dieser Resistenz näher zu untersuchen, wurde eine für den TCR monoklonale, adulte T-Zell Population mit Δ TrkA transduziert. Nach einer kurzen Latenzperiode entwickelten sich reifzellige T-Zell Leukämien/Lymphome. Anscheinend

existiert eine Verbindung zwischen der relativen Transformationsresistenz reifer T-Lymphozyten und dem Konkurrenzverhalten verschiedener T-Zell Klone um stimulatorische MHC-TCR Nischen.

Weiterhin wurde *in vitro* durch gammaretroviralen Transfer von LMO2 ein immortalisierter T-Zell Klon generiert. Dieser zeigte zwar nach einer langen Beobachtungszeit einen CD8-CD4-doppelnegativen Phänotyp, aber auch einen rekombinierten TCR. *In vitro* überwuchs er eine unmanipulierte Kompetitorpopulation, konnte jedoch nach Transplantation kein/e T-Zell Lymphom/Leukämie induzieren. Die LM-PCR Analyse des Klons lieferte eine sehr interessante Integration zwischen den Genen für die alpha-Ketten des IL-2 und des IL-15 Rezeptors, welche dadurch konstitutiv exprimiert wurden. Dies könnte das erste Beispiel für eine insertionsbedingte Immortalisierung eines adulten T-Zell Klons sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eindeutig gezeigt werden, dass polyklonale, reife T-Zell Populationen *in vivo* eine hohe Transformationsresistenz aufweisen. Durch bestimmte Bedingungen können jedoch durchaus maligne Veränderung adulter, reifer T-Lymphozyten induziert werden. Für die Sicherheitsabschätzung gammaretroviraler Gentherapie-Studien mit reifen T-Lymphozyten sind die vorgestellten Ergebnisse von großer Bedeutung und könnten darüber hinaus Aufschluss über die populationsdynamischen Kontrollmechanismen reifer T-Zell Leukämien/ Lymphome geben.

1. Einleitung

1.1 Gentherapie

1.1.1 Definition der Gentherapie

Die Gentherapie setzt sich zum Ziel genetisch bedingte Krankheiten zu überwinden oder zu lindern, indem fehlende Gene oder Genteile in die betroffenen Zellen des Patienten eingebracht werden [1]. Die zugeführten Gene oder Genabschnitte werden als Medikament eingesetzt und wirken indirekt, über die in ihnen vorhandene Information.

Grundsätzlich unterscheidet man bei dieser Therapieform zwischen Keimbahn- und somatischer Gentherapie. Bei der somatischen Gentherapie werden die Körperzellen des Patienten gentechnisch alteriert. Das Erbgut dieser Zellen wird jedoch nicht an die Nachkommen weitergegeben, so dass sich die Modifikation in ihrer Wirkung auf das zu behandelnde Individuum beschränkt. Meist hat dies sogar nur Auswirkungen auf ein bestimmtes Organ oder wenige Zellen und ist zudem zeitlich begrenzt. Die Keimbahn-Gentherapie bezieht sich hingegen auf die reproduktiven Körperzellen und betrifft einen ganzen Organismus von Anfang bis Ende seines Lebens. So ist die Keimbahn-Gentherapie aus ethischen Gesichtspunkten umstritten und aufgrund des Embryonenschutzgesetzes in Deutschland verboten. Im Folgenden wird aufgrund dessen nur die somatische Gentherapie thematisiert.

Zwei weitere, methodisch unterschiedliche Kategorien der Gentherapie sind die *ex vivo* und *in vivo* Gentherapie (Abbildung 1). *Ex vivo* Gentherapie umfasst die genetische Modifikation der Zielzellen außerhalb des Organismus. Typischerweise werden hierzu dem Patienten die jeweiligen Zielzellen entnommen, anschließend *in vitro* mit dem therapeutischen Gen modifiziert und in den Patienten reinfundiert. Im Gegensatz dazu wird bei der *in vivo* Gentherapie die therapeutische, genetische Information (Vektor oder DNA) dem Patienten direkt appliziert.

Es können virale und nicht-virale Methoden für den Gentransfer genutzt werden (siehe Kapitel 1.1.3). Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten, diese können biologischer, chemischer oder physikalischer Natur sein.

Der Gentransfer kann zu einer ungezielten, stabilen Integration in das Genom oder zu einer transienten Transfektion eines extra-chromosomalen Gens führen, welches i.d.R. im Laufe der folgenden Zellteilungen verloren geht, da es nicht mit der chromosomalen DNA des

Zellkern repliziert wird. Ein integriertes Gen wird bei der Teilung an die Tochterzellen weitergegeben.

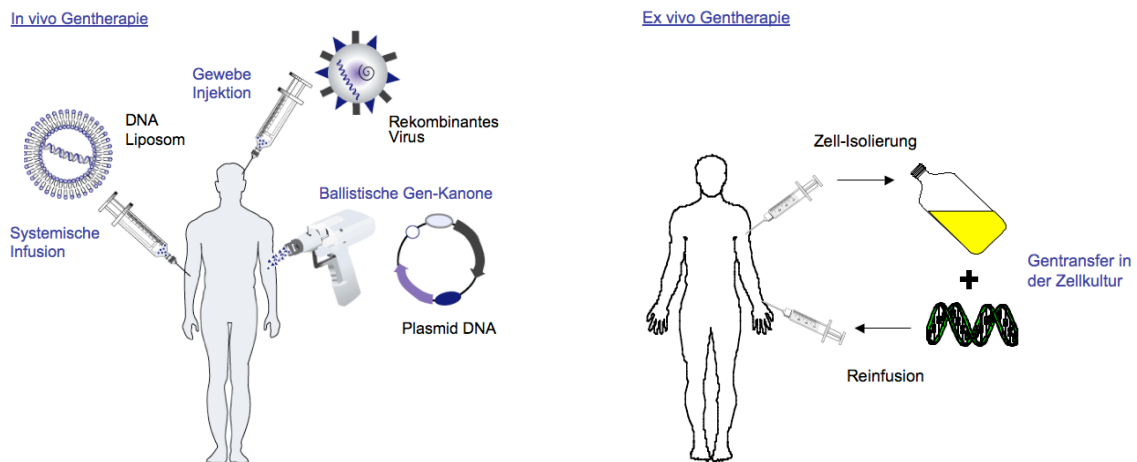


Abbildung 1 In vivo und ex vivo Gentherapie

1.1.2 Anfänge und Anwendungsfelder der Gentherapie

Mitte der 60iger Jahre wurde die Idee für ein neuartiges Konzept zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen entwickelt. Exogene, genetische Informationen sollten effizient in Zellen übertragen werden, um fehlende bzw. fehlerhaft exprimierte Gene zu substituieren. Eine der Grundlagen lieferte die Entdeckung, dass Polyomaviren, wie das *Simian Virus 40 (SV40)*, ihre genetische Information kovalent, stabil und vererblich in ihre Zielzellen integrieren [2;3]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass zumindest ein Teil des transferierten, viralen Genoms latent in der „transformierten Zelle“ exprimiert wird [4]. Die Evolution dieser infektiösen Agenzien spiegelte genau die Funktion eines effizienten, klinisch relevanten Gentransfers wieder. Es entstand die Vorstellung, diese oder auch andere Viren als Vehikel für den Gentransfer zu nutzen.

Nach der Entdeckung, dass das *Shope papilloma Virus* für das Enzym Arginase kodiert, infizierte man Patienten der seltenen Erbkrankheit *Hyperargininämie* mit diesem Virus [5]. Die behandelten Patienten litten zwar unter keinerlei ernsthaften Nebenwirkungen, jedoch wurde auch keine Heilung beobachtet. Weiterhin wurde in den Anfangsjahren der Gentherapie zudem an der Behandlung einer besonderen Form der schweren kombinierten Immundefizienz (*severe combined immunodeficiency, SCID*) gearbeitet. Diese beruht auf dem Fehlen des Enzyms Adenosindesaminase = ADA-SCID [6]. Es folgten Erbkrankheiten wie Mukoviszidose [7], lysosomale Speicherkrankheiten [8], Muskeldystrophie [9], sowie die

Therapie weiterer Formen von SCID. Die Behandlung der SCID-X1, der X-chromosomal vererbten und häufigsten Form dieses genetischen Defekts, erlangte nach dem Auftreten schwerer Nebenwirkungen in den vergangenen Jahren große Aufmerksamkeit in der Öffentlichkeit und wird ausführlich im Kapitel 1.5 thematisiert. Heute findet man fast zu jeder Erbkrankheit, deren genetische Grundlagen aufgeklärt wurden, einen gentherapeutischen Behandlungsansatz.

Für die Gentherapie ergeben sich hauptsächlich drei Anwendungsfelder: Korrektur von Erbkrankheiten, Bekämpfung von Infektionskrankheiten und Bekämpfung von Tumorerkrankungen. Das Diagramm in Abbildung 2 zeigt die Verteilung der Indikationen für verschiedene klinische Gentherapie-Studien.

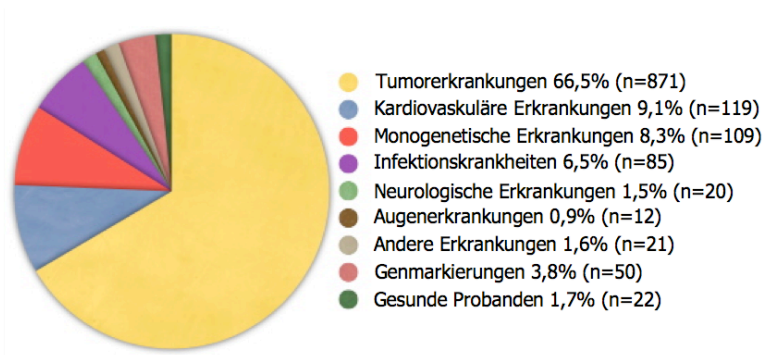


Abbildung 2 Indikationen für klinische Gentherapie-Studien (Stand 2007)

Diagramm verändert nach The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd. n=Anzahl der klinischen Studien (insgesamt 1309). <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>

Menschliche Erkrankungen unter genetischen Gesichtspunkten können in drei große Gruppen eingeteilt werden:

1. Monogenetische Erkrankungen, wie die erwähnten hereditären Defekte. Hervorgerufen durch einzelne Gendefekte, die nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden (wie z.B. Hämophilie A und B [10], SCID-X1 [11] oder die chronische Granulomatose [12]).
2. Komplexe, polygenetische Erkrankungen, die durch eine Reihe von Mutationen unterschiedlicher Gene hervorgerufen werden. Dazu gehören die meisten Tumorerkrankungen, Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, Bluthochdruck, Arthritis, Diabetes und andere Erkrankungen.
3. Erworbene genetische Defekte, wie z.B. Infektionen oder Krebserkrankungen, die einhergehen mit genetischen Veränderungen, die erworben und zufällig angesammelt wurden [13;14;15].

Im Rahmen der HIV-Immuntherapie werden aus dem Patienten Blutzellen isoliert und *ex vivo* genetisch modifiziert, so dass sie ein therapeutisches Gen konstitutiv exprimieren. Es können entweder reife CD4+ T-Zellen oder differenzierungsfähige Blutstammzellen genutzt werden. Die vor HIV geschützten Zellen werden dem Patienten reinfundiert und sollten einen Selektionsvorteil aufweisen. Das Ziel solcher Therapieansätze ist eine langfristige Anreicherung der gesamten Immunzellen im Organismus des Patienten. Hierzu wurde eine Vielzahl von antiviralen Genen entwickelt (siehe Tabelle 3). Leider blieb der Erfolg solcher klinischen Studien aufgrund verschiedener Faktoren bis zum heutigen Tag aus.

Eine interessante Möglichkeit der Immuntherapie bietet die gentechnische Modifikation reifer T-Zellen mit Tumor-spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) [16]. Hierzu werden autologe T-Zellen gentechnisch manipuliert, so dass sie zusätzlich exogene, eingebrachte TCR-Ketten exprimieren. Die anti-Tumor Reaktivität solcher TCR-modifizierter T-Zellen konnte bereits in Mausmodellen dokumentiert werden [17;18] und zeigte auch in einer ersten klinischen Studie viel versprechende Ergebnisse [19].

Durch die Transplantation allogener T-Lymphozyten im Rahmen einer Leukämie-Behandlung ist es möglich, den so genannten *graft-versus-leukemia-Effekt* zur Bekämpfung von Leukämie-Zellen zu nutzen. Um einer durch die Spender T-Lymphozyten drohenden Autoimmunreaktion (*graft-versus-host-Effekt*) vorzubeugen, werden diese *ex vivo* mit einem Suizid-Gen ausgestattet [20]. Außerdem soll die Übertragung von Chemoresistenz-Genen in schnell-proliferierende nicht-Tumorzellen, wie z.B. Knochenmarks-Stammzellen, das gesunde Gewebe vor hoch dosierter Chemotherapie schützen [21].

Eine ganze Reihe klinischer Gentherapie-Studien ist seit den 90iger Jahren initiiert worden (siehe Abbildung 3).

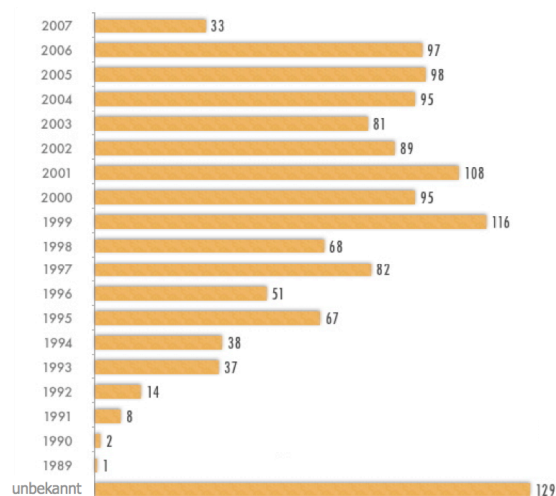


Abbildung 3 Anzahl der weltweit registrierten klinischen Gentherapie-Studien seit 1989

Diagramm verändert nach The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd.
<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>

1.1.3 Virale Gentransfer-Vektoren

Gentransfer-Vektoren sind Hilfsmittel um genetische Informationen in Zellen einzuschleusen. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen nicht-viralen und viralen Vektoren (Abbildung 4).

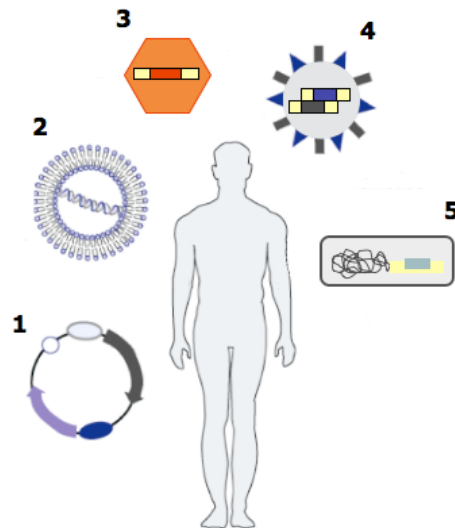


Abbildung 4 Gentransfer-Vektoren/-Methoden

(1) Nackte DNA, (2) DNA/Lipid: Liposomen Komplexe, (3) Adenovirale Vektoren, (4) Retrovirale Vektoren, (5) Bakterielle Vektoren.

Virale Gentransfer-Vektoren werden von einer Vielzahl von Viren abgeleitet: adenovirale Vektoren, retrovirale Vektoren abgeleitet von Mausretroviren oder Lentiviren (Abbildung 4-3+4), parvovirale Vektoren beruhend auf dem Adeno-assoziierten Virus und Vektoren abgeleitet von Simian Virus 40, Epstein-Barr-Virus, Herpes Simplex Virus, Vaccinia-Virus und Baculoviren.

Den größten Einsatz und die größte Verbreitung verzeichnen die retroviralen und adenoviralen Vektoren. Die stabile, persistierende Genomintegration gewährleisten jedoch lediglich Retroviren [22], die bereits erwähnten Polyomaviren (SV40) und unter bestimmten Umständen Parvoviren [23;24]. Diese Vektoren rufen außerdem kaum immunologische Reaktionen hervor. Adenoviren integrieren weder stabil, noch sind sie immunologisch unbedenklich [25;26]. Andererseits zeigen sie eine sehr hohe Transfektions-Effizienz für ihr Zielgewebe. Weiterhin besteht leider auch die Gefahr der unbeabsichtigten Kontamination mit Wildtyp-Viren. Retroviren hingegen zeigen einen großen Nachteil hinsichtlich ihrer geringen Aufnahmekapazität von ca. 8-10kb. Weiterhin zeigen sie eine hohe Rekombinations- und Mutationsrate. Sie können mit Ausnahme der Lentiviren lediglich sich teilende Zellen infizieren und während der Vektorproduktion kann es zu so genannten replikationskompetenten Retroviren kommen [27].

Die genomische Integration birgt zudem die Möglichkeit der Zerstörung wichtiger Gene durch die Insertion sowie die Transaktivierung benachbarter Gene (siehe Kapitel 1.5).

In Tabelle 1 sind einige wichtige Eigenschaften von viralen Vektoren aufgelistet [28;29].

Tabelle 1 Hauptgruppen viraler Vektoren

Kategorien	Retroviren	AAV*	Adenoviren	Vaccinia-Viren	Herpesviren	Autonome Parvoviren
Genom	ssRNA	ssDNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA	ssDNA
Transgenkapazität	8-10kb	<5kb	8-30kb	25kb	40-150kb	<4kb
Titer	10 ⁸	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁸
Genomintegration	ja	nein >10%	nein	nein	nein	nein
Transduktion ruhender Zellen	nein [#]	ja	ja	ja	ja	nein
Immunantwort	gering	stark	stark	stark	stark	nicht bekannt

* Adeno-assoziierte Viren

außer Lentiviren

In Abbildung 5 ist die Verteilung der in den letzten Jahren, in klinischen Gentherapie-Studien verwendeten Gentransfer-Vektoren/-Methoden aufgezeigt.

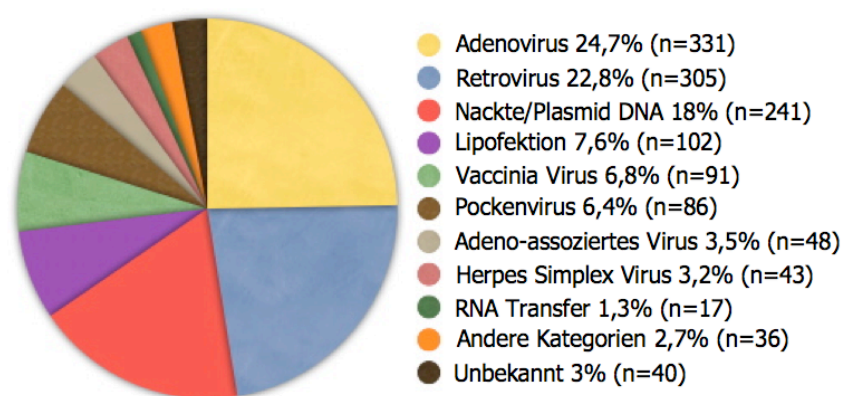


Abbildung 5 Verteilung der in klinischen Gentherapie-Studien verwendeten Vektoren

Diagramm verändert nach The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd.

<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>

Im Folgenden wird besonders auf Retroviren und gammaretrovirale Vektoren eingegangen, da für bestimmte Indikationen (z.B. HIV-Therapie) eine notwendige Langzeitexpression erforderlich ist. Aufgrund ihres Integrationsverhaltens sorgen diese jedoch für eine hohe Genotoxizität. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit das Risiko einer Insertionsmutagenese, nach gammaretroviralem Gentransfer in reife T-Zellen und Blutstammzellen evaluiert werden.

1.2 Retroviren

1.2.1 Die Entdeckung der Retroviren

Retroviren sind als Erreger im Tierreich ubiquitär verbreitet. Sie infizieren Säugetiere, Vögel, Amphibien, Reptilien und Fische. Sie sind mit vielen Krankheiten wie Krebs, neurologischen Störungen und Immundefizienzen assoziiert. Eine lebenslange Virämie, ohne jegliche Symptomatik ist jedoch auch möglich.

Peyton Rous entdeckte 1911, dass er mit Ultrafiltraten aus Geflügelsarkomen, besagte Tumorerkrankung in gesunden Hühnern hervorrufen konnte [30]. Hierfür erhielt er 1966 den Nobelpreis und das in den Filtraten enthaltene Virus wurde nach ihm *Rous- Sarcoma-Virus* (RSV) benannt. Somit war das erste Tumovirus nachgewiesen. Virale Erreger wurden als filtrierbare Agentien definiert, um sie von Bakterien zu unterscheiden, die durch entsprechende Filtersysteme von Kulturmedien abgetrennt werden können. Retroviren sind also die ersten nachgewiesenen Viren.

Die Entdeckung, dass Viren Tumore auslösen können, bestätigte sich 1936 auch bei Säugetieren. John J. Bittner beschrieb das Maus-Mammatumovirus (*Mouse-Mammary-Tumor-Virus*, MMTV) [31].

1979/1980 entdeckte Robert C. Gallo mit dem Humanen-T-Zell-Leukämie-Virus (*Human-T-cell-Leukemia-Virus*, HTLV-1) das erste Retrovirus, das beim Menschen Krebserkrankungen, nämlich T-Zell-Leukämien, verursachen kann [32]. Kurz danach beschrieb er zeitgleich mit Luc Montagnier das Humane Immundefizienz Virus (*Human immune deficiency Virus*, HIV), welches für das erworbene Immunschwäche Syndrom (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) verantwortlich ist [33;34].

Auch wenn die Infektion durch Retroviren zu den verschiedensten Symptomen und Krankheitsbildern führt, zeigen die meisten Retroviren in ihrer Virionstruktur, Genomorganisation und Replikationsmethode große Übereinstimmungen.

1.2.2 Die Klassen der Retroviren

Man unterteilt die Familie der Retroviren (Retroviridae) in insgesamt 7 Genera Tabelle 2.

Tabelle 2 Klassifikation der Retroviren

Genus	Beispiel für Spezies	Wirt
Alpharetrovirus	<i>Avian leukosis Virus</i> , AVL	Vertebraten
Betaretrovirus	<i>Mouse-Mammary-Tumor-Virus</i> , MMTV	Vertebraten
Gammaretrovirus	<i>Murine Leukemia Virus</i> , MLV	Vertebraten
Deltaretrovirus	<i>Human T-lymphotropic Virus type 1</i> , HTLV-1	Vertebraten
Epsilonretrovirus	<i>Walleye dermal sarcoma Virus</i> , WDSV	Vertebraten
Lentiretrovirus	<i>Human immunodeficiency Virus 1</i> , HIV-1	Vertebraten
Spumaretrovirus	<i>Human Foamy Virus</i> , HFV	Vertebraten

Vor allem retrovirale Vektoren abgeleitet von Gammaretroviren [35] und Lentiretroviren [36] finden in der Gentherapie Anwendung.

Mit ihrem gut charakterisierten Genom und der Möglichkeit Vektoren zu generieren, die keine viralen Proteine exprimieren bzw. keine replikationskompetenten Viren (*replication competent retrovirus*, RCR) bilden wurden Vektoren entwickelt, die auf einfache Viren, wie das Murine Leukämie Virus (MLV) zurückzuführen sind [37].

In der vorliegenden Arbeit wurden gammaretrovirale Vektoren, abgeleitet von Mausleukämieviren aus dem Genus der Gammaretroviren verwendet.

1.2.3 Viruspartikel und Genom der Retroviren

Retroviren sind umhüllte, kugelförmige RNA Viren, die ihr Genom über den Prozess der reversen Transkription von RNA in DNA umschreiben [38]. Es handelt sich um 80-120nm große Einzel(+)-Strang-RNA-Viren (ss(+)RNA), welche zwei für gewöhnlich identische Kopien ihres Genoms in einem Nukleokapsid komplexieren. Das Nukleokapsid, der innere Bereich der Virionen, beinhaltet außerdem die Reverse Transkriptase, Integrase und Protease Proteine. Eine Proteinhülle aus Kapsidproteinen umschließt das Nukleokapsid und grenzt den Kernbereich des Partikels ab [39]. Eine Matrix-Proteinschicht (MA) liegt außerhalb des Kerns und interagiert mit der Virushülle, die sich aus einer Lipiddoppelschicht zusammensetzt und das virale Kernpartikel umschließt. Die Virushülle stammt von der zellulären Membran und präsentiert sich mit viralen Hüll-Glykoproteinen (*envelope*, Env). Das virale Hüll-Glykoprotein ist das einzige virale Protein auf der Partikel-Oberfläche und ist für die Interaktion mit einem

spezifischen Zellrezeptor verantwortlich. Es ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut: der Transmembran-Domäne (*transmembrane*, TM), welche das Protein in die Hüllmembran verankert und die Oberflächen-Domäne (*surface*, SU), die mit dem zellulären Rezeptor interagiert. Die Struktur eines retroviralen Partikels ist in Abbildung 6 zu sehen.

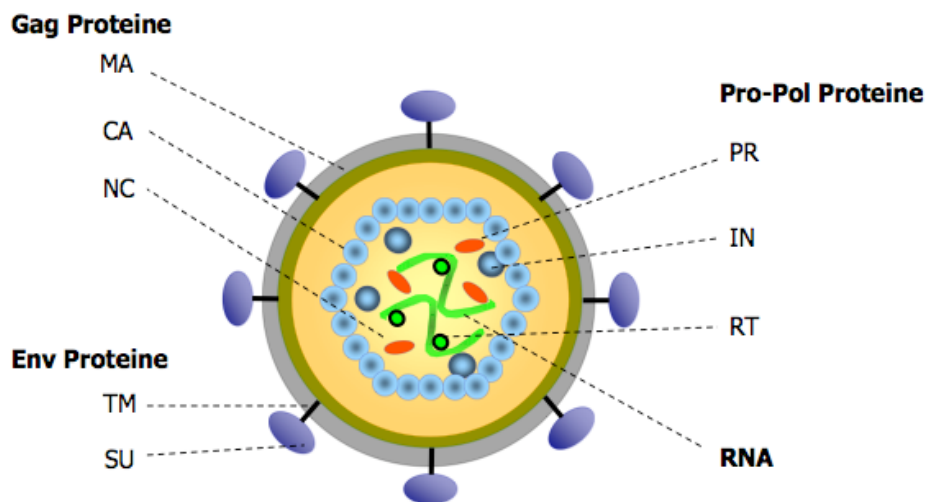


Abbildung 6 Struktur eines retroviralen Partikels

Gag Proteine: Matrix-Proteine (MA), Kapsid (CA), Nucleokapsid (NC); Pro-Pol Proteine: Protease Proteine (PR), Integrase (IN), Reverse Transkriptase (RT); Env Proteine: Transmembran-Proteine (TM), Oberflächen-Proteine (SU).

Die Größe des retroviralen Genoms liegt bei 8-10kb und ist in vier Hauptgene gegliedert: *gag*, *pro*, *pol* und *env*.

Die *gag* Sequenz kodiert für die drei Struktur-Gene: MA, CA und NC. Das *pro* Gen kodiert für die Protease Aktivität (PR), welche für die proteolytische Spaltung des Gag/Pro/Pol-Polyproteins verantwortlich ist. Weiterhin kodiert die *pol* Sequenz für die Enzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) [40]. Die RT übernimmt während des Replikationszyklus die reverse Transkription der RNA in DNA (siehe 1.2.4) und die IN katalysiert die Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom (siehe 1.2.5). Die *env* Sequenz kodiert für die zwei Untereinheiten der Hüll-Glykoproteine SU und TM.

Zusätzlich zu *gag*, *pro*, *pol* und *env* weisen komplexe Retroviren, wie Lentiretroviren zusätzliche Gene auf, die für die Regulation der viralen Gen-Expression, den Zusammenbau von infektiösen Partikeln und die Modulierung der Replikation in infizierten Zellen sorgen.

Die Protein-kodierenden Gene werden durch *cis*-aktive Sequenzen, die so genannten „langen terminalen Wiederholungen“ (*long terminal repeats*, LTRs) umrahmt. Diese LTRs enthalten Elemente, die essentiell für die Gen-Expression, die reverse Transkription und die Integration sind. Der Aufbau des retroviralen Genoms und des integrierten Provirus sind in Abbildung 7 dargestellt.

Die LTRs gliedern sich in U3-Region (U:unique), R-Region und U5-Region. Die R-Region bildet eine direkte Wiederholung an beiden Enden des Genoms und liefert die homologen Sequenzen für den Strang-Transfer während der reversen Transkription. Am 3' Ende des Genoms erscheint R mit einem aus 50-200 nicht-kodierenden Adenylresten bestehenden Polyadenylierungssignal. Die U5- und U3-Regionen werden während der reversen Transkription dupliziert. Die U3 enthält Promotor und Enhancer Elemente, welche die Gen-Expression regulieren. Die R-Region bildet zusammen mit der U5-Region, der Primerbindungsstelle (= PBS) und dem Verpackungssignal *psi* (= Ψ) den so genannten *Leader*, den 5'-untranslatierten (*untranslated Region*, UTR) Bereich. Die Primerbindungsstelle bindet den tRNA-Primer, der als Startpunkt für die reverse Transkription unerlässlich ist. Die *psi* Verpackungssignal-Sequenz sorgt für die spezifische Verpackung der RNA in neu gebildete Viruspartikel und ist im *Leader* Bereich lokalisiert. Eine Ausnahme bilden hier die Lentiretroviren, hier liegt die *psi* Sequenz zum Teil im *Leader* Bereich und teils in der translatierten *gag* Region. Kurz vor der 3'LTR im 3'untranslatierten Bereich befindet sich der Polypurin-Trakt (PPT). Hier wird während der reversen Transkription die Synthese des positiven DNA-Strangs initiiert.

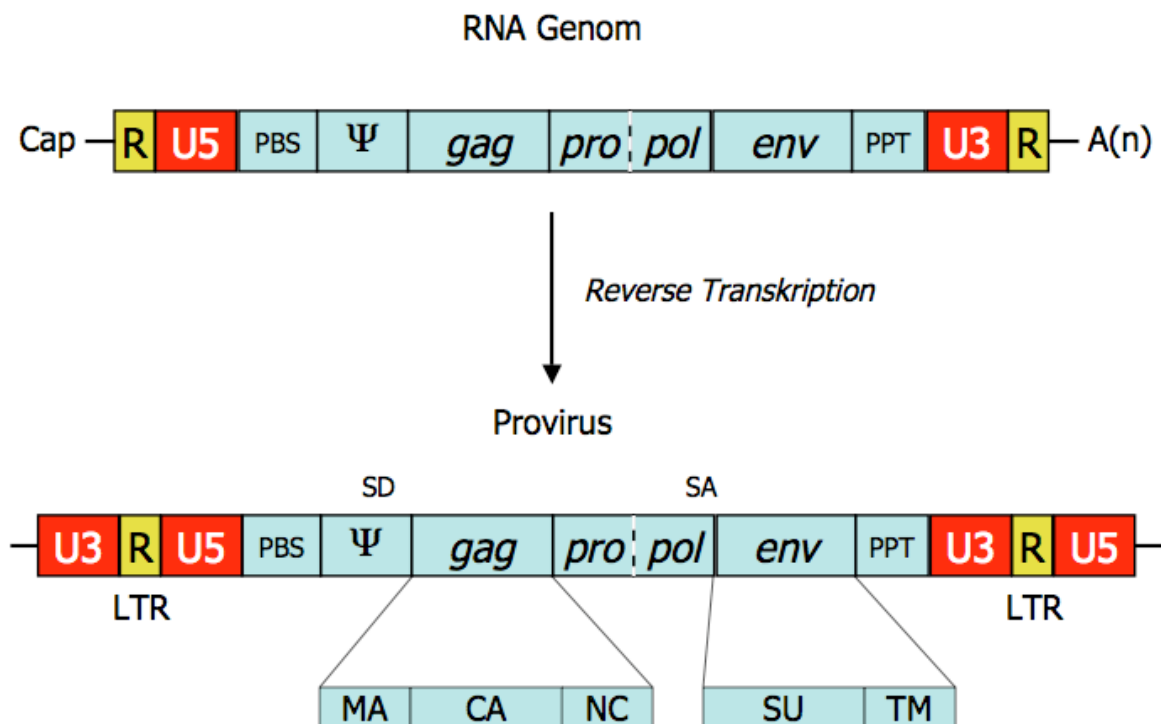
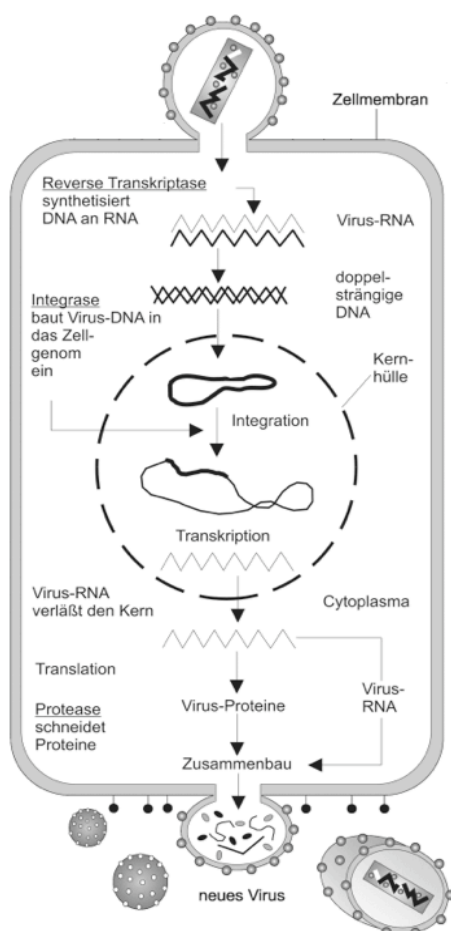


Abbildung 7 RNA Genom und integriertes Provirus eines Gammaretrovirus

Das virale RNA Genom wird durch die Reverse Transkription in ein DNA Provirus umgeschrieben. Während des RT Prozesses werden die U3- und die U5-Regionen dupliziert und bilden zwei identische LTRs aus. Die gestrichelte Linie zwischen *pro-pol* deutet an, dass beide Gene den gleichen „Offenen Leserahmen“ (*open reading frame*, ORF) nutzen. Cap: 5'capping. SD: Splice Donor-Stelle. SA: Splice Akzeptor-Stelle. PPT: Polypurin-Trakt. PBS: Primer Bindungs-Stelle. A(n): Poly(A)-Schwanz.

1.2.4 Replikationszyklus der Retroviren

Die Infektion wird durch die Interaktion des viralen Partikels mit der Zell-Oberfläche initiiert (siehe Abbildung 8). Die Bindung des viralen Glykoproteins an einen spezifischen Rezeptor-Komplex auf der Zell-Oberfläche führt zu einer Fusion von Zell- und Virusmembran, wobei das Viruspartikel internalisiert wird. Nach der Membranfusion zwischen Virus und Zelle, wird der Virus Kern in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Hier wird dann das virale RNA Genom durch die Reverse Transkription in ein DNA Provirus umgeschrieben [22]. Der virale Kernkomplex wird zum Teil degradiert, um ein großes Nukleoprotein-Partikel zu bilden (*preintegration complex*), welches das virale Genom in den Nukleus transportiert. Dieser Prozess des Eintritts in den Nukleus zeigt entscheidende Unterschiede zwischen den Gammaretroviren (z.B. MLV) und den Lentiviren (z.B. HIV). Der effiziente Transport von HIV-1 in den Nukleus wird als aktiv beschrieben [41], wobei das Virus die zelluläre Kerntransport-Maschinerie nutzt. Bei MLV hingegen ist der Transport in den Zellkern abhängig von der mitotischen Aktivität der Wirtszelle [42;43], also dem Zusammenbruch der Kernmembran.



Das in den Kern transportierte, doppelsträngige Provirus wird nun permanent in das Wirtsgenom integriert (siehe 1.2.5 Retrovirale Integration). Nach der Transkription des integrierten Provirus werden die viralen Proteine, sowie das virale RNA Genom zu neuen Virionen assembliert. Das Spleißen der viralen RNA Transkripte erfolgt im Zellkern der Wirtszelle, wobei einfache Retroviren, wie MLV lediglich einmal gespleißt werden. Hierbei entsteht gespleißte mRNA, die für die Expression des *env* sorgt.

In komplexen Retroviren kommt eine kompliziertere Form des Spleißens vor, um eine Bildung von akzessorischen Proteinen sicherzustellen. Das Verpackungssignal Ψ sorgt dafür, dass nur ungespleißte RNA in die neuen Viruspartikel verpackt wird [44;45;46]. Die Freisetzung der Virionen erfolgt an der Zellmembran durch den Austritt aus der Zelle (*budding* - Knospung).

Abbildung 8 Retroviraler Replikationszyklus

Bild verändert nach http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c3/Hiv_gross_german.png

Das *budding* der Virionen erfolgt an Bereichen der Zellmembran, die Env Proteine enthalten, hier erhalten die Partikel ihre Virushülle (*envelope*). Die viralen Glykoproteine sind aber nicht unbedingt erforderlich für die Formation neuer Partikel. Sind diese nicht vorhanden, kommt es zur Bildung von nicht-infektiösen, nackten, umhüllten Partikeln. Die proteolytische Spaltung von viralen Polyproteinen beginnt während des Austritts der Virionen und wird im freigesetzten Partikel komplettiert, wobei reife, infektiöse Viruspartikel resultieren.

Im Folgenden wird der Vorgang der retroviralen Integration genauer betrachtet, da dieser Vorgang für die vorliegende Arbeit eine besondere Bedeutung hat.

1.2.5 Retrovirale Integration

Nach der reversen Transkription wird die doppelsträngige, virale DNA in das Wirtsgenom integriert. Diese Integration verläuft in drei entscheidenden Reaktionsschritten (Abbildung 9) und erfordert das virale Protein Integrase (IN) bzw. spezifische Sequenzen an den Enden der LTRs [47;48].

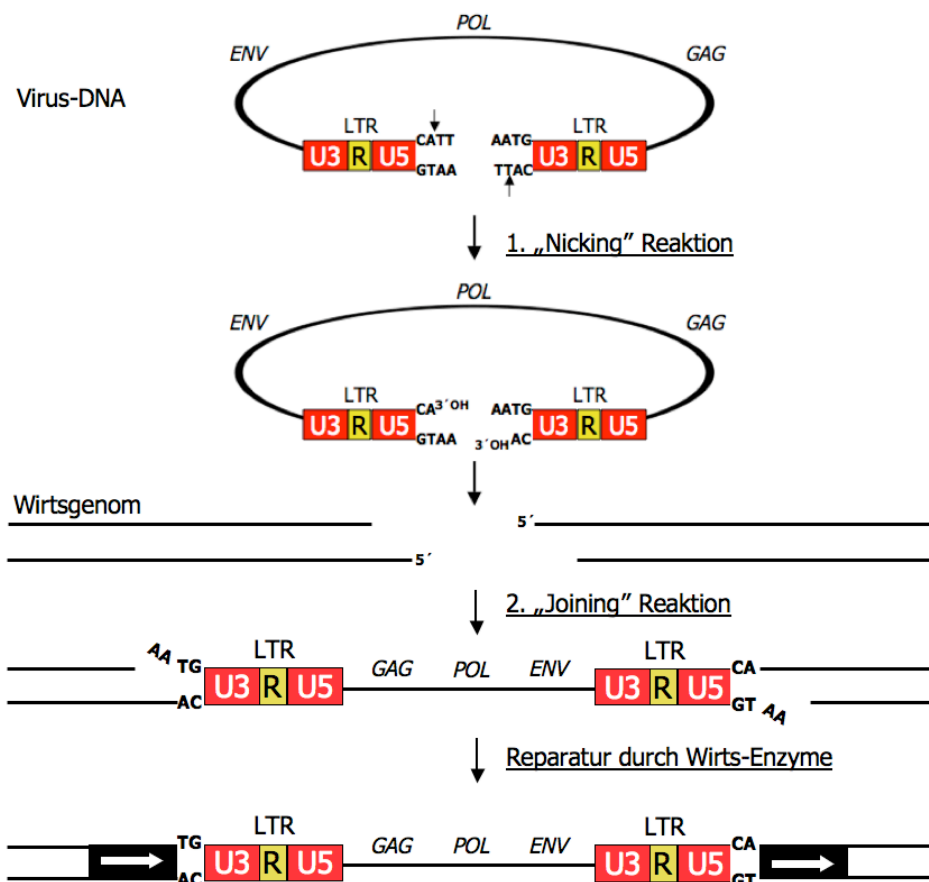


Abbildung 9 Die rertrovirale Integration

Als erstes erfolgt eine sequenzspezifische Prozessierung an den LTRs der viralen DNA. Diese Reaktion erfolgt in einem großen, viralen Nukleo-Protein-Komplex im Zytoplasma der infizierten Zelle [49]. Durch das Entfernen von zwei Nukleotiden an den Enden der viralen DNA („*nicking*“), entstehen 5´ überhängende, einzelsträngige Dinukleotide [50;51]. Die prozessierte Virus-DNA wird nun in den Zellkern transportiert.

Weiterhin wird das Wirtsgenom an einer willkürlichen Stelle versetzt geschnitten, so dass auch hier überhängende 5´Enden entstehen [52;53]. Anschließend erfolgt die so genannte „*joining*“-Reaktion oder der „Strang-Transfer“, bei welchem die zellulären 5´Enden mit den viralen 3´Enden verbunden werden. Bei diesem Vorgang gehen die 5´-Überhänge des Virusgenoms verloren.

Zelluläre Reparatursysteme (Enzyme) füllen dann im dritten und letzten Schritt die einzelsträngigen Lücken und Ligase verschließt diese zu Doppelsträngen. Da es sich bei der flankierenden Integrationsstelle um einen versetzten Schnitt handelt, kommt es zu einer Duplizierung der Wirtssequenz an dieser Stelle. Diese Sequenz ist charakteristisch für das entsprechende Virus. Wie Retroviren ihre Integrationsstelle auswählen wird seit langem intensiv untersucht. Frühe *in vitro* Systeme haben gezeigt, dass jede DNA-Sequenz als Integrationsstelle dienen kann [54], wobei die Auswahl völlig willkürlich zu sein scheint.

Die am meisten verbreiteten Methoden zur Bestimmung der Integration sind die LAM-PCR (*Linear amplification-mediated PCR*), die LM-PCR (*Ligation-mediated PCR*) [55;56] und die IPCR (*Inverse PCR*) [57]. Die Methodik der LM-PCR wird in Kapitel 2 (Materialien und Methoden) noch genauer erläutert.

Vergleicht man das Integrationsverhalten von MLV und HIV-1, so kann man sehen, dass beide Retrovirus-Typen besonders aktiv transkribierte Gen-Einheiten bevorzugen [58;59]. MLV favorisiert jedoch die Regionen um den Transkriptionsstart von Genen und HIV-1 zieht es hingegen vor, innerhalb der transkribierten Gene zu integrieren, ohne präferentiell bestimmte Bereiche vermehrt zu nutzen. In Abbildung 10 sind vereinfacht die Integrations-Präferenzen beider Retroviren aufgezeigt.

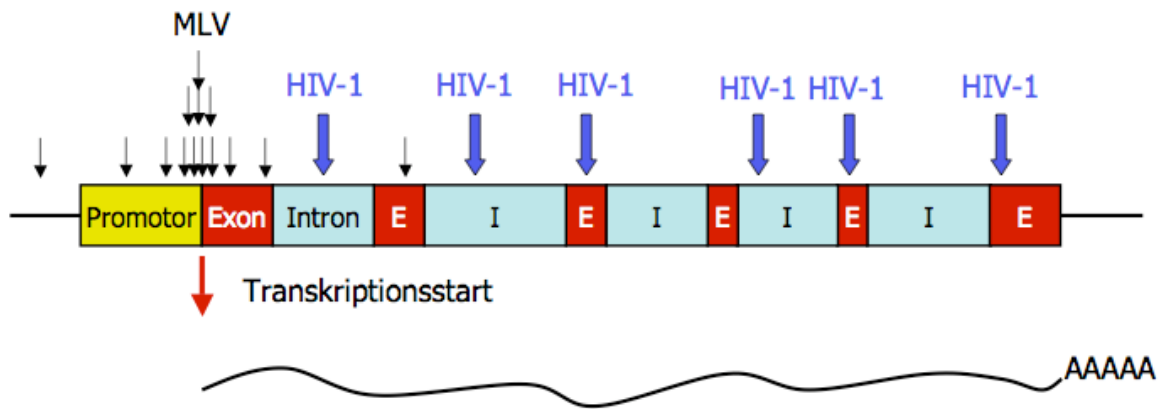


Abbildung 10 Integrations-Präferenz von MLV und HIV-1

MLV integriert bevorzugt in Bereichen um den Transkriptionsstart. HIV-1 hat eine große Präferenz in Genen zu landen, jedoch ohne besondere Präferenz für bestimmte Bereiche. Das Integrationsverhalten sinkt dramatisch außerhalb der Gen-Bereiche. Abbildung neu erstellt nach dem Vorbild aus [60].

Zu den Faktoren, die sicherlich einen Einfluss auf die Integration haben, gehören die nukleosomale Struktur und DNA bindende Proteine. Diese können einerseits die Integration blocken oder durch eine intensive Interaktion mit der Wirts-DNA eine Integration fördern [61;62].

1.2.6 Gemeinsame Integrationsstellen (CIS)

Wie bereits erwähnt, wird für die Integration des MLV-Genoms die mitotische Aktivität der Wirtszelle vorausgesetzt. HIV-1 bedient sich akzessorischer Proteine und kann dadurch auch in den Kern teilungs-inaktiver Zellen integrieren. Dementsprechend sind bei der Integration des MLV Genoms vermehrt Gen-Bereiche zugänglich, die kritisch für die Proliferation der Zelle sind.

Die Integrationsstellen wurden in der Vergangenheit oft aus retroviral-induzierten Tumoren oder Zelllinien isoliert/kloniert. Retroviren können über Insertionsmutagenese Tumore induzieren, indem sie für die Expression eines viralen Onkogens sorgen oder zelluläre Gene transaktivieren, die beispielsweise einen Proliferationsvorteil vermitteln. Um Gene zu identifizieren, die für eine Tumor-Induktion verantwortlich sein könnten, wurde eine Vielzahl an Integrationsstellen von MLV kloniert, sequenziert und innerhalb seines Wirtsgenoms kartiert [63;64;65]. Dabei wurden so genannte „Gemeinsame Integrationsstellen“ (*common integration sites*, CIS), von zumindest zwei Tumor-Kategorien in einer Datenbank (*Mouse Retroviral Tagged Cancer Gene Database*, RTCGD, <http://rtcgd.abcc.ncifcrf.gov/>) katalogisiert [66]. Allgemein wird angenommen, dass diese Population von selektierten

Integrationen zu Wachstumsvorteilen führen, welche anschließend in einer Transformation normaler Zellen resultieren können. Viele der bekannten Onkogene wurden auf diese Weise (über CIS) identifiziert. Interessant ist es, nicht-selektierte Integrationsereignisse zu charakterisieren, indem man diese mit den CIS vergleicht.

1.3 Retrovirale Vektoren

Basierend auf den Überlegungen, dass Viren als hocheffiziente Systeme für den Transfer und die Replikation von Genen angesehen werden können, begann die Entwicklung viraler Vektoren. Als Voraussetzung für die Nutzung solcher viraler Systeme galt hierbei, Methoden zur gezielten Manipulation des viralen Genoms zu entwickeln, die den Einbau zu transferierender Gene erlauben. Weiterhin galt es sicherzustellen, dass das verwendete Virus apathogen für den Empfänger ist und sich nicht im Empfänger unkontrolliert vermehren kann.

Wie bereits erwähnt sind Retroviren neben den Adenoviren die am häufigsten als Gentransfersysteme verwendeten Viren. Sie zeigen für den Einsatz als Gentransfer-Systeme mehr Anpassungs- und Modifikationsmöglichkeiten als andere Gentransfer-Systeme [67]. Retroviren eignen sich besonders, da sie stabil in das Wirtsgenom integrieren und somit transferierte Informationen an Tochterzellen weitergegeben werden können. Entscheidend ist hierbei, dass die retroviralen Strukturgene und die cis Elemente des retroviralen Genoms voneinander getrennt werden können. Als retrovirales Genom kann jede Sequenz dienen, welche die Steuerelemente für die Verpackung, Expression und Integration in der richtigen Anordnung aufweist. Retrovirale Strukturgene sind nicht notwendig, sie können durch jedes gewünschte (therapeutische) Gen ersetzt werden, dabei ist lediglich eine Größengrenze von 8-10 kb zu beachten. Der retrovirale Vektor weißt neben der 5', 3'LTR und dem therapeutischen Gen noch das Verpackungssignal Ψ auf. Es liegen also lediglich die cis-aktiven Elemente vor. Der Vektor beinhaltet aber keinerlei kodierende, virale Informationen, die zur Vermehrung von infektiösen, replikationskompetenten Viruspartikeln (RCRs) führen könnten.

Werden die retroviralen Strukturgene *gagpol* und *env* in sog. Verpackungszellen transfiziert (über Hilfsplasmide) und diese Zellen zusätzlich mit einem rekombinanten retroviralen Genom ausgestattet, so kommt es zur Bildung von retroviralen Partikeln. Das Genom für das Retrovirus wird also *in trans* beigesteuert.

Der Ersatz des ursprünglichen Hüllproteins des Retrovirus durch heterologe Hüllproteine bietet die Möglichkeit, die Spezifität (Tropismus) für Zielzellen zu verändern (Pseudotypisierung). Hierzu muss zur Verpackung lediglich ein anderer *env* Hilfsvektor verwendet werden. Für die Produktion der infektiösen Partikel werden also insgesamt drei Vektoren benötigt, einer mit dem zu verpackenden Vektor-Genom, zwei mit den retroviralen Strukturgenen *gag/pol* und *env*. In diesem Zusammenhang spricht man von dem „Drei-Plasmid-System“ (siehe Abbildung 11). Für klinische Studien werden so genannte stabile Verpackungszelllinien verwendet, die für die dauerhafte Produktion von retroviralen Partikeln sorgen.

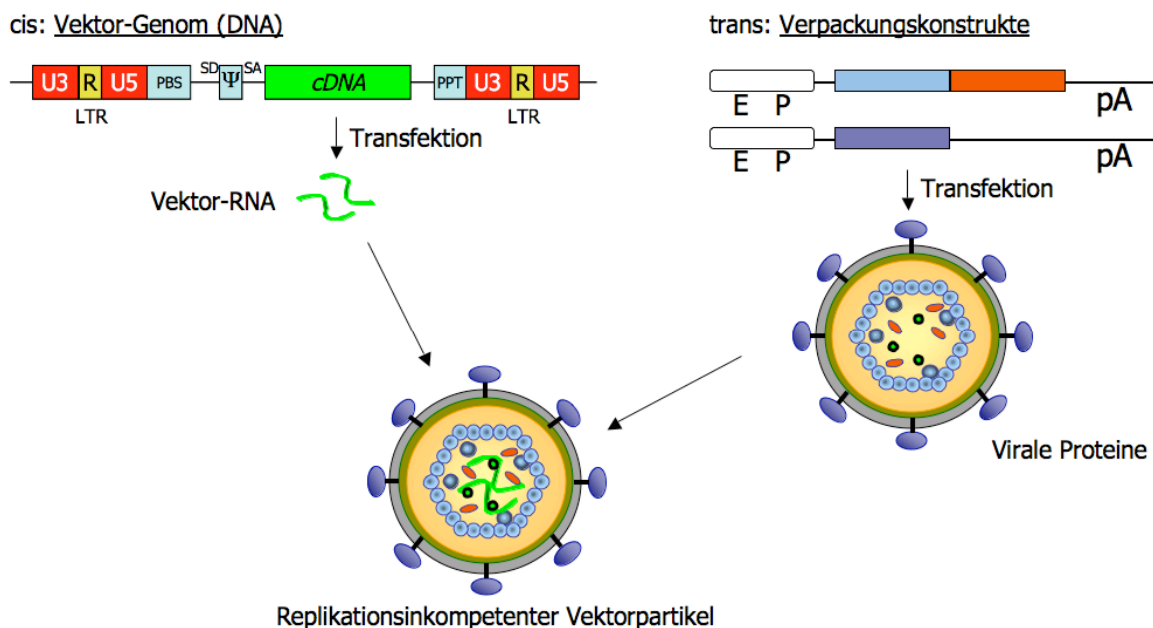


Abbildung 11 Produktion replikationsinkompetenter Partikel: Trennung von *cis* und *trans*

Trennung von *cis*- und *trans*-aktiven retroviralen Elementen für die sichere Produktion replikationsinkompetenter Vektorpartikel durch Transfektion in Verpackungszelllinien.

SD: Splice Donor-Stelle. SA: Splice Akzeptor-Stelle. PPT: Polypurin-Trakt. PBS: Primer Bindungs-Stelle. pA: Poly(A)-Schwanz. E/P: Enhancer/Promotor.

Neben dem Problem replikationskompetente Partikel zu generieren, besteht auch die Gefahr der bereits erwähnten Insertionsmutagenese (siehe auch 1.5). Um das Risiko einer Transaktivierung in LTR-getriebenen Vektoren zu minimieren, wurden so genannte selbst-inaktivierende (*SIN*)-Vektoren entwickelt. Hier ist die Enhancer-Promotor-Region in der U3-Region der LTRs deletiert. Nach der Integration des Virusgenoms wird die Genexpression von einem internen Promotor reguliert [68;69], mit dem verminderten Risiko, flankierende Genregionen zu transaktivieren. In Abbildung 12 sind ein konventioneller LTR-getriebener und ein SIN-Vektor dargestellt.

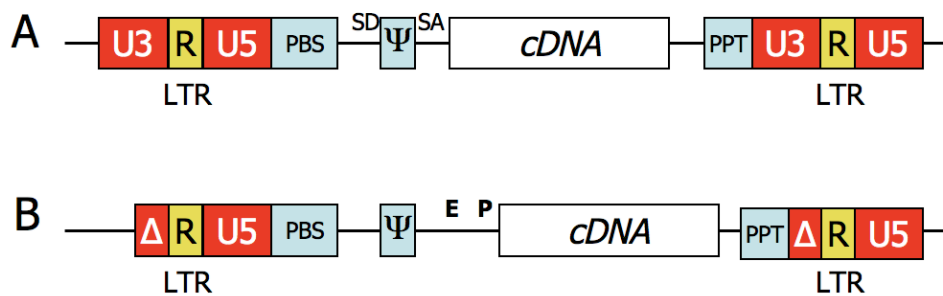


Abbildung 12 Schema retroviraler Vektoren

A. LTR-getriebener retroviraler Vektor B. Selbstinaktivierender retroviraler SIN-Vektor. Abkürzungen siehe Abbildung 11.

Vermeehrt kommen auch lentivirale Vektoren auf Basis des humanen Immunschwäche Virus (HIV) zum Einsatz [70], die wie bereits erwähnt im Gegensatz zu anderen Retroviren (und damit auch MLV) den Gentransfer in ruhende Zellen ermöglichen. Auch scheinen die lentiviralen Vektoren mit bis zu 18 kb ein größeres Verpackungspotential aufzuweisen [71].

Nachteile in der Anwendung lentiviraler Vektoren sind fehlende stabile Verpackungszelllinien für die Vektorproduktion, aufgrund einer Zytotoxizität der viralen Gag/Pol-Proteine, insbesondere der Protease [72]. Es wird an verschiedenen Möglichkeiten gearbeitet, um dieses Problem zu beheben [73;74;75]. Der Einsatz von transienter Transfektion für klinische Studien ist ein weiteres Mittel dieses Problem zu umgehen [76].

Es bestehen noch weitere Bedenken. Natürlich auch hinsichtlich der möglichen Generierung von replikationskompetenten Lentiviren (*RCL*) während der Vektorproduktion oder einer auch für Lenti-Vektoren nicht auszuschließenden Insertionsmutagenese im Wirtsgenom. Das Risiko der Interaktion zwischen den Genen der lentiviralen Vektoren mit anderen retroviralen Elementen in den Zellen der Patienten (wie z.B. HIV) stellt ein weiteres Problem [77].

In diesem Zusammenhang wird es von großer Bedeutung für die Weiterentwicklung und den klinischen Einsatz der lentiviralen Vektoren sein, diese potentiellen Gefahren zu kalkulieren und sie durch Optimierung der Verpackungssysteme zu minimieren.

1.4 Hämatopoetische Zielzellen des retroviralen Gentransfers

1.4.1 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSC/HPC)

Hämatopoese (griech.: *haimatos* - Blut, *poiesis* - Herstellung) bezeichnet die Bildung der Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC). Wachstumsfaktoren und Zytokine haben einen großen Einfluss auf die Reifung der unterschiedlichen Zellen des Blutes und des Immunsystems.

Beim frühen Embryo findet die Hämatopoese im Mesenchym (den Blutinseln) des Dottersacks statt (Megaloblastische Periode). Nach dessen Rückbildung wandert die Blutbildung beim Fetus in die Leber, ab Mitte der Fetalperiode auch in die Milz (Hepato-lieneale Periode). Erst nach der Geburt ist der Hauptteil der Hämatopoese im roten Knochenmark lokalisiert (Medulläre Periode) [78;79]. Im adulten Organismus sind neben dem Knochenmark noch die lymphatischen Gewebe, sowie das Blut selbst Orte der Blutzell-Reifung [80].

Das Blut wird auch als „flüssiges Gewebe“ des Körpers betrachtet, das sehr wichtige Aufgaben und Funktionen übernimmt. Es versorgt den Organismus mit Sauerstoff (Erythrozyten), es hat eine besondere Funktion bei der Wundheilung und Blutgerinnung (Thrombozyten) und weiterhin stellt das Blut einen wesentlichen Teil des Immunsystems (Lymphozyten, Granulozyten). Um diesen unterschiedlichen Aufgaben nachzukommen, besteht das Blut aus verschiedenen Zelltypen. Im Wesentlichen unterscheidet man zwischen Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen).

Viele Zellen haben eine limitierte Lebenszeit und müssen während des ganzen Lebens ersetzt werden. Wie in Abbildung 13 gezeigt, entwickeln sich aus HSC Progenitor/Vorläufer-Zellen (*hematopoietic progenitor cells*, HPC), die dann nach Stimulation proliferieren und zu verschiedenen Zelltypen differenzieren/reifen [81;82;78].

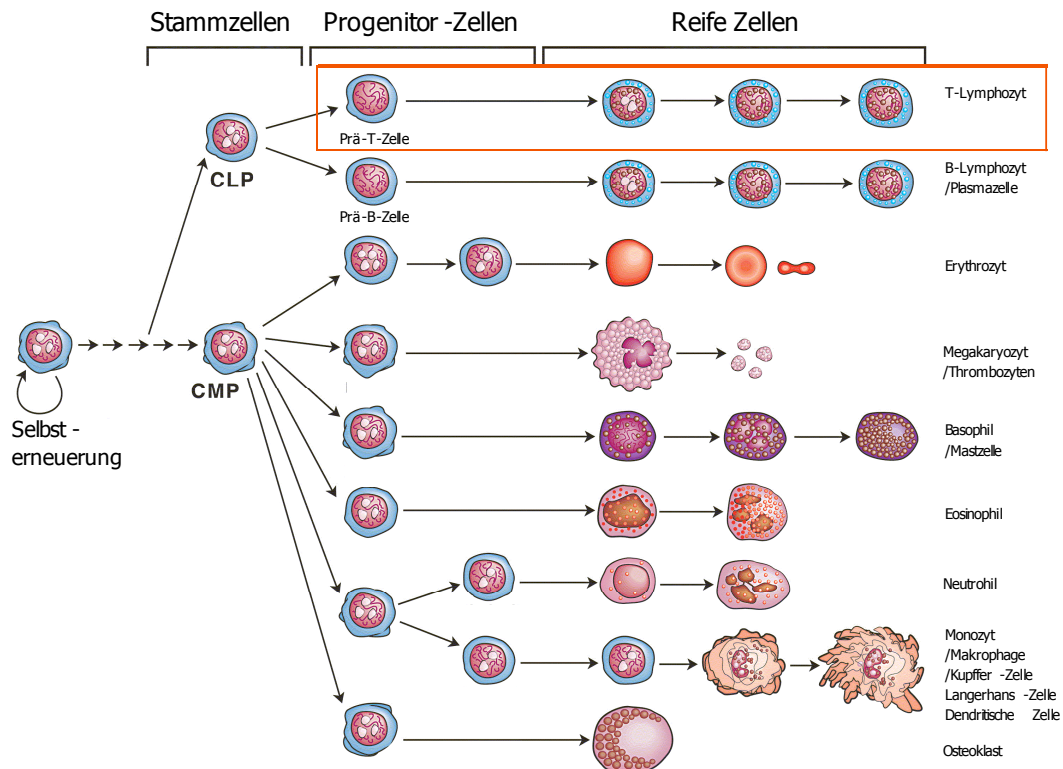


Abbildung 13 Hierarchie der Hämatopoese

Die pluripotente hämatopoetische Stammzelle besitzt die Fähigkeit der Selbsterneuerung und ist zur Produktion aller Blut-Zelltypen fähig. Die T-Lymphoide-Linie ist besonders gekennzeichnet, da sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle spielt. Verändert nach [83].

Hämatopoetische Stammzellen sind die funktionellen Einheiten der Blutproduktion. Sie können aufgrund ihrer Pluripotenz und der Fähigkeit der Selbsterneuerung die Hämatopoese eines Organismus lebenslang aufrechterhalten. Es wird angenommen, dass die Anzahl dieser HSC innerhalb der Gruppe der Säugetiere relativ konserviert ist [84]. Dies wurde für Katze, Maus und den Menschen beschrieben und soll bei 10.000-20.000 HSC pro Organismus liegen. Die monoklonale Regeneration (aus nur einer HSC) des kompletten hämatologischen Systems liegt bei etwa 15 Zellteilungen. Dies deutet auf eine enorme Regenerationsfähigkeit, Stress- und Transformationsresistenz hin.

Aus der HSC leiten sich zwei Hauptlinien ab, die lymphoiden (*common lymphoid progenitor*, CLP) und die myeloiden Progenitoren (*common myeloid progenitor*, CMP), welche dann zu reifen Zellen der Hämatopoese differenzieren.

Aufgrund des hohen regenerativen Potentials können zahlreiche angeborene Erkrankungen des blutbildenden Systems durch die Transplantation von normalen HSC geheilt werden [85;86]. Bei allogenen Stammzelltransplantationen muss jedoch ein passender Spender zur Verfügung stehen. Außerdem geht eine allogene Stammzelltransplantation mit einem hohen Therapie-assoziierten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einher [86].

Alternativ können deshalb im Rahmen einer somatischen Gentherapie autologe Stammzellen gewonnen werden, diese *ex vivo* mit dem gewünschten Gen modifiziert und anschließend in den Patienten reinfundiert werden [87]. Es gibt eine Vielzahl monogenetischer Erkrankungen, bei denen eine solche Behandlung in Frage kommt [88;89;90], siehe Kapitel 1.1.2. Besonders zu nennen sind hierbei z.B. die angeborenen Immunschwächen ADA-SCID [91], SCID-X1 [11] (siehe Kapitel 1.5) oder die septische Granulomatose [12]. Aber auch Infektionskrankheiten wie HIV sind Gegenstand solcher Therapie-Ansätze [92].

Die pluripotenten HSC können aus dem Knochenmark oder nach Mobilisierung aus dem Blut des Patienten isoliert werden und *ex vivo* genetisch modifiziert werden, so dass sie ein bestimmtes therapeutisches Gen (z.B. ein antivirales Gen oder ADA) exprimieren. Anschließend werden diese Zellen in den Patienten reinfundiert. Nach ihrer Differenzierung sind alle aus ihnen generierten Zelllinien zur Expression des therapeutischen Gens in der Lage.

1.4.2 Reife T-Zellen in der Gentherapie

Reife T-Zellen können wie bereits erwähnt ebenfalls als Zielzellen bestimmter Studien dienen (siehe Kapitel 1.1.2). Sie sind leichter aus dem Patienten zu isolieren, *ex vivo* zu expandieren und zu transduzieren [93]. Über 169 Patienten wurden bereits in der retroviralen Gentherapie mit reifen T-Zellen behandelt und bisher wurden keinerlei Nebenwirkungen beschrieben. In Tabelle 3 sind einige T-Zell Gentherapie-Studien für verschiedene Indikationen aufgeführt.

Tabelle 3 T-Zell Gentherapie-Studien

Indikation	Referenz	Patienten	Gen
HIV Infektion	[94]	6	neoR
	[95]	3	TdRev
	[96]	17	CD4zeta
	[97]	24	CD4zeta
	[98]	5	neoR
	[99]	20	CD4zeta
	[100]	10	AsSTAR/TdRev
	[101]	10	M87o
ADA-SCID	[37]	2	ADA
	[102]	2	ADA
	[103]	1	ADA
TIL	[104]	9	neoR
DLI	[105]		HSV-TK
	[20]	bis heute:	HSV-TK
	[106]	>60	HSV-TK
	[107]		HSV-TK

In Tabelle 3 verwendete Abkürzungen:

TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*), DLI (*donor lymphocyte infusion*), neoR (*neomycin resistance*), TdRev (*transdominat Rev*), AsTAR/TdRev (*Anti-sense trans-activation response, transdominat Rev*).

1.4.2.1 Entwicklung reifer T-Zellen

T-Lymphozyten spielen in der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle. Die CD3 positiven Zellen tragen einen T-Zell Rezeptor (TCR) an ihrer Oberfläche, der für die Erkennung von (Fremd-)Antigenen sorgt. T-Lymphozyten erkennen keine freien, sondern zellgebundene Antigene, die ihnen von anderen Zellen mittels MHC-Molekülen präsentiert werden [108]. Während sich die Zellen entwickeln, rearrangieren sie individuell die Gene für den TCR. Es können entweder die T-Zell Rezeptor Gene für TCR α und TCR β oder für TCR γ und TCR δ durch die Aktivität der Rekombinasen RAG-1 und RAG-2 rearrangiert werden [109;110]. Welche Faktoren die Entscheidung zur TCR α,β - oder TCR γ,δ - Differenzierung bestimmen, ist bisweilen nicht bekannt. Das Gen-Rearrangement führt zu einer sehr großen Diversität innerhalb der T-Zell Population. Theoretisch ist eine Diversität von etwa 10^{18} verschiedenen TCRs möglich, wobei für jedes Antigen ein spezifischer T-Zell Klon mit passendem TCR denkbar ist. Die große Diversität birgt jedoch auch die Gefahr der Eigenreaktivität. Deshalb durchlaufen T-Zellen während ihrer Entwicklung einen Selektionsprozess, der für eine essentielle Eigentoleranz sorgt, jedoch das große Wirkungsspektrum der T-Zellen gegen potentielle Pathogene aufrechterhält.

Undifferenzierte T-Vorläuferzellen wandern während ihrer Entwicklung aus dem Knochenmark in den Thymus und durchlaufen zwei grundlegende Selektionsstadien: die positive und die negative Selektion. Bei der positiven Selektion werden Zellen identifiziert, die Antigene in Verbindung mit „Selbst-MHC“ (*Major Histocompatibility Complex, MHC*) Proteinen erkennen. Hierbei werden Zellen selektiert, die mit „Selbst-MHC“ reagieren. Für die Differenzierung der T-Zellen ist also eine gewisse Eigenreaktivität notwendig. Das Thymusstroma trägt im Wesentlichen durch direkte Zell-Zell-Kontakte und bestimmte Moleküle, wie Interleukine oder MHC-Proteine zur T-Zell-Entwicklung bei. Bei der anschließenden negativen Selektion werden T-Lymphozyten mit TCRs, deren Affinität für Komplexe aus körpereigenen Peptiden und MHC überhalb eines gewissen Schwellenwertes liegt, eliminiert und dadurch eine notwendige „Eigen-Toleranz“ sicher gestellt [111].

Charakteristisch für den Thymus sind verschiedene, anatomisch abgegrenzte Bereiche, die während der Differenzierung von den T-Vorläuferzellen durchlaufen werden. Beim

„Durchwandern“ der einzelnen Bereiche des Thymus differenzieren die T-Vorläufer, was sich in der Expression der Oberflächenantigene CD4 und CD8 widerspiegelt. Die frühen T-Vorläuferzellen sind CD4- und CD8-negativ (doppelt-negativ, DN) und in der äußeren Schicht des Thymus, dem Kortex, lokalisiert [112]. In diesem DN Stadium werden TCR γ , δ - oder TCR β -Gene rearrangiert. Innerhalb der kortiko-medullären Grenze tragen die Thymozyten sowohl das CD4- als auch das CD8-Oberflächenantigen (doppelt-positiv, DP) und die Gene für TCR α werden rearrangiert [113]. TCR α , β -Zellen, deren TCRs mit einem MHC-Klasse I Molekül interagieren, reifen zu CD8+ T-Zellen heran und Zellen, deren TCRs mit MHC-Klasse II Molekülen interagieren, zu CD4+ T-Lymphozyten. Reife CD4-positive, T-Helferzellen (einfach-positiv, EP) und reife CD8+, zytotoxische T-Zellen (einfach-positiv, EP) verlassen dann die Thymusmedulla und gelangen in die Peripherie [114].

1.4.2.2 Homeostatische Proliferation

Wie bereits in Kapitel 1.4.2.1 beschrieben ist die Größe der Lymphozyten-Population von entscheidender Bedeutung für das adaptive Immunsystem. Einerseits muss dieser Zellpool eine große Diversität aufweisen, um einem breiten Spektrum an Pathogenen entgegenzuwirken; andererseits ist die Aufnahme-Kapazität des Organismus limitiert. Um dieses Problem zu lösen, untersteht das Immunsystem einer homeostatischen Regulation. Diese ermöglicht, dass die Menge an Lymphozyten in der Peripherie konstant bleibt [115;116]. Der Begriff „Homeostase“ beschreibt die Tendenz eines Organismus seinen ursprünglichen Status, nach unerwarteten Störungen zu regenerieren. So erfolgt nach Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis Virus (*Lymphocytic ChorioMeningitis Virus*, LCMV) in Mäusen eine sehr starke Expansion von CD8+ T-Zellen. Die Antigen-spezifische Population wächst etwa 1000-fach während dieser Immunantwort an, jedoch lediglich 10% dieser Zellen überlebt in dem Pool der Gedächtniszellen [117;118]. Antigen-spezifische Populationen expandieren also während der Immunantwort sehr stark und werden anschließend massiv eingedämmt. Diese homeostatische Regulation wird über zelluläre Interaktionen, Steuerung des programmierten Zelltods und eine Reihe von Zytokinen mit verschiedenen Funktionen aufrechterhalten [119;120]. T-Zellen benötigen einen internen „Selbst-“ Stimulus, über die Interaktion ihres TCR mit endogenen MHC/Selbstpeptid Komplexen und das Zytokin IL-7, um in der Peripherie zu überleben [121;122]. Für CD8+ T-Zellen ist ein Kontakt über MHC-I und für CD4+ Zellen über MHC-II nötig, um das entsprechende Überlebenssignal in so genannten stimulatorischen Nischen (TCR-MHC Interaktion) zu akquirieren. Bedingt durch ihren TCR besetzen unterschiedliche T-Zell Klone

verschiedene dieser Nischen. Aus dieser Affinität resultiert eine klonale Konkurrenz polyklonaler, peripherer T-Lymphozyten um stimulatorische Ressourcen, welche die Proliferation der Zellen kontrolliert und die Polyklonalität innerhalb des T-Zellpools erhält [123;124]. Ein T-Zell Klon konkurriert also nicht nur mit anderen T-Zell Klonen, sondern auch in seiner eigenen stimulatorischen Nische. So wird die Größe des Zellpools für jeden Klon kontrolliert.

Besonders nach Transplantation in T-Zell ablatierte, lymphopenische Organismen (wie z.B. Rag-1^{-/-} Mäuse) spielt die homeostatische Proliferation eine wichtige Rolle. Freie stimulatorische Nischen werden von den transferierten Zellen besetzt, woraufhin diese stark expandieren und das leere T-Zell Repertoire auffüllen [123].

1.4.3 Simulation der humanen Hämatopoese: das Mausmodell

In der Modellierung der humanen Hämatopoese und deren malignen Veränderungen spielt die Labormaus eine wichtige Rolle. Murine Leukämien können experimentell durch spezifische, genetische Veränderungen induziert werden. Beispiele für solche präleukämische Veränderungen sind die ektope Expression von *BCR-ABL* [125], *N-RAS* [126], *BCL2* [127], *Evi1* [128] oder $\Delta TrkA$ [129] und die *ICSBP*-knock-out Maus [130]. Weiterhin können Leukämien durch radioaktive Bestrahlung oder Infektionen mit MLV induziert werden. Als replikationskompetentes Retrovirus (*replication-competent retrovirus*, RCR) kann MLV murine Zellen durch Insertionsmutagenese transformieren. Wie bereits in Kapitel 1.2.6 beschrieben, konnten hierbei etliche Tumor-assoziierte Gene identifiziert werden [22;131;132].

Unterschiede zwischen der menschlichen und der murinen Hämatopoese müssen jedoch berücksichtigt werden, um die Aussagekraft dieses Tiermodells besser abschätzen zu können. Im Vergleich zum Menschen ist der tägliche Umsatz an hämatopoetischen Zellen (besonders an roten Blutzellen und Blutplättchen) in der Maus signifikant höher [133]. Vor diesem Hintergrund ist eine prädiktive Aussage des Mausmodells nicht vollständig auf den Menschen zu übertragen. Eine reaktive oder maligne Vermehrung hämatopoetischer Zellen führt in der Maus sehr schnell zu einer extramedullären Hämatopoese, welche typischerweise in der Milz beginnt [134;135]. Demnach sind leukämische Infiltrate (>20% Blasten) in der Milz und eine starke Vergrößerung dieses Organs (*Splenomegaly*) charakteristische, frühe Befunde in der murinen Leukämie [136]. Bei der fortgeschrittenen Krankheit wird die normale Architektur der Milz aufgehoben und weitestgehend durch eine große Masse an Blasten ersetzt. Anders als beim Menschen, ist also die Milz und nicht das Knochenmark bei einer murinen Leukämie konstant involviert [134]. Weiterhin ist die Menge an

transplantierten HSC mit etwa 10^6 im Mausexperiment sehr viel geringer, als in einer klinischen Gentherapie-Studie am Menschen (mit mindestens 10^8). Bei einer Gentherapie-Studie wäre somit die Menge an eingesetzten, genetisch modifizierten Zellen sehr viel höher und das Risiko einer Genotoxizität könnte unterschätzt werden. Auch die durchschnittliche Lebenserwartung einer Maus ist mit 2 Jahren relativ kurz. Aus praktischen Gründen werden Beobachtungszeiten von 6-12 Monaten im Experiment i.d.R. nicht überschritten, wobei sich langsam entwickelnde Dysplasien möglicherweise nicht detektiert werden können. Es wurde bereits beschrieben, dass Nagerzellen einfacher zu transformieren sind als humane Zellen. Dies wurde in verschiedenen Transformationsmodellen für beide Organismen in der Zellkultur analysiert und auf funktionelle Unterschiede in verschiedenen Signalwegen zurückgeführt [137]. Ein wichtiger Unterschied scheint die stärkere Aktivität der Telomerase-Funktion bei reifen Nagerzellen zu sein.

Unter Abwägung der beschriebenen Unterschiede müssen die Bedingungen für das experimentelle Mausmodell so gewählt sein, dass eine größtmögliche Sensitivität gegenüber möglicher Nebenwirkungen gewährleistet ist. Um die Risiken einer Genotoxizität zu steigern gibt es verschiedene Möglichkeiten. So sollte zum Beispiel eine ausgedehnte *in vitro* Expansion der Zellen [138], eine vermehrte Blutentnahme bei transplantierten Tieren [139], serielle Knochenmarkstransplantationen [140] oder wie in der vorliegenden Arbeit das Einbringen von Onkogenen angestrebt werden [125;126;127]. Eine weitere Möglichkeit relevantere Befunde zu generieren, ist die Entwicklung „humanisierter Mausmodelle“ [137;141]. Präklinische Großtiermodelle sind von großem Wert für humane Gentherapie-Studien, können jedoch nicht mit statistisch signifikanten Tierzahlen durchgeführt werden [142]. Außerdem dauert es einige Jahre bis sich in nichthumanen Primaten Tumore manifestieren. Somit erscheint es plausibler „übersensitive“ Mausmodelle zu etablieren, die als so genanntes „*worst case scenario*“ klare, statistisch relevante Daten liefern und dadurch definierte Risikofaktoren der Genotoxizität reflektieren.

1.5 Genotoxizität integrierender Vektoren am Beispiel der SCID-X1 Gentherapie-Studie

SCID (*severe combined immunodeficiency*) ist eine Sammelbezeichnung für angeborene, schwere Störungen des Immunsystems.

Bei SCID-X1 handelt es sich um die X-chromosomal vererbte Form, die durch inaktivierende Mutationen im IL2RG-Gen entsteht [143]. Das IL2RG-Gen kodiert für die gemeinsame γ -Kette der Interleukinrezeptoren (*Interleukin 2 receptor common gamma chain*, IL2RG). Aufgrund dieses Genausfalls entwickeln die Patienten keine reifen T- und NK-Zellen und

zudem leiden sie unter einer Funktionsstörung der B-Zellen (Abbildung 14A). Sie müssen in einer völlig sterilen Umgebung leben, meist einem hermetisch abgeschlossenen Kunststoffzelt, damit sie sich opportunistischen Infektionen entziehen können. In der Öffentlichkeit hat das den Begriff „Bubble Babies“ geprägt.

Leider ist eine alleinige Therapie mit Antibiotika und Immunglobulinen nicht ausreichend und wird keine kausale Behandlung angeboten, erliegen die Patienten meist im ersten Lebensjahr einer Infektionskrankheit. Liegt ein vollständig HLA-kompatibler Spender vor, so besteht die Möglichkeit der Transplantation von Knochenmark, welche meist zur Heilung der Patienten führt. Steht jedoch kein passender Spender zur Verfügung, können bei anderen Formen der Knochenmarkstransplantation große Nebenwirkungen auftreten (z.B. „graft-versus-host disease“). Alain Fischer hat mit seiner Arbeitsgruppe bei jungen Patienten mittels Gentransfer einer intakten Kopie des IL2RG-Gens in autologe HSC großen Erfolg erzielt. Nach retroviraler Transduktion der HSC wurde eine Entwicklung/Differenzierung der betroffenen Zelltypen gewährleistet (Abbildung 4B).

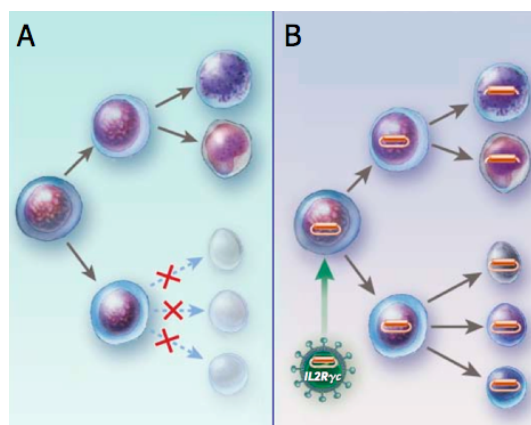


Abbildung 14 SCID-X1 Gentherapie

A. SCID-X1-Patienten weisen einen Defekt in dem IL2RG-Gen auf und bilden keine funktionellen, reifen T-, B- und NK-Zellen aus. B. HSCs wurden *ex vivo* mit einem gammaretroviralen Vektor behandelt, der für das IL2RG-Gen kodiert. Anschließend wurden die Zellen in den Patienten reinfundiert, wodurch eine Entwicklung der betroffenen hämatopoetischen Zelltypen gewährleistet wurde. Abbildung modifiziert nach [144].

Leider entwickelten einige der Patienten im Verlauf der Studie T-Zell-Vorläufer-Leukämien [145;146]. In der Studie wurde ein konventioneller, LTR-getriebener gammaretroviraler Vektor verwendet. Dieser hatte infolge einer ungezielten Integration in das Genom der hämatopoetischen Zellen eine Aktivierung zellulärer Protoonkogene hervorgerufen. Bei drei betroffenen Patienten wurde durch Transaktivierung eine Überexpression des bekannten T-Zell-Protoonkogens LMO2 erzeugt [144] (Abbildung 15).

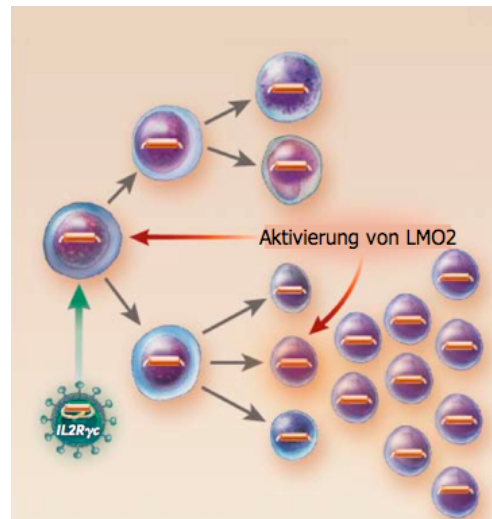


Abbildung 15 Insertionsmutagenese in der SCID-X1-Studie

Leukämie-Entwicklung nach retroviraler Transduktion mit dem IL2RG-Gen. Die Aktivierung des Protoonkogens LMO2 führte zur malignen Transformation. Abbildung modifiziert nach [144].

Zuletzt wurde in einer zweiten, unabhängigen klinischen SCID-X1-Studie ebenfalls von der Entwicklung einer Leukämie berichtet [147].

Dieses als Insertionsmutagenese bezeichnete Phänomen, wurde bereits vorher im Mausmodell beschrieben [148]. Hier beobachtete man ebenfalls die Entwicklung von Leukämien nach gammaretroviralem Gentransfer in HSC. Bei allen erkrankten Tieren wurde der gleiche leukämische Klon identifiziert, der eine einzige Vektor-Kopie in dem Gen *Evi1* (*ecotropic viral integration site-1*) aufwies. Die leukämischen Zellen zeigten RNA-Expression für den *Evi1*-Lokus, welche von beiden LTRs des retroviralen Vektors getrieben wurde. Auch in einer klinischen Studie für die septische Granulomatose konnte die klonale Dominanz einer solchen *Evi1*-Integration festgestellt werden [149]. Es ist jedoch bekannt, dass die retrovirale Transaktivierung endogener Protoonkogene für eine Transformation der Zelle nicht ausreicht [150;151]. Deshalb besteht der berechtigte Verdacht, dass das bei der SCID-X1-Studie transferierte IL2RG-Gen selbst leukämisches Potential aufweist [152].

1.6 Leukämie, die maligne Hämatopoese

Die Leukämie (griech.: *leuchaimia* – weiß, *haima* - das Blut) wird mitunter auch als Blutkrebs bezeichnet und ist eine Erkrankung der Hämatopoese. Rudolf Virchow prägte 1845 den Namen und charakterisierte sie in Abgrenzung von reaktiven Leukozytosen als maligne

Veränderung der Blutzellen. In Tabelle 4 sind einige Symptome der reaktiven und malignen Leukozytose im Vergleich aufgezeigt:

Tabelle 4 Symptome der reaktiven und malignen Leukozytose

	Symptome
Reaktive Leukozytose	<ul style="list-style-type: none"> - Entzündungszeichen (Fieber) - kleinere Lymphknoten mit intakter Struktur - Zellzahl < 30.000 Leukozyten / μl (meist <20.000) - polyklonale Vermehrung - im Ausstrich buntes Blutbild - Vermehrung reifer Zellformen - immunologisch reaktive Lymphozytose, keine Blasten - Resthämatopoese ungestört - ggf. leichte Anämie - oft (reaktive) Thrombozytose
Maligne Leukozytose (Leukämie)	<ul style="list-style-type: none"> - Gewichtsverlust, Nachtschweiß - Blutungsneigung mit spontanen blauen Flecken und Petechien - Vergrößerung der Lymphknoten (Lymphom) mit zerstörter Struktur - kontinuierliche klinische Verschlechterung - Zellzahl kein sicheres Kriterium - monoklonale Zellpopulation - im Ausstrich monotones Bild, evtl. blastäre Zellen - immunologisch, monotypische Population - zytogenetisch (Translokationen) - Hämatopoese oft gestört - Anämie - Thrombopenie

Bezeichnend für das Krankheitsbild ist die mehr oder weniger unkontrollierte Vermehrung von Blutzellen bzw. von deren Vorläufern, die entweder aus einer erhöhten Proliferationsrate (akute Leukämien), einer verminderten Absterberate (Apoptose, z.B. chronisch lymphatische Leukämie) oder einer Kombination von beidem resultiert. Man unterscheidet allgemein nach dem betroffenen Zelltyp nach akuten/chronisch lymphatischen Leukämien (*ALL* bzw. *CLL*) oder akuten/chronisch myeloischen Leukämien (*AML* bzw. *CML*).

Die maligne Transformation ergibt sich aus einer Reihe akkumulierter Mutationen in zellulären Genen. Ursachen für diese mutationsbedingten, malignen Leukosen sind u.a. ionisierende Strahlung, Chemikalien, virale Infektionen, chromosomale Translokationen oder sie sind hereditären Ursprungs. Die konkreten Zusammenhänge sind jedoch noch unklar und im Einzelfall des Patienten oft nicht nachvollziehbar.

Gene, die in der Entwicklung von Leukämien eine wichtige Rolle spielen, werden grob in zwei Kategorien klassifiziert: Protoonkogene und Tumorsuppressorgene. Protoonkogene sind zelluläre Gene, die nach strukturellen Veränderungen (z.B. Punktmutationen, chromosomalen Translokationen oder ektopter Expression) für abnormale Proteine kodieren können. Diese führen z.B. zu unkontrollierter Proliferation oder einer veränderten/blockierten Differenzierung (*gain of function*) [153]. Bei den Tumorsuppressorgenen führt erst die

Inaktivierung oder der Verlust beider Gen-Allele zur malignen Transformation der betroffenen Zelle (*loss of function*) [154].

Oft weisen chromosomale Translokationen auf einen möglichen malignen Phänotyp hin. Sie können entweder ein Protoonkogen aktivieren oder sie führen zu Fusionsgenen, die für ein chimäres Protein kodieren [155;156;157;158]. Insbesondere Gene, die für die T-Zell-Rezeptoren (TCR) und Immunglobuline (Igs) kodieren, sind häufig an den hämatologischen Translokationen beteiligt. Bei der V(D)J-Rekombination kann es zu Translokationen kommen [159], die oft entwicklungsassoziierte Transkriptionsfaktoren aktivieren, die dann beispielsweise anomal in sich entwickelnden Thymozyten überexprimiert werden. Dies kann dann zu einem Differenzierungsblock führen. Deshalb sind Genbereiche, die für Ig-Gene oder TCR-Gene kodieren, häufig an chromosomalen Translokationen beteiligt [160].

1.6.1 T-ALL und die Rolle der (Proto-)onkogene LMO2 und Δ TrkA

Die ALL ist bei Kindern mit 80% die häufigste Form unter allen Leukämien. Meist entwickeln sich die malignen Klone aus Vorläufer-Zellen, die auf einer frühen Stufe der B- bzw. T-Zell-Ontogenie in ihrer Differenzierung blockiert werden. Das Krankheitsbild der ALL-Patienten ist sehr heterogen, da die transformierten Zellen sich morphologisch, zytogenetisch und immunologisch sehr stark voneinander unterscheiden. Weitaus häufiger tritt hierbei mit 85% die B-Zell-ALL (*B-ALL*) auf, während die restlichen 15% den T-Zell-ALL (*T-ALL*) Phänotyp aufweisen. Diese treten zwar seltener auf, sind aber schwerer zu therapieren und zeigen deshalb immer noch eine hohe Mortalitätsrate [161].

In den vergangenen Jahren hat sich die Prognose für die T-ALL dank intensiver Therapie stark verbessert. Die Erfolge verzeichnen 5 Jahre rückfallfreie Behandlung in 60-75% der Fälle [162].

Wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben sind meist kritische Transkriptionsfaktoren von den chromosomalen Translokationen betroffen, die anschließend zu einer malignen Transformation der Zellen führen.

So ist die insertionsbedingte Entwicklung der T-ALLs in der SCID-X1-Studie demnach nicht überraschend. Es wurde bereits beschrieben, dass das betroffene Protoonkogen LMO2 in der spontanen Entwicklung von T-Zell Leukämien eine wichtige Rolle spielt. LMO2 wurde an den Translokationsbruchpunkten t(11;14)(p13;q11) und t(7;11)(q35;p13) in T-ALLs lokalisiert [163;164]. Hierbei erfolgten alle bekannten Translokationen aufwärts (*upstream*) zu einem oder zu beiden LMO2-Promotoren (siehe Abbildung 16A). Das gleiche Merkmal lässt sich für die zufällige retrovirale Insertion in der SCID-X1-Studie erkennen (siehe Abbildung 16A),

wobei durch LTR-bedingte Transaktivierung ebenfalls eine maligne Transformation der Zellen erfolgte.

LMO2 kodiert für ein *LIM-only* Protein, welches in einem Transkriptionsfaktor-Komplex als Brückenmolekül dient (Abbildung 16B). Dieser Komplex enthält neben LMO2, noch Genprodukte von E2A und GATA-1 bzw. GATA-3 [165]. LMO2 wird in den Vorläufern aller hämatopoetischen Linien exprimiert. In der weiteren Differenzierung wird es, mit Ausnahme der erythroiden Linie jedoch herunterreguliert. Dies scheint in T-Zellen von entscheidender Bedeutung, da sich nach konstitutiver Expression von LMO2 in Thymozyten transgener Mäuse T-ALLs entwickeln [166;167]. Neben dem eigentlichen Transkriptionskomplex von LMO2, lässt sich in leukämischen T-Zellen dieser LMO2-transgenen Mäuse noch ein weiterer Komplex identifizieren (Abbildung 16B).

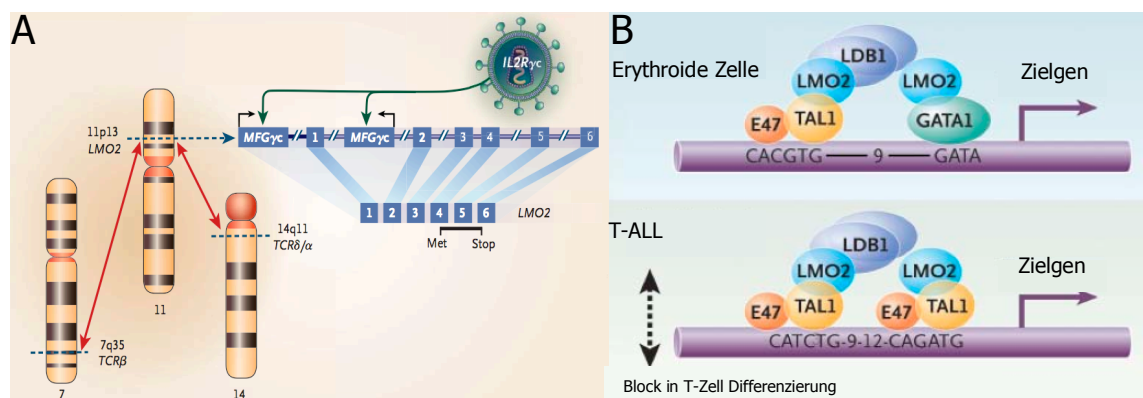


Abbildung 16 LMO2: Translokationsbruchpunkte, Integration und Transkriptionskomplexe

A: Das LMO2 Gen ist auf dem kurzen Arm (p) des humanen Chromosoms 11 an Bande 13 lokalisiert (11p13). Es hat zwei transkriptionelle Promotoren und besteht aus 6 Exons, wobei Exon 4,5 und 6 die proteinkodierenden Regionen bilden. Chromosomale Translokationen von LMO2 lassen sich in T-ALLs finden und der Chromosomenbruchpunkt 11p13 kann entweder mit dem T-Zell-Rezeptor δ -Gen (TCR δ) auf Chromosom 14 (Bande q11) oder dem T-Zell-Rezeptor β -Gen (TCR β) auf Chromosom 7 (Bande q35) gepaart werden. Alle bekannten chromosomalen Translokationen erfolgen aufwärts zu einem der beiden LMO2 Promotoren. Die Integration des retroviralen Vektors in der SCID-X1-Sudie (MFGyc) imitierte dieses Merkmal. Die Integration wurde entweder direkt vor Exon 1 oder zwischen den Exons 1 und 2 lokalisiert. B: Obwohl LMO2 in der normal Erythropoese Teil eines Transkriptionsfaktor-Komplexes ist, lässt sich in den leukämischen T-Zellen transgener Mäuse vornehmlich ein anderer LMO2-assoziiierter Komplex wieder finden. Hierbei kommt es zu einem T-Zell Differenzierungsblock. Abbildung wurde modifiziert nach [144].

In den Tieren kommt es zu einer unkontrollierten Anreicherung unreifer Thymozyten, was auf einen Differenzierungsblock nach deregulierter LMO2-Expression hindeutet [168;169]. Es handelt sich um ein spezifisches T-Zell Onkogen, da es ausschließlich T-Zell-Leukämien in transgenen Tieren induziert [170].

Weiterhin wurde vor kurzem eine konstitutiv aktive Deletionsmutante der Rezeptor Tyrosinkinase TrkA (Δ TrkA) des Nervenwachstumsfaktors (*nerve growth factor*) beschrieben

[171]. Δ TrkA generiert nach retroviraler Transduktion hämatopoetischer Stammzellen, nach einer sehr kurzen Latenzperiode akute, myeloische Leukämien, sowie unreifzellige T-Zell Leukämien [129]. Beobachtet wurde die maligne Entwicklung sogar in Ansätzen mit nur einer retroviralen Integration pro Zelle (*single copy*). Dies weist darauf hin, dass einzig die konstitutive Expression des Δ TrkA eine Transformation der Zellen herbeiführen kann.

1.6.2 Lymphome und reifzellige T-Zell Leukämien/Lymphome

Allgemein versteht man unter dem Begriff Lymphom eine Vergrößerung/Schwellung der Lymphknoten. Hierbei ist es wichtig wie bei den Leukämien zwischen reaktiven, gutartigen Vergrößerungen der Lymphknoten bei der Abwehrreaktion und den malignen Lymphomen zu unterscheiden.

1832 beschrieb Thomas Hodgkin erstmals diese Erkrankung, die sich zunächst durch eine schmerzlose Schwellung der Lymphknoten bemerkbar macht. Weiterhin können Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsabnahme auftreten. Bei dem nach Hodgkin benannten Lymphom (*Hodgkin's disease, HD, Hodgkin-Lymphom*) handelt es sich um einen bösartigen Tumor des Lymphsystems. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen dem Hodgkin-Lymphom und dem Non-Hodgkin-Lymphom, wobei das Hodgkin-Lymphom phänotypisch durch das Vorkommen einer besonderen Zellart (Sternberg-Reed-Zellen) gekennzeichnet ist. Die malignen Lymphome entstehen durch die monoklonale Neoplasie von B- oder T-Lymphozyten bzw. Zellen des Retikuloendothelialen Systems (*RES*).

T-Zell Leukämien/Lymphome eines reifen Phänotyps sind eher selten und werden hauptsächlich in älteren Patienten (>50) beobachtet [172]. Einige Beispiele hierfür sind T-Zell chronische lymphatische Leukämie (*T cell chronic lymphocytic leukemia, T-CLL*), T-Zell Prolymphozytische Leukämie (*T cell prolymphocytic leukemia, T-PLL*), Adulte(s) T-Zell Leukämie/Lymphom (*adult T cell leukemia/lymphoma, ATLL*) und Mycosis fungoides (MF).

Die reifzelligen T-PLL teilen das zytogenetische Merkmal einer klonalen Translokation an der Stelle 14q32.1, welche zur Aktivierung des TCL1-Gens führt [173;172]. Das leukämische Potential dieses Protoonkogens wurde ebenfalls im transgenen Mausmodell nachgewiesen [174]. Nach einer Latenzperiode von 15 Monaten wurden in TCL1-transgenen Tieren reifzellige T-Zell Leukämien/Lymphome induziert. Es wird angenommen, dass TCL1 seine transformierende Wirkung über eine Erhöhung der prominenten AKT-Kinase Aktivität entfaltet, welche der Zelle anti-apoptotische und Wachstumsfördernde Signale liefert [175]. Auch das bereits erwähnte Δ TrkA soll über diesen Signalweg agieren.

Weiterhin ist bekannt, dass die Infektion mit dem Retrovirus HTLV-I adulte T-Zell Leukämien/Lymphome (ATLL) induzieren kann. Die Latenzperiode für diese virusinduzierte Erkrankung liegt bei etwa 20-60 Jahren. Eine zentrale Rolle bei der Transformation scheint das regulatorische Virusprotein tax zu spielen [176], welches als potenter Transaktivator über verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren für eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B Signalkomplexes sorgt [177]. Das Transformationspotential dieses Proteins wurde bereits in transgenen Mausmodellen nachgewiesen [178;179]. In einem der Modelle konnte nach 21 Monaten sogar die Entwicklung von reifzelligen T-Zell Leukämien/Lymphomen mit entweder CD8+ oder CD4+ adultem, einfach positivem (EP) Phänotyp nachgewiesen werden [179]. Bis heute konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, dass die reife T-Zelle selbst transformierbar ist. Selbst die beschriebenen Beobachtungen liefern keinen hinreichenden Beweis, dass das transformations-induzierende Moment für reifzellige T-Zell Leukämien auf der Differenzierungsstufe der adulten, reifen T-Zelle zu finden ist.

Wie bereits erwähnt, treten reife T-Zell Leukämien seltener und meist erst im höheren Alter auf. Und auch die langen Latenzzeiten in den transgenen Mäusen weisen darauf hin, dass reife T-Zellen eine höhere Transformationsresistenz aufweisen als ihre unreifen Vorstufen.

1.6.3 Leukämische Stammzellen, das Potential der Selbsterneuerung

Leukämien/Lymphome und andere Krebserkrankungen weisen eine begrenzte, seltene Population von Zellen auf, die scheinbar über ein unbegrenztes Potential zur Selbsterneuerung verfügt [180;181]. Dies ist für die Initiation und die Erhaltung des Tumors von größter Notwendigkeit. Bei den meisten Krebserkrankungen ist diese tumorinduzierende Zellpopulation nicht bekannt [182]. Es gibt jedoch für bestimmte Leukämien hinreichend Beweise, dass diese auf eine Ansammlung von verschiedenen Mutationen in HSCs zurückzuführen sind.

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, besitzen HSCs die Fähigkeit der Selbsterneuerung und zeichnen sich durch ein ausgeprägtes Differenzierungspotential aus. Die Zellen der Hämatopoese werden kontinuierlich durch die pluripotenten HSCs und den aus ihnen resultierenden Progenitoren generiert.

Leukämiezellen weisen einige Gemeinsamkeiten mit diesen Stammzellen auf. Seit den 70er-Jahren wird die Existenz von leukämischen Stammzellen (*leukemic stem cells*, LSCs) diskutiert. Diese LSCs stammen entweder direkt von den beschriebenen HSCs bzw. Progenitoren ab oder bestimmte Stammzeleigenschaften werden in ihnen *de novo* reaktiviert, die im Verlauf der Differenzierung verloren gegangen sind. Sie erwerben hierdurch ebenfalls die Fähigkeit sich unendlich selbst zu erneuern. Verschiedene Studien

haben gezeigt, dass nur eine kleine Subpopulation von leukämischen Zellen zur extensiven Proliferation *in vitro* und *in vivo* fähig ist [183;184;185]. Lediglich 1 von 10.000 bis 1 von 100 leukämischen Zellen konnte *in vitro* Kolonien bilden. Weiterhin waren nur 1-4% transplanteder, leukämischer Zellen in der Lage Milzkolonien zu bilden. Es handelt sich also um eine sehr kleine, rare Population innerhalb des charakterisierten Tumors, welche natürlich in ihren Eigenschaften weitestgehend durch die nicht-LSCs maskiert wird.

Stammzellen zeigen große Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie. LSCs mit dieser Stammzelleigenschaft könnten demnach primäres Therapieversagen erklären.

Es wurde eindrucksvoll für myeloische Leukämien beschrieben, dass die Erkrankung auf eine kleine Population von HSCs bzw. frühen, myeloischen Progenitoren zurückzuführen ist [186].

Dies könnte sehr wahrscheinlich durch die Kurzlebigkeit der voll differenzierten, myeloischen Zellen erklärt werden (nur wenige Tage). Die Notwendigkeit der Anhäufung verschiedener Mutationen, die zu einer malignen Veränderung der Zelle führen, ist hierbei nicht gegeben.

Auf welcher Differenzierungsstufe die Transformation bei reifzelliger T-Zell Leukämien/Lymphomen stattfindet, ist jedoch bis heute nicht geklärt (siehe Abbildung 17).

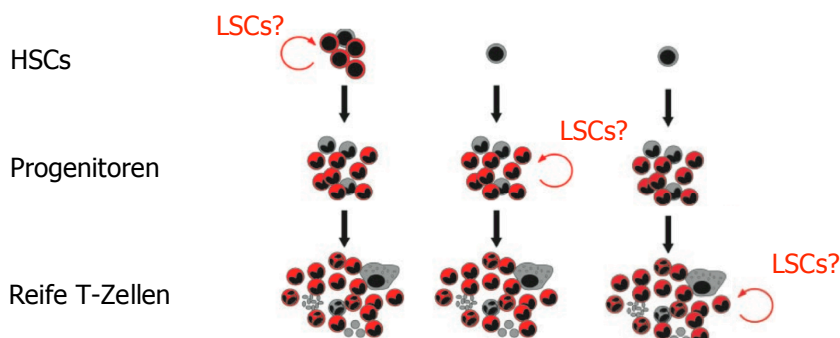


Abbildung 17 Entstehung reifzelliger T-Zell Leukämien/Lymphome

Die LSCs könnten für reifzellige T-Zell Leukämien/Lymphome auf allen drei Stufen der Differenzierung zu finden sein. Ist eine frühe HSC oder eine Progenitor-Zelle betroffen, so erfolgt auf diesen Stufen kein Differenzierungsblock, die Zellen konservieren ihr Differenzierungspotential. Werden adulte, reife T-Lymphozyten transformiert, so wäre die LSC auf dieser Entwicklungsstufe zu finden. Abbildung verändert nach [182].

Erst kürzlich konnte für die B-Zell Leukämie gezeigt werden, dass vollständig ausgereifte B-Lymphozyten immer noch transformierbar sind [187].

Lymphozyten nehmen eine besondere Stellung in der Hämatopoese ein. Sie besitzen ebenfalls die Fähigkeit der Selbsterneuerung, proliferieren extensiv nach Aktivierung, weisen einen dynamischen Lebenszyklus auf und sind sehr langlebig [188]. Auch wenn die beschriebenen Eigenschaften auf eine mögliche Malignisierung hindeuten, zeigen reife T-Lymphozyten dennoch eine sehr große Transformationsresistenz.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In den vergangenen Jahren wurde in der Arbeitsgruppe von Laer eine neue Gentherapie der HIV-1 Infektion entwickelt. Hierzu werden dem Patienten genetisch geschützte autologe T-Lymphozyten infundiert. Während der Vorbereitung der Phase I/II Studie wurde über einige Fälle von Leukämien durch Insertionsmutagenese nach gammaretroviralem Gentransfer in Blutstammzellen bei Kindern mit SCID-X1 berichtet.

Es war somit klar, dass die Gefahren einer solchen Therapie auch für Gentherapie-Studien mit reifen T-Lymphozyten genauer abschätzbar sein müssen. Wie in Tabelle 3 vorgestellt, wurden bereits sehr viele Patienten mit retroviral modifizierten, reifen T-Lymphozyten behandelt, ohne jegliche Anzeichen von insertionsbedingten Nebenwirkungen. Jedoch wurde in keiner der bisher durchgeführten Studien eine mit der SCID-X1 Studie vergleichbare, hohe Genmarkierung erreicht.

Obwohl reife T-Zellen alle Voraussetzungen für eine mögliche Malignisierung bieten, wurde bislang die Transformierbarkeit dieser Zellen nicht beobachtet. In einer vergleichenden Analyse im Mausmodell, soll in einem „*worst case scenario*“ durch gammaretroviralen Gentransfer von prominenten T-Zell-Onkogenen in Blutstammzellen und in reife T-Lymphozyten die Transformationsresistenz reifer T-Zellen überprüft werden. Bestätigt sich diese, sollen weitergehend die Kontrollmechanismen dieser Resistenz untersucht werden.

2. Material

2.1 Laborchemikalien und Verbrauchsmittel

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Appllichem (Darmstadt), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen. Alle Plastikmaterialien (wie z.B. Pipetten, Zellkulturschalen, Mikropipettenspitzen usw.), sowie Filtersysteme (\varnothing 0,22 μm , 0,45 μm) wurden von Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Biozym (Oldendorf), Schleicher & Schull (Dassel), Becton Dickinson (Heidelberg), Millipore (Eschborn) und Nalgene (Rochester, NY, USA) bezogen. Die Einwegzählkammern für die Zellzahlbestimmung stammten von Hycor Biomedicals (USA).

Tabelle 5 Laborchemikalien

Substanz	Hersteller
37% Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Deisenhofen
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroquin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol (rein)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (vergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LE Agarose	Biozyme, Oldendorf
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
tris(Hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Tween-20	Merck, Hohenbrunn
Zellysepuffer (5x)	Promega, Mannheim
Zinc-Formal-Fixx (5x)	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA

2.2 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

Puffer und Nährmedien wurden alle steril bezogen oder für 20min. bei 121°C und 2.0bar sterilisiert. Im Falle der Hitzeinstabilität wurden die Lösungen und Puffer steril filtriert. Angesetzt wurden alle Lösungen und Puffer mit deionisiertem Wasser (Filtration durch eine Milipore-Anlage von Millipore Water Systems, Eschborn). Lagerung bei RT, soweit nicht anders angegeben. Dynabeads M-450 Epoxy Dynal und Dynabeads M-280 Streptavidin stammten von Invitrogen (Karlsruhe).

Tabelle 6 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung/Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS), 10%	10g APS mit ddH ₂ O auf 100ml auffüllen Lagerung bei -20°C.
Ampicillin-Stammlösung	100mg/ml in ddH ₂ O, Lagerung bei -20°C.
Annealing Puffer (5x)	0,5M Tris (pH 7,4-7,5), 0,35M MgCl ₂ .
BSA/PBS, 10% Stocklösung	10g BSA in 100ml PBS (1:5 Verdünnung der Stocklösung für 2% BSA/PBS).
BW Puffer (2x)	10mM Tris (pH 7,5), 1mM EDTA, 2,0M NaCl.
CaCl ₂ -Lösung	2,5M CaCl ₂ in ddH ₂ O und steril filtriert.
Dithiothreitol (DDT)	771mg DDT mit ddH ₂ O auf 5ml auffüllen Lagerung bei -20°C.
DNA-Ladepuffer (6x)	0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylene, 15% Ficoll Typ 400 in 20ml ddH ₂ O.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Bio Whittaker, Belgien
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) Ethidiumbromid in ddH ₂ O
Enfluran (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden
Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix	ABgene, Hamburg
FACS-Puffer	RPMI 1640 ohne Phenolrot, 1% (v/v) FCS.
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, South America
Fixierungslösung	2% Formaldehyd (v/v) PBS.
Glutamin-Lösung	Bio Whittaker, Belgien
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma, Deisenhofen
Heparin- Natrium 25.00-ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm
HEPES (2x)	100mM HEPES, 281mM NaCl, 1,5mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,1 steril filtriert und aliquotiert. Lagerung bei -20°C, kurzzeitige Lagerung (bis zu mehreren Wochen) bei 4°C.

Histopaque (Dichte 1.083)	Sigma, Deisenhofen
LB-Ampicillin für Platten	10g Trypton /Peton aus Casein, 5g Hefeextrakt , 10g NaCl, 15g Agar-Agar mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen pH 7.0 mit 5M NaOH und autoklaviert, hinzufügen von 40mg/ml Ampicillin kurz vor Gießen der Platten.
LB-Medium	10g Trypton/Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl mit ddH ₂ O auf 1000ml auffüllen und autoklaviert.
0,1% MSA Blocking-Lösung	25mg MSA (Calbiochem/Merck, Darmstadt) in 25ml PBS lösen und steril filtrieren. Lagerung bei 4°C.
β-Mercaptoethanol (1000x)	Bio Whittaker, Belgien
MPBST, 5%	5g fettfreies Milchpulver, 10ml (10x) PBS, 100µl Tween-20 mit ddH ₂ O auf 100ml auffüllen. Lagerung kurzzeitig bei 4°C möglich.
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10%	25g SDS mit ddH ₂ O auf 250ml auffüllen.
Natriumvanadat, 10 mM	0,0828g Natriumvanadat mit ddH ₂ O auf 45ml auffüllen Lagerung bei 4°C.
NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren) (100x)	Bio Whittaker, Belgien
Natriumpyruvat (100x)	Bio Whittaker, Belgien
PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline) (1x)	PAA Laboratories, Pasching oder PAN Biotech GmbH, Aidenbach
PBS (10x)	Bio Whittaker, Belgien
PBST, 1x	10ml 10x PBS + 100µl Tween-20 mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen.
PefablocRSC, 100 mM	0,12g Pefabloc mit ddH ₂ O auf 5ml auffüllen. Lagerung bei -20°C.
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Bio Whittaker, Belgien
Puffer für Knochenmarksisolierung	2% FCS, 1mM EDTA, 1% Pen/Strep in PBS.
Retronektin-Lösung	2,5mg in 1ml H ₂ O aufgenommen, mit PBS auf 50µg/ml eingestellt und sterilfiltriert. Lagerung bei 4°C.
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) Sammelgelpuffer	Bio Whittaker, Belgien 30,25g Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen mit ddH ₂ O auf 500ml auffüllen. Lagerung bei 4°C.
Stripping Puffer	62mM Tris-HCl 2% SDS 100mM 2-Mercaptoethanol.
SDS-Elektrophorese-Laufpuffer 10x	151g Tris, 720g Glycin mit ddH ₂ O auf 5l auffüllen.
SDS-Ladungspuffer, 6 x	60% (v/v) Glycerin, 18% (w/v) SDS, 0,3% (v/v). Bromphenolblau, 600mM Tris-HCl, 12% (v/v) β-SH-Ethanol.

TAE (50x)	Tris 1220g, Essigsäure 285,5g, EDTA (0,5M) 500ml, mit ddH ₂ O auf 5l auffüllen und pH auf 8,0 einstellen.
TE	Tris (pH 8) 10mM, EDTA (pH 8) 1 mM in ddH ₂ O.
Trenngelpuffer	91g Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen, mit ddH ₂ O auf 500ml auffüllen. Lagerung bei 4°C.
Trypanblau (4 x Stammlösung)	Invitrogen, Eggenstein
Trypsin 0,25%/1 mM EDTA-Lösung	Invitrogen, Eggenstein
Türk´sche Lösung	Fluka Chemika, Schweiz
Westernblot-Transferpuffer	20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) 10x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer. Lagerung bei 4°C.
10% Zinc-Formal-Fixx-Lösung (für Organe)	Zinc-Formal-Fixx (5x) 1:5 in ddH ₂ O verdünnen.

2.3 Geräte

Tabelle 7 Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Kern, Albstadt
Autoklav HST 4-5-6 E	Zirbus Technology, Bad Grund
Ausschwingzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
BIOBEAM 2000 Cs-137 (Strahlenquelle + Zubehör)	Eckert & Ziegler, Berlin
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Brutschrank Cytoperm für die Zellkultur	Heraeus, Hanau
DNA-Elektrophoreseapparatur	BioRad, München
DNA-Sequenzierung: 3100 Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Zellzählgerät, Casy TT	Schärfe System, Reutlingen
Durchflusszytometer: FACSCalibur & Software CellQuestPro	BD, Heidelberg
EasySep Magnet	StemCell technologies, Kanada
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300	Nikon, Düsseldorf
Heizblock DRI-BLOCK DB 2D	Techne, England
Kühlzentrifuge Beckman Avanti J20	Beckman, München
Kühlzentrifuge Rottina 48R	Hettich, Tuttlingen
Mikroskop	Leica, Bensheim
Magnetrührer	IKA Werke, Staufen
Magnet-Seperator MPC-1	Dynal/Invitrogen, Karlsruhe
Mausfalle zur Fixierung (Blutentnahme + Transplantation)	Heiland, Hamburg
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
PCR-Cycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter Mettler Toledo MP 220	Mettler, Gießen

Photometer SmartSpec™ 3000	BioRad, München
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Rotator 348 „Assistent“ RM5	Assistent-Präzision-Hecht, Sondheim
Rotlichtlampe	Convar, Deutschland
Röntgenfilmentwickler Optimax Typ TR	Schroeder und Henke, Wiesloch
Schüttelinkubator	Heraeus, Hanau
Schüttler TH25	Edmund Bühler, Tübingen
SDS-PAGE-und Westernblot-Apparatur für Proteingele, mini Protean II	BioRad, München
Spannungsquelle Power Pac 1000	BioRad, München
Schüttler TH25	Edmund Bühler, Tübingen
Scil Vet ABC (<i>Animal Blood Counter</i>)	Scil animal care company, Viernheim
Sterilbank für Zellkulturen HERAsafe HS12	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen
UV-Transilluminator GelDoc 2000	BioRad, München
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.4 Verwendete Kits

Tabelle 8 Verwendete Kits

Kit	Firma
Annexin V-PE Apoptosis detection kit I für FACS	BD Falcon, Heidelberg
Calcium Phosphat Transfektion Kit	Sigma, Deisenhofen
Caltag CAL-LYSE™	Caltag, Hamburg
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
EasySep Murine SCA1 Selection Kit	StemCell technologies, Kanada
ECL-Plus Western Blot Kit	Amersham Bioscience, England
EZNA Cycle Pure Kit	peqLab, Erlangen
JETquick Plasmid miniprep Spin Kit	Genomed, Löhne
JETquick Blood DNA Spin Mini Kit	Genomed, Löhne
Jetquick Gel Extraction Kit	Genomed, Löhne
Mouse V β TCR Screening Panel für FACS	BD Falcon, Heidelberg
<i>Pfu</i> Turbo PCR Amplification	Stratagene, Heidelberg
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy-Kit zur RNA-Isolierung	Qiagen, Hilden

2.5 Labormaterialien

Tabelle 9 Labormaterialien

Labormaterialien	Hersteller
6-Loch-Platten, 24-Loch-Platten, 96-Loch-Platten	Costar, Corning NY, USA
Kryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Filtereinheiten (\varnothing 0,45 μ m)	Millipore, Eschborn
Kanülen	Becton-Dickson, Heidelberg
Kulturflaschen	Becton-Dickson, Heidelberg
Kulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Pasteurpipetten	DrakeMedox, Vancouver, Kanada
2 ml Pipetten	Costar, Corning, NY, USA
5 ml Pipetten	
10 ml Pipetten	

10 µl Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
200 µl Pipettenspitzen	
1000 µl Pipettenspitzen	
14 ml Reaktionsröhrchen	BD Falcon, Heidelberg
15 ml Reaktionsröhrchen	
50 ml Reaktionsröhrchen	
0,2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
1,5 ml Reaktionsgefäße	
2,0 ml Reaktionsgefäße	
10 µl Safetytips	Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag
200 µl Safetytips	
1000 µl Safetytips	
Skalpelle	Swann-Morton, Sheffield, England
1 ml Spritzen	Medox (Codan/Dahlhausen/Omnifix)
5 ml Spritzen	
10 ml Spritzen	
Unbeschichtete (<i>non-tissue-culture</i>) Zellkulturplatten	BD Falcon, Heidelberg
6-Loch- und 24-Loch-Platten	

2.6 Antikörper

Tabelle 10 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper (Klon)	Markierung	Hersteller	Applikation
Ratte - α - Maus CD2	R-Phycoerythrin	BD	FACS
Hamster - α - Maus CD3 (145-2C11)	-	BD	Stimulierung
Hamster - α - Maus CD3 (145-2C11)	R-Phycoerythrin-Cy5	Invitrogen	FACS
Ratte - α - Maus CD4 (RM4-5)	R-Phycoerythrin-Cy5.5	Invitrogen	FACS
Ratte - α - Maus CD5	R-Phycoerythrin-Cy5	BD	FACS
Ratte - α - Maus CD8a (CT-CD8a)	R-Phycoerythrin	Invitrogen	FACS
Ratte - α - Maus CD11a	R-Phycoerythrin	BD	FACS
Maus - α - Maus CD11b (M1/A70)	Allophycocyanin	BD	FACS
Ratte - α - Maus CD19 (6D5)	R-Phycoerythrin-Cy5.5	Invitrogen	FACS
Ratte - α - Maus CD24	R-Phycoerythrin-Cy5	eBioscience	FACS
Ratte - α - Maus CD25	R-Phycoerythrin	Invitrogen	FACS
Hamster - α - Maus CD27	R-Phycoerythrin	BD	FACS
Hamster - α - Maus CD28 (37.51)	-	BD	Stimulierung

Ratte - α - Maus CD44	R-Phycoerythrin	Invitrogen	FACS
Maus - α - Maus CD45.1 (A20)	R-Phycoerythrin	BD	FACS
Maus - α - Maus CD45.2 (104)	PerCP-Cy5.5	BD	FACS
Ratte - α - Maus CD62L	R-Phycoerythrin	Immunotools	FACS
Ratte - α - Maus CD90	R-Phycoerythrin	Immunotools	FACS
Ratte - α - Maus CD117	R-Phycoerythrin	Immunotools	FACS
Hamster - α - Maus TCR β (H57-597)	Allophycocyanin	BD	FACS
Hamster - α - Maus TCR γ/δ	R-Phycoerythrin	Immunotools	FACS
Maus IgG1 - α - Maus Prä-alpha-TCR	-	BD	FACS
Maus - α - Maus NK1.1	Allophycocyanin	BD	FACS
Ratte - α - Maus Sca1	R-Phycoerythrin	BD	FACS
Fc-Block α - Maus CD16/CD32 (2,4G2)	-	BD	FACS-Block
Maus - α - eGFP (B2)	Biotin	Santa Cruz Biot.	Western-Blot
Kaninchen α - TrkA (763)	-	Santa Cruz Biot.	Western-Blot
Kaninchen α - HA (Y-11)	-	Santa Cruz Biot.	Western-Blot
Kaninchen α - TCL1	-	Cell Signaling Tech.	Western-Blot
Sekundäre Antikörper/ Reagenzien	Markierung	Hersteller	Applikation
Streptavidin	Allophycocyanin	BD	FACS
Ratte - α - Maus IgG1	Biotin	BD	FACS
Ziege - α -Ratte-IgG	PE	Invitrogen	FACS
Ziege - α -Hamster-IgG	PE	Invitrogen	FACS
Ziege - α -Maus-IgG	Allophycocyanin	Invitrogen	FACS
Ziege α - Kaninchen	HRPO	Santa Cruz Biot.	Western-Blot
Streptavidin	HRPO	Santa Cruz Biot.	Western-Blot

2.7 Peptide und Zytokine

- Retronektin: Retronektin ist ein rekombinantes Fragment des humanen Zelladhäsionsproteins Fibronektin. Es wurde für die Beschichtung von „Nicht-Gewebekultur-Platten“ (BD) genutzt, um eine Beladung mit retroviralen Partikeln zu ermöglichen. Bezogen von der Firma Takara Bio, Inc. (Japan).
- Humanes Interleukin 2 (hIL-2): Humanes Interleukin 2 wurde zur Stimulierung von reifen T-Lymphozyten genutzt (Stock: 1×10^4 U/ml) und wurde von der Firma Chiron (Ratingen) bezogen.
- Maus Interleukin 3 (mIL3): IL-3 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für hämatopoetische Stammzellen, es sorgt für das Überleben, die Differenzierung und Proliferation von hämatopoetischen Progenitoren. Es wurde zur Stimulierung von

Maus-Stammzellen genutzt. Das gelieferte Lyophilisat wurde in sterilem H₂O aufgenommen. Bezogen von der Firma PeproTech Inc. (Offenbach).

- Maus Interleukin 6 (mIL6): IL-6 ist ein wichtiges Zytokin in der Hämatopoese, es wurde zur Stimulierung von Maus-Stammzellen genutzt. Das gelieferte Lyophilisat wurde in sterilem H₂O aufgenommen. Bezogen von der Firma PeproTech Inc. (Offenbach).
- Maus Stammzell-Faktor (mSCF): SCF ist ein wichtiger hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der seine Signalaktivität über den c-Kit Rezeptor ausübt. SCF und c-Kit sind essentiell für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen. SCF wurde zur Stimulierung von Maus-Stammzellen genutzt. Das gelieferte Lyophilisat wurde in sterilem H₂O aufgenommen. Bezogen von der Firma PeproTech Inc. (Offenbach).

2.8 Verwendete Plasmide und Vektoren

Tabelle 11 Verwendete Plasmide und Vektoren

Interne Labornummer	Fortlaufender Name	Beschreibung	Referenz/Herkunft
M187	Eco-env	Expressionsplasmid für das ecotrophe Hüllprotein von MLV.	[189]
M387	MP91-GFP	Retroviraler Vektor, der für IRES-GFP kodiert, ein Verpackungssignal enthält, mit Leader 91.	C. Baum (MHH) und D. von Laer
M424	B-LMO2	Klonierungsplasmid mit der cDNA von Maus LMO2.	O.Kustikova (MHH)
M425	B-LMO2-HA	Klonierungsplasmid mit der cDNA von HA markiertem Maus LMO2.	O.Kustikova (MHH)
M476	MP91-LMO2	Retroviraler Vektor, der für LMO2-IRES-GFP kodiert, ein Verpackungssignal enthält, mit Leader 91.	In dieser Arbeit generiert
M477	MP91-LMO2-HA	Retroviraler Vektor, der für LMO2-HA-IRES-GFP kodiert, ein Verpackungssignal enthält, mit Leader 91.	In dieser Arbeit generiert
M579	MLV gag-pol	Expressionsplasmid für MLV Gag/Pol mit SV40-Promotor.	C. Baum (MHH)
M691	SF91-ΔTrkA	Retroviraler Vektor, der für ΔTrkA-IRES-GFP kodiert, ein Verpackungssignal enthält, mit Leader 71.	[129]

M692	MP91-TCL1	Retroviraler Vektor, der für TCL1-IRES-GFP kodiert, ein Verpackungssignal enthält, mit Leader 91.	In dieser Arbeit generiert
IRAKp961HO11 12Q2	B-TCL1	Klonierungsplasmid mit der cDNA von Maus TCL1.	ImaGenes
pCR 2.1-TOPO	pCR 2.1 TOPO	Klonierungsplasmid für Sequenzierungen	Invitrogen

MHH: Medizinische Hochschule Hannover; JWG: Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt; HA: Hämagglutinin-Tag/Markierung

Eine schematische Darstellung der verwendeten gammaretroviralen Vektoren ist im Ergebnisteil zu finden und die Plasmidkarten können dem Anhang entnommen werden.

2.9 Bakterien

Für molekularbiologische Arbeiten diente der *Escherichia coli*- Stamm „One Shot Top10“ von Invitrogen (Karlsruhe) als Wirtstamm.

Genotyp:

(**F**- F' {*lacIq Tn10(TetR)*} *mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara- leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*).

2.10 Oligonukleotide

Tabelle 12 Verwendete Oligonukleotide und ihr Verwendungszweck

Name	Primer-Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
LMO2_For	GCG CGT CTT GTC TGC TGC AGC	Sequenzierung
LMO2_Rev	GCC AAA AGA CGG CAA TAT GGT G	Sequenzierung
TCL1_For1	GTG TTG TCT CTG TCT GAC TG	Sequenzierung
TCL1_For2	CTT GCG CCA GGA AGA TGT CAC	Sequenzierung
TCL1_Rev1	CCA AGC GGC TTC GGC CAG	Sequenzierung
TCL1_Rev2	CCA AGG TGA CAT CTT CC TG	Sequenzierung
Biotin A1	(biotin) CTG GGG ACC ATC TGT TCT TGG CCC T	LM-PCR
A2 RV	GCC CTT GAT CTG AAC TTC TC	LM-PCR

A3 RV	CCA TGC CTT GCA AAA TGG C	LM-PCR
OC1/FW	GAC CCG GGA GAT CTG AAT TC	LM-PCR
OC2/FW	AGT GGC ACA GCA GTT AGG	LM-PCR
Linker 1 FW	GAC CCG GGA GAT CTG AAT TCA GTG GCA CAG CAG TTA GG	LM-PCR
Linker 2 RV	CCT AAC TGC TGT GCC ACT GAA TTC AGA TCT CCC G	LM-PCR
RASEQ	CTT GCA AAA TGG CGT TAC	LM-PCR
oIMR0189	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG	Genotypisierung
oIMR1746	GAG GTT CCG CTA CGA CTC TG	Genotypisierung
oIMR3104	CCG GAC AAG TTT TTC ATC GT	Genotypisierung
MuBV1	CTG AAT GCC CAG ACA GCT CCA AGC	TCR-Status
MuBV 2	TCA CTG ATA CGG AGC TGA GGC	TCR-Status
MuBV 3	CCT TGC AGC CTA GAA ATT CAG T	TCR-Status
MuBV 4	GCC TCA AGT CGC TTC CAA CCT C	TCR-Status
MuBV 5.1	CAT TAT GAT AAA ATG GAG AGA GAT	TCR-Status
MuBV 5.2	AAG GTG GAG AGA GAC AAA GGA TTC	TCR-Status
MuBV 5.3	AGA AAG GAA ACC TGC CTG GTT	TCR-Status
MuBV 6	CTC TCA CTG TGA CAT CTG CCC	TCR-Status
MuBV 7	TAC AGG GTC TCA CGG AAG AAG C	TCR-Status
MuBV 8.1	GGC TGA TCC ATT ACT CAT ATG TC	TCR-Status
MuBV 8.2	TCA TAT GGT GCT GGC AGC ACT G	TCR-Status
MuBV 8.3	TGC TGG CAA CCT TCG AAT AGG A	TCR-Status
MuBV 9	TCT CTC TAC ATT GGC TCT GCA GGC	TCR-Status
MuBV 10	ATC AAG TCT GTA GAG CCG GAG GA	TCR-Status
MuBV 11	GCA CTC AAC TCT GAA GAT CCA GAG C	TCR-Status
MuBV 12	GAT GGT GGG GCT TTC AAG GAT C	TCR-Status
MuBV 13	AGG CCT AAA GGA ACT AAC TCC ACT	TCR-Status
MuBV 14	ACGA CCA ATT CAT CCT AAG CAC	TCR-Status
MuBV 15	CCC ATC AGT CAT CCC AAC TTA TCC	TCR-Status
MuBV 16	CAC TCT GAA AAT CCA ACC CAC	TCR-Status

MuBV 17	CTA AGT GTT CCT CGA ACT CAC	TCR-Status
MuBV 18	CAG CCG GCC AAA CCT AAC ATT CTC	TCR-Status
MuBV 19	CTG CTA AGA AAC CAT GTA CCA	TCR-Status
MuBV 20	TCT GCA GCC TGG GAA TCA GAA	TCR-Status
MuTCB3C	AAG CAC ACG AGG GTA GCC T	TCR-Status
Aktin-F	GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC	Aktin-Kontrolle
Aktin-R	CAA ACA TGAT CTG GGT CAT CTT CTC	Aktin-Kontrolle

2.11 Enzyme und Größenstandards

Tabelle 13 Verwendete Enzyme und Größenstandards

Enzyme	Hersteller
100bp-Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main
1kb-Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Calf Intestine Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Diverse Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinmarker für Western-Blot	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase, Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Enzyme in den mitgelieferten Puffern und Zusätzen verwendet.

2.12 Zelllinien und Medien mit Zusätzen

Tabelle 14 Beschreibung der verwendeten Zelllinien und deren Medien mit Zusätzen

Zelllinie/ primäre Zellen	Beschreibung/Medium
293T	Humane, embryonale Nierenepithelzelllinie [190]. 293T- Zellen sind ein Derivat von 293- Zellen und enthalten das T- Antigen von SV40. Wurde als Verpackungszelllinie genutzt. → DMEM mit 10% FCS, 2% Glutamin und 1% Pen/ Strep
SC1	Murine Fibroblastenzelllinie [191]. Für die Titration retroviraler Überstände genutzt. → DMEM mit 10% FCS, 2% Glutamin und 1% Pen/ Strep
Primäre T-Lymphozyten	Isoliert aus Milz und Lymphknoten von C57BL/6 Ly5.1 oder OT-I Spendermäusen. → Maus-Medium-Spezial: RPMI 1640 mit 10% FCS, 2% Glutamin, 1 % Pen/ Strep, Natrium Pyruvat (1×), NEAA (1×) und β - Mercaptoethanol (1×) + 100U/ml IL-2.
Primäre Sca1 ⁺ Stammzellen	Isoliert aus dem Knochenmark der hinteren Extremitäten von sechs bis acht Wochen alten C57BL/6 Ly5.1 Spendermäusen. → RPMI mit 10 % FCS, 50 ng/ ml mSCF, 10 ng/ ml mIL-3, 50 ng/ ml mIL-6
Immortalisierte T-Zell Population	Isoliert aus Milz und Lymphknoten von C57BL/6 Ly5.1 Spendermäusen. Nach retroviraler Transduktion mit dem Vektor MP91-LMO2 <i>in vitro</i> immortalisiert. Medium siehe primäre T-Lymphozyten.

2.13 Materialien für Tierexperimente

2.13.1 Mausstämme und Haltungsbedingungen

Die verwendeten Mausstämme wurden von Charles River Laboratories bzw. Jaxmice, USA bezogen.

Alle Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (VI 63 – 19 c 20/15-F 123/21 und VI 63 – 19 c 20/15-F 123/22).

Tabelle 15 Verwendete Mausstämme

Name/Referenz	Interner Name	Firma
B6.SJL- <i>Ptprc^a Pep3^b</i> /BoyJ [192]	Ly5.1	Charles River Laboratories Jaxmice, USA
B6.129S7-Rag-1 ^{tm1Mom} /J [193]	Rag-1	Charles River Laboratories Jaxmice, USA
C57BL/6Tg (TcraTcrb) 1100Mjb/j [194]	OT-I	Charles River Laboratories Jaxmice, USA

Ly5.1 und OT-I wurden zur Isolierung von T-Lymphozyten oder Sca1⁺-Stammzellen genutzt. Rag-1 defiziente Mäuse exprimieren keine reifen T- und B-Lymphozyten und dienen als Empfängertiere. Ly5.1 Zellen konnten nach Transplantation in Rag-1 Rezipienten (Hintergrund C57BL/6 Ly5.2) durch das Antigen CD45.1 von endogenen, hämatopoetischen CD45.2 Zellen unterschieden werden.

Transgene OT-I Mäuse exprimieren einen exogenen TCR, der im H2K^b Kontext (MHC-I) spezifisch gegen ein Epitop (Aminosäurereste 257-264) von Ovalbumin (OVA) gerichtet ist. Aufgrund des MHC-Kontext werden bei diesen Tieren fast ausschließlich zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+) generiert. Die Spenderzellen wurden als monoklonale T-Zell Population genutzt.

2.13.2 Tierexperimentelle Materialien

Tabelle 16 Tierexperimentelle Materialien und ihr Verwendungszweck

Materialien	Verwendungszweck	Hersteller
Ohrlocher (Napox)	Markierung der Versuchstiere	Heiland, Hamburg
Histosette	Organ-Einbettung	Simport, Kanada
Microvette (EDTA-beschichtet)	Blutentnahme	Sarstedt, Nümbrecht
Präparationsbesteck (Hebu)	Sektion	Heiland, Hamburg
Insulinspritze	Intravenöse Transplantation	BD, Heidelberg
Metallsieb	Homogenisieren von Organen	Sigma, Deisenhofen
Zellsieb (100µm)	Homogenisieren von Organen und Filtern von Zellsuspensionen	BD, Heidelberg

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Techniken

3.1.1 Restriktionsspaltung von DNA durch Endonukleasen

Die Spaltung von Plasmid-DNA wurde mit 3-10 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzym pro 1µg DNA durchgeführt. Für jedes verwendete Restriktionsenzym musste ein vom Hersteller empfohlener Puffer verwendet werden, damit das Enzym optimal an den spezifischen Sequenzmotiven schneiden konnte.

Spezifisch für das jeweilige Restriktionsenzym wurden bestimmte Inkubationszeiten (meist 1-3 Stunden) und Inkubationstemperaturen (meist 37°C) eingehalten, falls nicht anders angegeben. Ein Abbruch der Restriktionsspaltung erfolgte entweder durch die Zugabe des DNA-Ladepuffers oder durch eine mittels Hitze induzierte Denaturierung (65°C für 15min.) des jeweiligen Restriktionsenzym, sofern dies vom Hersteller angegeben wurde.

3.1.2 Erzeugung von „glatten“ Restriktionsenden durch Klenow

Durch den Restriktionsverdau von DNA mit bestimmten Restriktionsenzymen kommt es zur Bildung von 5'-Einzelstrangüberhängen. Bei den Klonierungsarbeiten zu dem retroviralen Vektor MP91-TCL1 mussten diese Überhänge entfernt werden, um eine Ligation von ansonsten nicht kompatiblen Strangenden zu ermöglichen. In diesen Fällen wurde mit Hilfe des Klenow-Fragments das rezessive 3'-Ende durch die DNA-Polymeraseaktivität des Klenow-Fragments vervollständigt, um glatte Enden herzustellen. Dazu wurde 1 Einheit des Klenow-Fragments in dem vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer, 1µl mit 0,5 mM dNTP's (je 1mM dCTP, dATP, dGTP und dTTP) mit 1µg DNA vereinigt. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Klenow-Aktivität bei 75°C für 20 Minuten.

3.1.3 5' - Dephosphorylierung von DNA- Fragmenten

Um eine Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden dieses gespaltenen Vektors dephosphoryliert. Durch das Verhindern der Selbstligation wurde der Einbau von Fremd-DNA begünstigt und die Klonierungseffizienz erhöht.

Die alkalische Phosphatase (CIP) entfernte die 5'-Phosphatgruppen von DNA, im alkalischen Milieu (pH 9,5-10,5). Hierbei wurden nur die endständigen 5'-Phosphate hydrolysiert, die innerhalb der Nukleinsäure-Moleküle liegenden Phosphodiester-Bindungen waren davor geschützt. Pro μg eingesetzter DNA wurde eine Einheit alkalischer Phosphatase eingesetzt, es erfolgte eine Inkubation von 30min. bei 37°C.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden lineare DNA-Fragmente ihrer molekularen Größe nach aufgetrennt. Es wurden 1%ige (w/v) Agarose-Gele mit 1× TAE-Puffer verwendet. Hergestellt wurden diese Gele unter Hitzezufuhr in der Mikrowelle, um die benötigte Menge an Agarose-Pulver in TAE-Puffer zu lösen. Die leicht abgekühlte Gel-Lösung wurde anschließend mit Ethidiumbromid ($2\mu\text{g/ml}$) versetzt, um eine spätere Detektion der DNA zu ermöglichen. Dadurch dass Ethidiumbromid unspezifisch zwischen Basenpaare von DNA-Strängen interkaliert, kann DNA durch orangefarbiges, fluoreszierendes Leuchten nach Anregung im UV-Licht detektiert werden. Um die DNA-Proben in verschiedene Gel-Taschen auftragen zu können, mussten diese mit 6×Ladungspuffer vermischt werden. Zur Bestimmung der Größen der einzelnen DNA- Stücke wurden zwei Größenmarker als Referenz aufgetragen (1kb, 100bp). Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 1 bis 5 V/cm. Die DNA-Banden wurden mit einem Transilluminator ($\lambda = 366\text{nm}$) sichtbar gemacht und mittels Videokamera (Gel Doc 2000, BioRad, München) dokumentiert.

3.1.5 Gel-Extraktion zur Isolierung von DNA

Zunächst wurde die benötigte DNA-Bande aus dem Agarose-Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dies erfolgte sehr zügig und unter einem schwachen UV-Licht, um Schädigungen der DNA zu vermeiden. Die Elution aus dem Gel wurde nach Anleitung des Jetquick Gel Extraction Kit (Tabelle 8) durchgeführt. Dabei wurden durch chaotrope Reagenzien und gleichzeitiges Erhitzen die Agarose-Polymere denaturiert, was jedoch nicht zur Denaturierung der DNA führte, weil der Schmelzpunkt für die DNA höher liegt. Die DNA-Fragmente wurden zum Entfernen der Agarose-Lösung mittels einer Kieselgel-Säule gereinigt.

3.1.6 Ligation von DNA- Fragmenten

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung der Enden zweier verschiedener Nukleinsäuremoleküle durch das Enzym Ligase. Durch DNA-Ligasen wird die Bildung von Phosphodiesterbindungen katalysiert, es erfolgt also die Bindung einer freien 5'-Phosphatgruppe mit einer freien 3'-Phosphatgruppe. Die Ligation dient dazu, neue Plasmid-Konstrukte zu bilden, indem die Ligase ein zu inserierendes DNA-Fragment (*Insert*) mit einer linearen Plasmid-DNA (*backbone* - „*gapped plasmid*“) verknüpft.

Damit diese Verknüpfung so effektiv wie möglich verläuft, wählt man das Mengenverhältnis so, dass es sich zugunsten des Inserts verschiebt. Berechnet wurde das Verhältnis mit der folgenden Formel:

$$G_I [ng] = \frac{x * G_V [ng] * L_I [bp]}{L_V [bp]}$$

G_I = Gewicht des Inserts

G_V = Gewicht des Vektors in ng

L_I = Länge des Inserts in bp

L_V = Länge des Vektors in bp

x = Verhältnis Insert zu Vektor

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA-Ligase durchgeführt.

Die Ligation erfolgte über Nacht (16°C) einem Gesamtvolumen von 25µl mit 2,5µl des 10x Ligase-Puffers und 1µl T4 DNA-Ligase. Für die Ligation wurden etwa 200ng des geschnittenen Plasmids und ein etwa dreifacher Überschuss des Inserts eingesetzt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet.

3.1.7 Transformation

Hier wird unter Transformation die Einführung von (Spezies)fremder DNA in Bakterienzellen verstanden.

Für die Transformation wurden „superkompetente *Escherichia coli* One Shot Top10“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Bei gram-negativen Bakterien wie *E. coli* ist die äußere Membran nur permeabel für niedermolekulare Substanzen. Um kompetente Zellen zu erhalten, die für die Aufnahme externer, artfremder DNA empfänglicher sind, muss deren peptidoglykanhaltige Hülle in der frühlogarithmischen Phase ihres Wachstums geschädigt

werden. Dazu können die interferierenden Chemikalien Rubidiumchlorid, Manganchlorid und Calciumchlorid verwendet werden, deren Kationen die starren Poren der äußeren Hülle öffnen.

Zunächst wurden bei der Transformation die chemokompetenten Bakterienzellen auf Eis aufgetaut (etwa 10min.). Anschließend wurden zu 50µl kompetenten Zellen, 10µl des jeweiligen Ligationsansatzes gegeben und es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30min. Nachdem die Zellen durch das Eis auf eine niedrige Temperatur abgekühlt worden waren, wurden sie einem Hitzeschock ausgesetzt. Hierzu kamen die Zellen für etwa 45sec. bei 42°C ins Wasserbad (nicht in den Heizblock!). Dies wird als Hitzeschock bezeichnet, weil durch den raschen Temperaturwechsel die bakterielle Membran plötzlich gedehnt wird, wodurch die Plasmide von den Zellen aufgenommen werden können. Die Bakterien wurden anschließend für 2min wieder auf Eis abgekühlt, um dem Hitzestress entgegenzuwirken. Die transformierten Bakterienzellen wurden mit 450µl vorgewärmtem Komplettmedium (LB-Medium, 37°C) 60min. bei 37°C und 220rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Diese Zeit dient nicht nur der Vermehrung der Zellen selbst, sondern natürlich auch der transformierten Gene. Besonders die Resistenzgene wurden hierbei stark von den Zellen exprimiert. Dieser Vorgang war besonders wichtig für die anschließende Selektion von positiven, d.h. transformierten Klonen, auf vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten (37°C), die als Selektionsmedium dienten. Die Bakteriensuspension wurde hierzu auf den Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. War die Transformation erfolgreich, so konnten die positiv transformierten Zellen, die das entsprechende Resistenzgen exprimierten und einzelne Kolonien auf den Platten bildeten, am folgenden Tag „gepickt“ und in flüssigem Selektionsmedium (LB-Ampicillin-Medium) angeimpft werden.

3.1.8 Plasmidpräparationen

3.1.8.1 Analytische Plasmidpräparation (Minipräp)

Von einer Agarplatte wurden Übernachtskulturen in 3ml LB-Medium plus Antibiotikum (Ampicillin) mit jeweils einer einzelnen Kolonie angeimpft. Die Kultivierung wurde bei 37°C und 220rpm im Schüttelinkubator vorgenommen. Die transformierten Bakterien wurden unter Antibiotika-Selektion angezogen und anschließend in der späten stationären Wachstumsphase geerntet. Hierzu wurden je 2ml der Kulturen in einem Eppendorfgefäß pelletiert (5min.; 13000×g) und der Überstand abgesaugt. Der Rest der jeweiligen Kultur wurde bei 4°C gelagert, um im Falle eines positiven Klons, ein Nachzüchten zu ermöglichen.

Die analytische DNA-Präparation wurde nach dem Protokoll des Kits „JETquick Plasmid miniprep Spin Kit, Genomed“ (Tabelle 8) durchgeführt.

Die Bakterien wurden einer alkalischen Lyse unterzogen. Durch die Zugabe von EDTA wurden der äußeren Bakterienmembran Kationen entzogen und diese dadurch destabilisiert. Das Detergenz SDS denaturierte alle vorhandenen Proteine und NaOH sorgte für einen hohen pH, wodurch doppelsträngige DNA denaturiert wurde. Die komplementären Stränge des zirkulären Bakterien-Genoms („chromosomale Bakterien-DNA“) wurden dabei vollständig voneinander getrennt. Die Einzelstränge der zirkulären Plasmid-DNA hingegen blieben ineinander verschränkt (Konkatemere).

Somit renaturierten sich diese kurzen Plasmid-DNA Stücke beim Absenken des pH-Wertes durch Zugabe von Acetat wieder schnell und vollständig. Die lange, chromosomale DNA hingegen verblieb in einem denaturierten Zustand. Die anschließende Zentrifugation sorgte dafür, dass Zelltrümmer, chromosomale DNA und RNA pelletiert wurden, wobei Plasmid-DNA aufgrund seiner niedrigeren Molekularmasse im Überstand verblieb. Die vollständige Trennung der Plasmid-DNA von verbleibender RNA sowie von Restprotein erfolgte mittels der Anionen-Austauscher Chromatographie. Hierbei wurde die Plasmid-DNA an eine Säule gebunden, die Kieselgel als Trägermaterial aufwies. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch einen Hochsalzpuffer.

3.1.8.2 Präparative Plasmidpräparation

Die präparative Plasmidpräparation diente der Aufarbeitung von 250 ml Übernachtskultur. Die Kultivierung der Bakterien und die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgten nach dem „Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiagen“ (Tabelle 8). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ bestimmt. Im Durchschnitt wurde eine Ausbeute von 2-4 $\mu\text{g/ml}$ Bakterienkultur erreicht.

3.1.9 Anlegen von Glycerinkulturen

Um einen Bakterienklon dauerhaft zu lagern, wurde ein Aliquot einer logarithmisch in LB-Medium wachsenden Bakterienkultur mit Glycerin (Endkonzentration 50%) versetzt. Das Glycerin diente hierbei als Gefrierschutzmittel. Um die Diffusion des Glycerins in die Zellen zu erleichtern, wurde die Mischung von 0,5ml einer Übernachtskultur mit 0,5ml Glycerin für ca. 30min . bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei -80°C gelagert.

3.1.10 DNA-Isolierung aus Blut, Zellsuspensionen und Geweben

Genomische DNA aus Geweben, Zellen und Blut wurde mit dem Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit und dem JETquick Blood DNA Spin Mini Kit isoliert.

Es wurden hierfür entweder 5×10^5 - 5×10^6 Zellen pelletiert und in 200 μ l PBS resuspendiert oder 50-100 μ l Blut eingesetzt. Das Blut und Biopsien von Mausschwänzchen wurden mit Proteinase K vorbehandelt. Hierzu wurden 20 μ l Proteinase K Stock-Lösung mit 200 μ l ATL Puffer gemischt und diese Lösung mit dem Blut oder der jeweiligen Biopsie vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 56°C, für die Biopsien der Schwanzspitzen ü.N. und für das Proteinase K – Blut Gemisch eine Inkubation für 10min. Nach dieser Vorbehandlung wurden die lysierten Proben in das Protokoll des jeweiligen Kits eingesetzt und die DNA Extraktion erfolgte nach Anleitung. DNA wurde anschließend in 100 μ l H₂O eluiert und die Konzentration der Eluate anhand der Absorption der Lösung bei 260nm photometrisch mit Hilfe des Nanodrop bestimmt.

3.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die „*Polymerase chain reaction*“ (Polymerasekettenreaktion, PCR) wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt.

Durch die PCR können sehr schnell *in vitro* Amplifikationen und/oder Mutagenese von DNA-Sequenzen durchgeführt werden. Durch zwei Oligonukleotide, die jeweils am Sense- und Anti-Sense-Strang der DNA binden, kann die dazwischen liegende Zielsequenz amplifiziert werden.

Die Polymerisation der gewünschten DNA-Sequenz erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Genotypisierung von Rag-1 defizienten Tieren die *Pfx*-Polymerase verwendet.

Die zyklische Synthesereaktion ist in Intervalle unterschiedlicher Reaktionstemperatur unterteilt. Ein Zyklus umfasst drei Temperaturstufen: 1. Aufschmelzen, d.h. Trennung des DNA-Doppelstranges bei hoher Temperatur. 2. Anlagerung der komplementären Oligonukleotide (*Primer*) (niedrige Temperatur). 3. Polymerisationsreaktion (mittlere Temperatur), bei welcher das DNA-Stück zwischen den *Primer* Bindungsstellen amplifiziert wird.

Folgendes wurde für die PCR zur Genotypisierung Rag-1 defizienter Tiere pipettiert:

Tabelle 17 Zusammensetzung der Genotypisierungs-PCR

10x Amplifikationspuffer <i>Pfx</i>	5µl
oIMR0189 (Primer 1)	1µl (1,0µM)
oIMR1746 (Primer 2)	1µl (0,4µM)
oIMR3104 (Primer 3)	1µl (0,4µM)
<i>Pfx</i>	0,5µl (1,2 Units)
dNTP 's	1,5µl (10mM)
MgSO ₄	1µl
Template-DNA	1µl (20-60ng)
H ₂ O	38µl
Gesamtvolumen	50µl

Für die Genotypisierung der Rag-1 Tiere wurden insgesamt drei Oligonukleotide in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die Kombination oIMR1746 und oIMR3104 amplifiziert das WT Allel von *Rag-1* und ergibt eine Bandengröße von 474bp. Erfolgt eine Amplifikation mit oIMR1746 und oIMR0189, so erhält man eine 530bp Bande. Diese größere Bande ist auf die *Rag-1* Deletion in den transgenen Rag-1 defizienten Tieren zurückzuführen, da oIMR0189 an der Sequenz einer inserierten Neomycin-Resistenz-Kassette bindet. Die Deletion des Rag-1 Gens erfolgte durch homologe Rekombination der Neomycin-Resistenz und dem Rag-1 Locus [193]. So kann man zwischen WT (nur 474bp Fragment), heterozygoten (474bp und 530bp Fragment) und homozygoten (nur 530bp Fragment) Tieren unterscheiden.

Folgende Programmierung des PCR-Gerätes wurde vorgenommen:

Tabelle 18 Programmierung des PCR-Gerätes

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)	
1	94	180	
2	94	30	
3	55	60	
4	72	60	Zu Schritt 2, 35 Zyklen
5	72	120	
6	10	Pause	

Die PCR zur Rekombination der TCR-β-Kette wurde nach [195] durchgeführt.

3.1.12 RNA-Isolierung und RT-PCR

RNA wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen isoliert. Pelletierte Zellen wurden hierzu mit 600µl RLT Puffer lysiert und in RNase freie 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden nachfolgend laut dem RNeasy Protokoll aufgearbeitet. Die RNA wurde mit 50µl H₂O eluiert. Um DNA-Kontaminationen zu vermeiden, wurde der im RNeasy Kit beschriebene DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Anschließend wurde der RNA-Gehalt der Proben photometrisch bestimmt und die gewonnene RNA bei -80°C gelagert. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Bei der anschließenden Reversen Transkription wurde die RNA in komplementäre cDNA umgeschrieben. Diese konnte dann für PCR-Reaktionen verwendet werden. Die Transkription der RNA erfolgte mit Hilfe einer thermostabilen reversen Transkriptase (RT). Die eingesetzte Superscript II ist ein Derivat des Moloney Murine Leukämie Virus (M- MLV) RT [104-106] mit reduzierter RNase H-Aktivität und besserer Hitzestabilität.

Für die RT-Reaktion wurde standardmäßig 1µg RNA mit Random-Primern eingesetzt, da hierdurch auch virale RNA umgeschrieben wird. Folgendes Pipetierschema wurde verwendet:

1µl dNTP's (10mM)

1µl Random-Primer (250nM)

5µl gesamt RNA (1µg)

5µl H₂O

danach bei 65 °C 5min. inkubieren

folgender Mastermix wurde zugegeben:

4µl Superscript Puffer

1µl RNASEout

2µl 0,1 M DTT

danach wurde für 10min. bei RT inkubiert,

1µl Superscript zugeben und 50min. bei 42°C inkubiert.

Die gewonne cDNA konnte entweder direkt in einer PCR eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden.

3.1.13 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen der klonierten retroviralen Vektoren wurden von der Service-Abteilung des „Georg Speyer Hauses“ (Margot Landersz, Dr. Ursula Dietrich) mit einem 3100 Avant

Genetic Analyzer durchgeführt. Diese erfolgten nach dem Kettenabbruchverfahren [196]. Zur Sequenzierung von Minipräparationen wurden 10µl DNA-Lösung verwendet und mit 1µl (10µM) Primerlösung versetzt. Bei Maxipräparationen wurden 0,5µg Plasmid-DNA pro Sequenzierreaktion eingesetzt.

3.1.14 Ligationsvermittelte PCR (LM-PCR) und Integrationsanalyse

Um die genaue Position der integrierten, retroviralen Proviren zu bestimmen, mussten die im Genom flankierenden Sequenzen identifiziert werden. Eine Amplifikation dieser Bereiche ist insofern erschwert, da nur die Sequenzen des integrierten Provirus bekannt sind.

Für die Amplifikation von DNA-Bruchstücken, deren Sequenz man nur teilweise kennt, ist die LM-PCR (*Ligation-mediated PCR*) eine sehr effektive Methode [197].

Nach der DNA-Isolierung aus Blut, Zellsuspensionen oder Tumoren wurde die DNA mit einem Restriktionsenzym so geschnitten, dass glatte (*blunt*) Enden entstanden. Die Restriktion fand hierbei in der bekannten Provirus-Sequenz statt (in beiden LTR-Sequenzen und einmal dazwischen) und in Abhängigkeit von der Integration irgendwo im Genom der Wirtszelle. Mit speziellen biotinylierten Oligonukleotiden, die in der Nähe der Schnittstellen an die bekannten Sequenzen der LTRs banden, konnte nun eine Strangverlängerung (*Primer Extension*) stattfinden. Die resultierenden Fragmente wurden anschließend über paramagnetische, Streptavidin-beschichtete Partikel isoliert. Zwei Fragmente wurden hierbei aufgereinigt, ein kurzes mit der 3´LTR und einem bekannten Teil des Vektors (interne Bande), sowie ein weiteres mit der 5´LTR und einem Teil der unbekanntes, genomischen Sequenz (externe Bande). An das Ende der unbekanntes DNA-Fragmente, sowie die interne Bande wurde dann eine Linker/Adapter-Kassette bekannter Sequenz angefügt (*Adapter Ligation*). Es wurden Linker-Kassetten verwendet, die aus zwei nicht phosphorylierten Oligonukleotiden bestehen und durch unterschiedliche Fragmentlänge nur ein stumpfes Ende aufwiesen. Die Ligation erfolgte so gerichtet nur zwischen Linker-Kassette und dem unbekanntes (bzw. Provirus internen) Ende der Ziel-DNA. Für die PCR konnte ein Primer verwendet werden, der mit diesem Linker bindefähig ist, und ein weiterer Primer, der mit dem bekannten Teil, der LTR-Sequenz bindefähig war. Um eine höhere Empfindlichkeit und stärkere Amplifikation der Zielsequenz zu erreichen, wurde zusätzlich eine *nested* PCR durchgeführt.

Das Vorgehen in der vorliegenden Arbeit wurde nach Schmidt et al. [55] adaptiert und ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

Die nach der LM-PCR gewonnenen Integrationen, die zumindest die LTR- oder Polylinker-Sequenz aufwiesen (MP91-LMO2: 20, MP91-TCL1: 13, MP71-ΔTrkA: 15) wurden über BLAST

[198] mit dem gesamten Mausgenom „NCBI36“ abgeglichen (Zugriff September 2007). Gene in 100kb Entfernung (Strangauf- oder -abwärts) zu den Vektorintegrationen, sowie die in unmittelbarer Nähe gelegenen Gene wurden mit NCBI *mapview* identifiziert (Zugriff Juli 2007). Die in der *Entrez Gene* Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene) angegebenen Identifikationsnummern wurden für eine bioinformatische Analyse mit der Software PANTHER (<http://pantherdb.org>, Version 6.1) genutzt. Hierbei wurde für die einzelnen Integrations-flankierenden Gene eine Kategorisierung in verschiedene „PANTHER Signalwege“ vorgenommen und die Genontologie/Genannotation festgelegt. Das Mausgenom NCBI36 diente hierbei als Referenz-Datensatz. Weiterhin wurden die identifizierten Gene in der RCGD [66] (Zugriff August 2007), hinsichtlich auftretender CIS (*common integration sites*) untersucht.

Die Arbeiten der LM-PCR und der Integrationsanalyse wurden in Kooperation von K. Cornils (JWG-Universität Frankfurt am Main) und Dr. M. Brugman (MHH) durchgeführt.

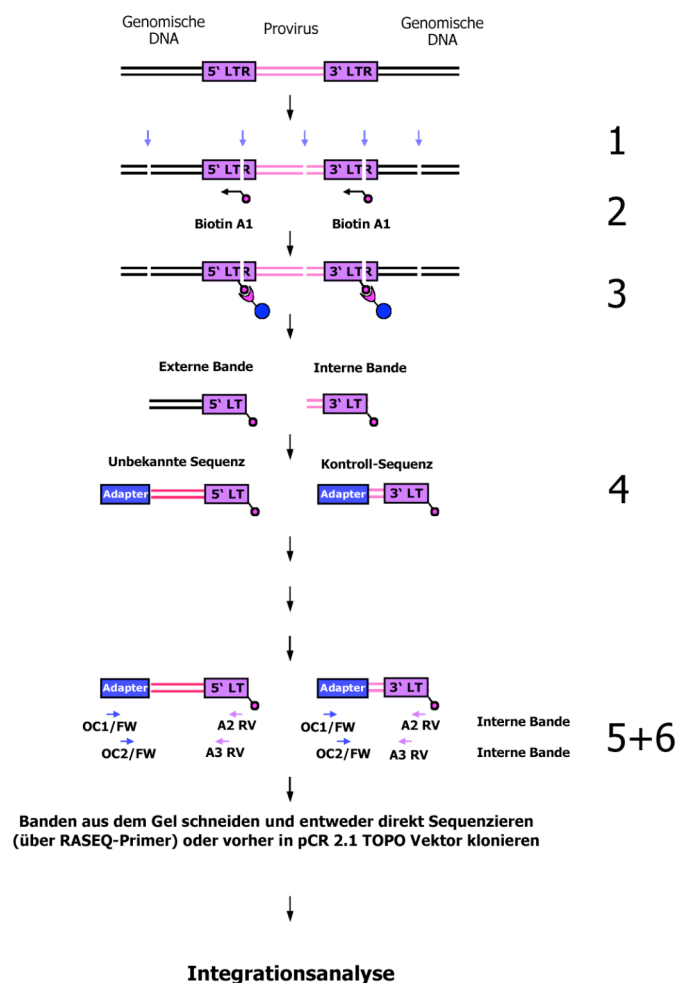


Abbildung 18 Diagramm der „Ligationsvermittelten PCR“

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der LM-PCR (1-6) genauer erläutert:

1. Restriktion der Genomischen DNA

Hierzu wurde das Enzym Tsp509I und 0,2-1µg genomische DNA verwendet.

2. Strangverlängerung (*Primer Extension*)

Dieser Schritt wurde mit der *Pfu* Polymerase und dem Oligonukleotid Biotin A1 durchgeführt:

10µL DNA

1µL Native *Pfu* DNA Polymerase

2µL 10x Native Pfu buffer

0,4µL 10mM dNTPs

1µL Biotin A1 Primer (0.25pmol/µL)

ad 20 µL H₂O

Inkubation für 15min. bei 95°C, 30min. bei 64°C und 15min. bei 72°C

3. Biotin-Streptavidin Interaktion

Nach der Aufreinigung der DNA über das QIAquick PCR Purification Kit, wurde die DNA in 40µl H₂O eluiert.

Je Probe wurden 20µl Streptavidin-konjugierte Beads verwendet. Diese 20µl wurden zweimal mit 100µl 2xBW Puffer gewaschen und in 40µl von BW resuspendiert.

Zu den 40µl DNA wurden nun 40µl der vorbereiteten Beads zugegeben und das Gemisch für 1,5-5 Stunden bei RT auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit H₂O gewaschen und das DNA-Bead-Konjugat in 5µl H₂O resuspendiert.

4. Ligation der Linker-Kassette

Pro Probe:

5µL DNA-bead-Konjugat

0,2µL T4 Ligase

1µL 10x Ligations-Puffer

1µL Polylinker

2,8µL H₂O

Inkubation ü.N. bei 16°C.

Anschließend zweimal mit 100µL H₂O waschen und in 10µL H₂O resuspendiert.

Der Polylinker wurde wie folgt vorbereitet:

40µL H₂O

20µL Linker 1 FW (200 pmol/µL)

20µL Linker 2 FW (200 pmol/µL)

Inkubation für 5min. bei 70°C im Wasserbad.

Add 20µL 5x Annealing Puffer.

Inkubation für 5min. bei 70°C im Wasserbad. Wasserbad ausgeschaltet und Proben ü.N. darin inkubiert.

Am Morgen 10µL Aliquots angefertigt und bei -20°C aufbewahrt (jeweils ein Aliquot nur einmal benutzt).

5+6. LM-PCR und *nested* PCR

Pro LM-PCR:

1µL DNA-Beads
 12,5µL Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix
 1µL OC1/FW (25 pmol/µL)
 1µL A2RV (25 pmol/µL)
 9,5µL H₂O

PCR- Programm:

94°C 2min.
 94°C 15sec. ┐
 60°C 30sec. 30x
 68°C 2(-4)min. ┘
 68°C 10min.
 4°C ∞

Anschließend an diese erste PCR wurden 1-2µl des Produkts 1:300 verdünnt.

Pro *nested* PCR:

1µL DNA (1:300)
 12,5µL Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix
 1µL OC2/FW (25 pmol/µL)
 1µL A3 RV (25 pmol/µL)
 9,5µL H₂O

PCR- Programm:

94°C 2 min.
 94°C 15 sec ┐
 60°C 30 sec 30x
 68°C 2(-4) min. ┘
 68°C 10 min.
 4°C ∞

Nach dem Auftragen auf ein Agarose-Gel wurden auffällige Banden entweder ausgeschnitten und mit dem RASEQ-Primer direkt sequenziert oder vorher noch in den Vektor pCR 2.1 TOPO kloniert. Anschließend erfolgte nach der Sequenzierung die bereits beschriebene Integrationsanalyse.

3.1.15 Western-Blot

3.1.15.1 Lyse von Zellen

Etwa 1×10^7 Zellen wurden in ein steriles 2ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (13000rpm, 2min.). Die Zellpellets wurden einmal mit 1ml kaltem 1xPBS gewaschen und anschließend sofort bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Unmittelbar vor der Zelllyse wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und anschließend je $100\mu\text{l}$ eiskalter Lysispuffer zugegeben. Die Zellpellets wurden in diesem gut resuspendiert, 30min. auf Eis inkubiert und dabei alle 5min. gevortext.

Das im Lysispuffer enthaltene Detergenz TritonX-100 umlagert aufgrund seiner lipophilen Anteile die Proteine und solubilisiert diese wegen seiner hydrophilen Bestandteile in wässriger Lösung. Proteaseinhibitoren wie PefablocRSC verhindern eine Degradierung der Proteine. Anschließend wurden Zelltrümmer, Membranbestandteile sowie Organellen abzentrifugiert (13000rpm, 10min.) und die proteinhaltigen Überstände in neue, sterile 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zelllysate wurden bei -20°C gelagert.

3.1.15.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Zelllysate

Die SDS-PAGE trennt Proteine gemäß ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld in einer engmaschigen Polyacrylamid-Gelmatrix auf. Die Gelmatrix entsteht durch die Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Bisacrylamid. Da unterschiedliche Proteine eine unterschiedliche Nettoladung haben, wird diese von Natriumdodecylsulfat (SDS) abgeschirmt. Das amphiphile SDS komplexiert die Proteine mit seinem aliphatischen Teil ($1,4\text{g SDS}/1\text{g Protein}$). Dadurch werden die Proteine mit einer stark negativen Ladung maskiert. Bei einer Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe bei konstanter Spannung und Stromstärke, steht deren relative Beweglichkeit in der Gelmatrix logarithmisch zu deren Masse. Es wird ein diskontinuierliches Gel nach angewandt, das aus einem Sammelgel und einem Trenngel besteht. Im weitmaschigen Sammelgel werden alle Proteine der aufgetragenen Proteinlösung auf ein einheitliches Startniveau gebracht und anschließend im engmaschigen Trenngel gemäß ihrer Masse aufgetrennt. Bei der SDS-PAGE wurde zunächst ein 14%iges Trenngel und anschließend ein 4%iges Sammelgel zusammen pipettiert (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19 Pipettierschema für SDS-PAGE

Stammlösung	14%iges Trenngel	4% Sammelgel
30 % (w/v) Acrylamid/ 0,8 % (w/v) N,Bisacrylamid	4,7ml	1,3ml
Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris)	-	2,5ml
Trenngel-Puffer (1,5 M Tris)	2,5ml	-
ddH ₂ O	2,7ml	6,1ml
10% (w/v) SDS	0,1ml	0,1ml
10 % Amoniumpersulfat (APS)	50µl	50µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5µl	10µl

Alle angegebenen Volumina reichen für 2 Gele.

Die Trenngel-Lösung wurde zwischen die beiden Glasplatten der Gießapparatur gegossen und mit 150µl Isopropanol überschichtet. Dadurch wird eine glatte Geloberfläche erzeugt. Nach dem Aushärten des Gels wurde das Isopropanol mit Wasser abgewaschen und anschließend verbliebene Feuchtigkeit mit Filterpapier entfernt. Die Sammelgellösung wurde auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde das fertige Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und diese bis über die Geloberkante mit Laufpuffer gefüllt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Zellysate 1:3 in DDT-haltigem 3x Ladungspuffer verdünnt und 5min. bei 100°C im Heizblock aufgeköcht. Dadurch wurde eine vollständige Denaturierung der Proteine erreicht. Jede Probenasche wurde mit 15µl beladen. Eine Probenasche wurde mit 10µl NEB-Proteinmarker beladen. Die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 200V.

3.1.15.3 Elektro-Blotting

Bei diesem Verfahren werden die durch das Poloyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen.

Hierzu wurden zunächst die für jedes Gel benötigten Filterpapiere und Schwämme in Transferpuffer eingeweicht. Pro Gel wurde eine Nitrocellulose-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten, mit Methanol beschichtet und ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht. Die Glasplatten der Gelapparatur wurden vorsichtig voneinander gelöst und das Sammelgel vom vollständigen Proteingel abgetrennt. Das Trenngel wurde vorsichtig von der Glasplatte

gelöst und 10min. in Transferpuffer eingeweicht. Anschließend wurde der Blot in der Transferkassette mit folgender Reihenfolge zusammengebaut: 1. Schwamm, 2. Filterpapier, 3. Gel, 4. Membran, 5. Filterpapier, 6. Schwamm. Die Membran wurde dabei luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt und angedrückt. Die fertige Transferkassette wurde in den Blotting-Tank eingesetzt und dieser bis über die Transferkassette mit Transferpuffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 100V bei 4°C.

3.1.15.4 Immundetektion durch Chemilumineszenz

Die auf die Nitrocellulose-Membran transferierten Proteine können nun durch spezifische primäre Antikörper und peroxidasegekoppelte sekundäre Antikörper detektiert werden, indem man die Membran in einer Substrat-Lösung der Peroxidase inkubiert. Die Lichtemission bei Substratumsatz kann auf einem Film detektiert werden.

Die Membran wurde 1 Stunde in 5% MPBST unter Schwenken inkubiert. Dadurch wurden die proteinfreien Oberflächen der Membran durch Milchproteine abgesättigt.

Der primäre Antikörper wurde in 2,5% MPBST verdünnt (Endvolumen 10ml) und die Membran darin über Nacht unter Schwenken bei 4°C, oder 2 Stunden bei RT inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für je 10min. in je 10ml 1xPBST gewaschen, der sekundäre Antikörper in 2,5% MPBST verdünnt (Endvolumen 10ml) und die Membran darin für zwei Stunden unter Schwenken bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Membran erneut für je 10min. in je 10ml 1xPBST und einmal abschließend 5min. in 10ml 1xPBS gewaschen.

Die jeweiligen Verdünnungen für die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 20 zusammengefasst:

Tabelle 20 Verdünnung der Western-Blot Antikörper

Primäre Antikörper (Klon)	Markierung	Verdünnung
Maus - α - eGFP (B2)	Biotin	1:200
Kaninchen α - TrkA (763)	-	1:200
Kaninchen α - HA (Y-11)	-	1:1000
Kaninchen α - TCL1	-	1:1000
Sekundäre Antikörper/ Reagenzien		
Ziege α - Kaninchen	HRPO	1:10000
Streptavidin	HRPO	1:10000

Zur Entwicklung der Chemilumineszenz wurde die Membran mit der Substrat-Lösung der Peroxidase bedeckt (ECL Plus Western Blotting Detection Kit, 2ml Reagenz A + 50 μ l Reagenz B) und 5min. darin inkubiert. Die Substratlösung wurde vorsichtig abgetupft und die Membran in einer Plastikhülle in einer Filmkassette platziert. Im Photolabor wurden unter Rotlicht verschiedene Filme mit unterschiedlichen Expositionszeiten auf die Membran aufgelegt und die Filme unmittelbar nach der Exposition entwickelt.

3.1.15.5 Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen

Das vollständige Entfernen gebundener Antikörper (Stripping) von einer Western Blot Membran ermöglicht ein mehrmaliges Detektieren von Antigenen (Reprobing). Obwohl die Behandlung der Membranen mit dieser Methode zu einer Abnahme des Signals führt, ist die erneute Detektion von spezifischen Antigenen mehrmals möglich. Die Membranen wurden dreimal in 1xPBST gewaschen und anschließend für 45min. bei 50°C in Stripping-Puffer inkubiert. Die Membran wurde fünfmal mit PBST gewaschen und mit Blockierungsreagenzien blockiert. Anschließend konnte eine weitere Antikörperfärbung durchgeführt werden.

Die Western-Blot Analyse zur Expression von Δ TrkA wurde in Kooperation von Dr. J. Meyer (MHH) vorgenommen.

3.2 Zellkulturarbeiten

3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden alle an „Sterilbänken für Zellkulturen“ der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Die Materialien, die für die Arbeiten in der Zellkultur benötigt wurden, wurden entweder durch Autoklavieren (feuchte Hitze) oder durch Behandlung mit Ethanol (70% v/v) sterilisiert, um Kontaminationen vorzubeugen. Verpackungen, Medienflaschen, Plastikmaterialien, usw. wurden außerdem mit Ethanol (70% v/v) vor Gebrauch von außen abgesprüht. Arbeitsflächen in den Sterilbänken wurden ebenfalls vor Arbeitsbeginn mit Ethanol (70%) desinfiziert. Gleiches galt für die Handschuhe, die durch regelmäßiges Einreiben mit 70%igem (v/v) Ethanol desinfiziert wurden. Mit Hilfe von Filtereinheiten (0,45 μ m Porendurchmesser) mit niedriger Proteinbindungskapazität wurden unsterile Lösungen steril filtriert.

3.2.2 Kultivierung von Säugetierzellen

Die Säuger-Zelllinien und primären, isolierten Zellen wurden in begasten (5-7% CO₂) Brutschränken bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90% gehalten.

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mit frischem Medium versorgt. Die genaue Isolierung und Haltung von primären Zellen wird in Abschnitt 3.2.7 erläutert.

Adhärente Zellen (293T und SC1) wurden subkonfluent gehalten, d.h. sobald 70-80% des Flaschenbodens mit Zellen bedeckt waren, wurden die Zellen entweder in mehrere Flaschen verteilt oder in eine größere Kulturflasche überführt.

3.2.2.1 Passagierung adhärenter Zelllinien

Durch das Anheften der adhärennten Zellen an den Flaschenboden musste der Passagierung dieser Zellen eine Trypsinierung vorangehen. Zunächst wurde das verbrauchte Medium entfernt. Der Zellrasen wurde mit sterilem PBS gewaschen, um das Trypsin-blockierende FCS komplett zu entfernen. Danach wurde eine möglichst kleine Menge an (bis der Flaschenboden vollständig bedeckt war) Trypsin-EDTA-Mix zugegeben. Trypsin sorgte dafür, dass die Adhäsionsmoleküle der Zellen vom Boden der Flasche getrennt wurden. Das ebenfalls in der Mix-Lösung enthaltene EDTA, chelatierte Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen, diese Ionen werden für die Adhäsion benötigt, wodurch ein erneutes Anheften der Zellen verhindert wurde. Die Zellkulturflasche wurde ständig im Mikroskop beobachtet, um die schädigende Wirkung von Trypsin zu minimieren. Die Inkubation dauerte ca. 45sec. und durch leichtes Klopfen an die Flasche konnten die Zellen komplett von dieser gelöst werden. Danach wurden die Zellen in frischem Medium verdünnt (je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1:5-1:10) und in neue Kulturflaschen überführt.

3.2.2.2 Analyse einer immortalisierten T-Zell Population

Die Passagierung der immortalisierten Zellen erfolgte alle 2-3 Tage. Die Zellen wurden mit Maus-Medium-Spezial und Zugabe von 100U/ml hIL-2 bei einer Dichte von 5x10⁵ Zellen/ml gehalten. Sie konnten über Monate kultiviert und für verschiedene Analysen genutzt (Integrationsanalyse, FACS-Analyse) werden.

In einem Wettbewerbsversuch mit nicht-transduzierten, aber stimulierten primären T-Lymphozyten wurde eine Mischkultur mit 10% der immortalisierten Population und 90% der nativen Zellpopulation angesetzt. Die Zellen wurden auch hier bei einer Dichte von 5x10⁵

Zellen/ml in einer 24-Loch-Platte gehalten, jeden Tag mit 100U/ml hIL-2 versorgt und am 2, 6 und 8 Tag wurde eine FACS-Analyse hinsichtlich des Wachstumsverhaltens durchgeführt. Die immortalisierte Population konnte durch die Expression von GFP von der Konkurrenzpopulation unterschieden werden.

Eine Ausklonierung der Kultur erfolgte über eine limitierende Verdünnung. Die Klonierungsschritte wurden mittels Verdünnungsverfahren (*limited-dilution-cloning*), mit einer Aussaatwahrscheinlichkeit von 0,25-0,5 Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Platte vorgenommen.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

3.2.3.1 Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit einer Zählkammer durchgeführt. 10 μ l der gut resuspendierten Zellsuspension wurden hierzu mit 10 μ l 1x Trypanblau-Lösung (4x Stocklösung 1:4 in PBS verdünnt) oder Türk'scher Lösung gefärbt. Trypanblau vermag nur in abgestorbene Zellen einzudringen, man zählt bei dieser „Todfärbung“ also nur nicht blaue Zellen und bei der „Lebendfärbung“ mit Türk'scher Lösung verhält es sich genau umgekehrt. Somit wurde der Anteil an vitalen Zellen bestimmt. Dieser Parameter erlaubt eine Beurteilung über den Zustand der Zellkultur. Das Gemisch wurde nun auf die Zählkammer aufgetragen (ca. 10 μ l). Die Zählkammer sah wie folgt aus:

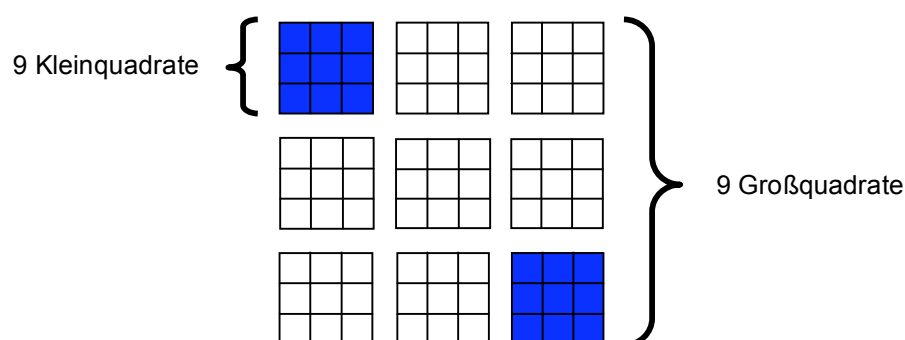


Abbildung 19 Schematische Darstellung der Zellzählkammer

Ermittelt wurde nun jeweils die Zellzahl in den zwei blauen Großquadraten.

Dann wurde der Mittelwert der beiden Ergebnisse gebildet und als „gezählte Zellen“ in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Zellen ml}^{-1} = \text{gezählte Zellen} \times F \times 10^4$$

F steht für den Verdünnungsfaktor der Zellsuspension und wurde wie folgt berechnet:

$$F = 2 = \frac{\text{Zellsuspension } 10\mu\text{l} + \text{Trypanblau- bzw. Türk'sche Lösung } 10\mu\text{l}}{\text{Zellsuspension } 10\mu\text{l}}$$

3.2.3.2 Zellzahlbestimmung mithilfe des Zellzählgeräts

Weiterhin erfolgte das Zählen von Zellen mit dem Zellzählgerät Casy TT. Dazu wurden 10 bis 100 μl der Zellsuspension in 10ml Casytonlösung verdünnt und in einem zelltypabhängigen Programm gemessen. Das Gerät gab die Zellzahl pro ml und die Viabilität der Zellen an.

3.2.4 Anlegen von Kryokulturen

Für die langfristige Lagerung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden frisch trypsinisierte, adhärente Zellen oder Suspensionszellen mit sterilem PBS gewaschen und in einem speziellen Einfriermedium aufgenommen, wobei die Zellzahl auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt wurde. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen (je 1 ml) pipettiert und ü.N. bei -80°C in einer Styropor-Box oder Isopropanol-Einfrierbox (Nunc, Wiesbaden) eingefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff bei -196°C . Dieses schrittweise Verfahren des Einfrierens sollte dafür sorgen, dass die Zellen keinen Gefrierschock erleiden und somit vor einer Lyse bewahrt werden.

Das Einfriermedium setzte sich aus einem hohen Anteil an FCS (90% v/v) und DMSO (Dimethylsulfoxid) (10% v/v) zusammen. Das DMSO diente als Gefrierschutzmittel, indem es den Wassergehalt der Zellen reduzierte. Als kleines, hydrophobes Molekül kann DMSO relativ schnell durch die Plasmamembran diffundieren und verhindert innerhalb der Zelle die Bildung von Eiskristallen und somit die Zerstörung der Zellmembran. Die Membran wurde durch das DMSO permeabilisiert. Die hohe Serumkonzentration war also notwendig, um die intrazelluläre Proteinkonzentration aufrecht zu erhalten.

3.2.5 Auftauen von Kryokulturen

Die Zellen wurden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und unter der Sterilbank aufgetaut. Anschließend wurden sie in ein 15ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10ml für die jeweilige Zelllinie spezifischem Medium gewaschen. Das für die Zellen toxische DMSO wurde somit verdünnt und durch die Zentrifugation (1200rpm, 6min., RT) vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde dann in 4-5ml vorgewärmtes Medium aufgenommen und in eine kleine Kulturflasche (T-75) überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.6 Isolierung und Stimulierung muriner Blut(stamm)zellen

3.2.6.1 Isolierung von primären, murinen MNCs

Murine MNCs (*mononuclear cells*) wurden aus WT-Mäusen (Ly5.1 oder OT-I Mäusen) isoliert. Dazu wurden den Mäusen die Milz, die inguinalen (Leisten-), die mandibulären und 3-5 mesenteriale Lymphknoten entnommen und in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt, das 20ml eiskaltes PBS mit 1% Pen/Strep enthielt. Die Organe wurden mit Hilfe des sterilen Stempels einer Spritze durch ein Metallsieb (Sigma) gedrückt. Das Homogenisat wurde durch ein Zellsieb (BD) in ein neues 50ml Reaktionsgefäß filtriert. Das Sieb wurde zweimal mit je 10ml PBS mit 1% Pen/Strep gewaschen und die Waschlösungen wurden ebenfalls durch das Zellsieb in das 50ml Reaktionsgefäß filtriert. Die Zellen wurden 10min. bei 1400rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50ml Reaktionsgefäß dekantiert und erneut 10min. bei 1400rpm und RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die beiden Sedimente wurden in jeweils 10ml PBS mit 1% Pen/Strep resuspendiert und vereinigt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig mit 10ml Histopaque unterlegt und der Reaktionsansatz für eine Dichtezentrifugation 30min. bei 2000rpm, RT und ohne Bremse zentrifugiert. Es wurden vorsichtig 8-10ml aus der Interphase entnommen, in ein neues 50ml Reaktionsgefäß überführt und 10ml PBS mit 1% Pen/Strep wurden zugegeben. Die Zellsuspension wurde 10min. bei 1400rpm, bei RT zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 10ml PBS mit 1% Pen/Strep resuspendiert, es wurde erneut zentrifugiert (Waschen), der Überstand verworfen und das Sediment endgültig in 10ml PBS mit 1% Pen/Strep resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.2.6.2 Beschichtung von Epoxy-Beads mit mAbs: α -CD3 und α -CD28

Für die Stimulierung von primären, murinen T-Lymphozyten wurden magnetische Partikel (M-450 Epoxy Beads) verwendet, die mit α -CD3- und α -CD28- Antikörpern beschichtet waren. Pro 10^7 magnetische Partikel wurden $1,5\mu\text{g}$ pro Antikörper benötigt. Für 4×10^8 Beads, bei einer Antikörperkonzentration von 1mg/ml also $60\mu\text{l}$. Die Beads wurden gut gemischt (Vortex) und 1ml Beads (4×10^8 Beads) wurden in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Beads wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 1ml PBS aufgenommen. $60\mu\text{l}$ α -CD3-Antikörper (Konzentration 1mg/ml) und $60\mu\text{l}$ α -CD28-Antikörper (Konzentration 1mg/ml) wurden zugegeben, der Reaktionsansatz wurde gemischt und dann für 24 Stunden bei 37°C auf dem Rotator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Beads vom Rotator genommen, in den Magneten (Dynal MPC-1) gestellt und der Überstand wurde verworfen. 1ml $0,1\%$ MSA/PBS wurde zugegeben, der Reaktionsansatz wurde gemischt und 5min. auf dem Rotator bei RT gewaschen und geblockt. Die Beads wurden dann wieder in den Magneten gestellt, der Überstand wurde verworfen und der Wasch-/Block-Schritt wiederholt. Danach wurden die Beads in 1ml $0,1\%$ MSA/PBS aufgenommen und $16\text{-}24$ Stunden bei 4°C auf dem Rotator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Beads vom Rotator genommen, in den Magneten gestellt und der Überstand wurde verworfen. 1ml $0,1\%$ MSA/PBS wurde zugegeben und der Reaktionsansatz wurde gemischt. Die Beads wurden bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Lagerung mindestens bis zu 4 Wochen möglich).

3.2.6.3 Stimulierung von primären, murinen T-Lymphozyten

Für die Stimulierung wurden die α -CD3- und α -CD28- Antikörper beschichteten magnetischen Partikel (Beads) im Verhältnis 3:1 zu den Zellen eingesetzt. Die Stimulierung wurde in 6-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatte wurden $7,215\text{ml}$ Maus-Medium-Spezial, $4,9 \times 10^6$ frisch isolierte, murine MNCs und $1,46 \times 10^7$ α -CD3- und α -CD28-Beads gemischt. Die benötigte Menge an α -CD3- und α -CD28-Beads wurde vorher in ein neues Reaktionsgefäß überführt, einmal mit PBS gewaschen, in Medium aufgenommen und dann zu den Zellen gegeben.

Am nächsten Tag wurde hIL-2 (100U/ml Endkonzentration) zugegeben ($72\mu\text{l}$ pro Vertiefung der 6-Loch-Mikrotiterplatte).

Am vierten Tag wurden die Beads von den Zellen entfernt. Dazu wurde der Ansatz stark resuspendiert, in 15ml Reaktionsgefäße überführt und in den Magneten gestellt. Der

Überstand, der die Zellen enthielt, wurde abgenommen. Die Zellen wurden gezählt und für die Transduktion eingesetzt.

3.2.6.4 Isolierung von murinen Sca1⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark

Murine Stammzellen wurden aus dem Knochenmark von WT Mäusen (Ly5.1) isoliert. Dafür wurden Ober- und Unterschenkelknochen der hinteren Extremitäten verwendet.

Nach dem Töten der Mäuse wurde das Fell mit 70% EtOH desinfiziert und von den Hinterbeinen entfernt. Tibia und Femur wurden durch Entfernen der Muskulatur frei präpariert und in ein 50ml Falcon überführt, welches einen speziellen Knochenmarksisolierungs-Puffer enthielt. Bis zur weiteren Präparation erfolgte eine Lagerung auf Eis.

Für die weitere Präparation wurden drei Petrischalen vorbereitet: 1. 70 % EtOH, 2. PBS und 3. Knochenmarks-Puffer. Tibia und Femur, sowie die verwendeten Scheren und Pinzetten wurden in 70 % EtOH desinfiziert und in PBS gespült. Die frei präparierten Knochen wurden in der Petrischale mit Knochenmarks-Puffer gelagert. Um das Knochenmark aus den Knochen zu isolieren, wurde an jedem Ende des Knochens ein Stück abgeschnitten und das Knochenmark mit einer mit Knochenmarks-Puffer gefüllten Spritze ausgespült. Die Zellen wurden 8min. bei 1400rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 6ml Knochenmarks-Puffer gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann durch ein Zellsieb in ein neues 50ml Reaktionsgefäß filtriert und die Zellen wurden gezählt. Nach dem Zählen wurde erneut zentrifugiert und anschließend wurden die Zellen in Knochenmarks-Puffer auf eine Konzentration von 1×10^8 /ml eingestellt.

Mit der so erhaltenen Zellsuspension wurde eine Positivselektion auf Sca1⁺ Zellen mit magnetischen Partikeln durchgeführt. Dabei wurden Sca1⁺ Zellen angereichert, die noch keiner Differenzierungslinie (weder lymphoid noch myeloid) angehören. Für die Selektion wurde das EasySep Murine SCA1 Selection Kit der Firma StemCell technologies verwendet.

Zu der Zellsuspension (1×10^8 /ml) wurden 10µl muriner FcR Blocker pro ml Zellsuspension zugegeben und es wurde gut gemischt. Anschließend wurden 15µl „Sca1PE Färbereagenz“ pro ml Zellsuspension hinzugegeben, gut gemischt und 15min. bei 4°C inkubiert.

2µl des Reaktionsansatzes wurden in 200µl PBS aufgenommen und für die spätere FACS-Analyse zurückbehalten (Vorher-Probe). Die verbleibende Zellsuspension wurde einmal mit der 10 fachen Menge an Knochenmarks-Puffer gewaschen, in der Hälfte des Ausgangsvolumens aufgenommen (also mit einer Konzentration von 2×10^8 /ml) und in ein steriles FACS-Röhrchen mit Deckel überführt. Es wurden 100µl „EasySep™ PE Selektions-

Cocktail[®] pro ml Zellsuspension zugegeben, gut gemischt und 15min. bei 4°C inkubiert. Danach wurden die „EasySep[™] Magnetic Nanoparticles“ gut gemischt, um sicherzustellen, dass eine einheitliche Suspension vorlag. 50µl dieser Suspension wurden pro ml Zellen zugegeben, es wurde gut gemischt und der Reaktionsansatz wurde für 10min. bei RT inkubiert. Das Volumen der Zellsuspension wurde dann mit Knochenmarks-Puffer auf 2,5ml aufgefüllt und das FACS-Röhrchen mit den Zellen in einen EasySep Magneten gestellt. Nach fünf Minuten wurde der Magnet invertiert, wobei der Überstand verworfen wurde und nur die magnetischen Partikel mit daran gebundenen Sca1⁺ Zellen im Magneten verblieben. Die Zellen wurden wieder in 2,5ml Knochenmarks-Puffer resuspendiert und die Prozedur wurde noch viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen gezählt.

1×10⁵ Zellen wurden als nachher FACS-Probe bei 4°C gelagert. Die übrigen Zellen wurden 8min. bei 1400rpm und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen wurden in Knochenmarks-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in 24-Loch-Mikrotiterplatten im Brutschrank für drei Tage unter Standardbedingungen kultiviert und am vierten Tag für die Transduktion eingesetzt.

Zur Bestimmung der Reinheit wurden die Vorher- und Nachher-FACS-Proben direkt im FACS analysiert, da der PE markierte α-Sca1 Antikörper ja bereits für die Selektion genutzt wurde. Die Menge an gereinigten Sca1⁺ Zellen variierte dem Alter der Tiere entsprechend zwischen 5×10⁵-1×10⁶ Zellen/Tier. Das optimale Alter für die Zellisolierung lag zwischen 6-8 Wochen.

3.2.7 Produktion ecotroper Viruspartikel

3.2.7.1 Transiente Transfektion

Die Produktion der gammaretroviraler Vektorpartikel erfolgte durch eine transiente Transfektion der humanen Nierenepithelzelllinie 293T, die als Helferzelllinie diente. Die Transfektion erfolgte mittels Calciumphosphat-Präzipitation durch das sog. Drei-Plasmid-System.

Die Hilfsplasmide lieferten/komplettierten durch ihre Genprodukte die fehlenden Strukturgene des retroviralen Vektors *in trans*. Replikation (*gagpol*-Gen) und Verpackung (*Eco-Env*-Gen) des Retrovirusgenoms wurden dadurch ermöglicht. Der Transfervektor enthielt das Transgen (hier T-Zell Onkogene oder Kontrollgen GFP), das Verpackungssignal Ψ und LTRs, jedoch keine Information zur Generierung viraler Proteine. Die Verpackungszellen exprimierten nach der Transfektion die Gene und verpackten infektiöse Viruspartikel, die an das Kulturmedium abgegeben wurden. Die so produzierten viralen

Vektorpartikel trugen als einzige genetische Information den Transfervektor, da nur dieser in die Partikel aufgenommen werden konnte. Gewonnene Vektorpartikel waren also auf nur einen Infektionszyklus beschränkt und replikationsinkompetent.

Zur Methode der Calciumphosphat-Präzipitation:

24 Stunden vor der Transfektion wurden $5-6 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 10ml in einer Petrischale (\varnothing 10cm) ausgesät und ü.N. bei 37°C unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Kurz vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Das frische Medium (10ml) enthielt Chloroquin (25 μ M), um die Transfektionseffizienz zu steigern. Die Zellen wurden weiterhin unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Die DNA/CaCl₂-Lösung wurde nun, in ein 1,5ml Reagenzgefäß in folgender Reihenfolge pipettiert:

- Transfervektor: Kontroll-/Onkogen (M387, M476, M477, M691, M692) 7,5 μ g
- *gagpol* Hilfsplasmid (M579) 12,5 μ g
- *Ecoenv* Hilfsplasmid (M187) 1 μ g
- H₂O ad 450 μ l
- 2,5 M CaCl₂ 50 μ l

Das Endvolumen betrug 500 μ l. Der DNA/CaCl₂-Mix wurde nun tropfenweise und unter ständigem Mischen zu 500 μ l 2xHepes Puffer zugegeben. Das Mischen erfolgte durch die Erzeugung von Luftblasen mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette. Damit eine optimale Präzipitation der DNA in den Calciumphosphatkristallen gewährleistet war, wurde eine Inkubation der Mischung von 20min. bei RT vorgenommen.

Als nächstes wurde das DNA-Präzipitat tropfenweise und gleichmäßig auf die 293T Zellen gegeben. Nach 8 Stunden Inkubation unter normalen Zellkulturbedingungen wurde das chloroquinhaltige Medium von den Zellen abgenommen und gegen 6ml frisches DMEM-Medium ersetzt. In Abständen von 12 Stunden wurden nun Zellkulturüberstände entnommen und jeweils durch 6ml frisches Medium ersetzt.

Insgesamt wurden vier Überstände genommen und steril filtriert, um die in das Medium abgegebenen Viruspartikel von abgestorbenen oder abgelösten Zellen zu trennen. Die Virusüberstände wurden entweder für einige Tage bei +4°C aufbewahrt und direkt nach der Titration für eine Transduktion von murinen Blutzellen genutzt oder bei -80°C gelagert.

3.2.7.2 Titration der produzierten Vektorpartikel auf SC1-Zellen

Um die Menge an infektiösen Partikeln in dem produzierten gammaretroviralen Überstand zu bestimmen, wurde die murine, adhärente Zelllinie SC1 transduziert und anschließend die

Menge an transduzierten SC1-Zellen im FACS gemessen. Der Nachweis erfolgte direkt über die GFP-Expression, die von den retroviralen Vektoren ausging.

Für die Titration von ecotropen Überständen wurden einen Tag vor der Titration 5×10^4 Zellen (SC1) in 1ml DMEM- Standardmedium pro Vertiefung einer 24- Loch- Mikrotiterplatte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden pro Vertiefung unterschiedliche Mengen (zwischen 0 und 1000 μ l) an Virusüberstand zugegeben und die Mikrotiterplatten wurden 1 Stunde bei 2000rpm und 31°C zentrifugiert. Das Gesamtvolumen betrug immer 1ml pro Vertiefung.

Nach 2-3 Tagen wurde das Medium entfernt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin von der Platte abgelöst. Sie wurden in 1ml DMEM-Standardmedium resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden sie bezüglich ihrer GFP-Fluoreszenz im FACS analysiert.

Mit folgender Formel konnte aus dem Anteil der transduzierten Zellen der Titer des Überstands berechnet werden:

Titer [infektiöse Einheiten/ml] = (transduzierte Zellen [%]/100) x ausgesäte Zellen x Verdünnungsfaktor

Alle Verdünnungen wurden in Duplikaten angesetzt und für die Titerberechnung wurde der Mittelwert gebildet. Durchschnittlich wurden abhängig vom retroviralen Vektor, Titer von 5×10^5 – 1×10^6 Partikel pro ml erreicht.

3.2.8 Transduktion mit Retronektin beschichteten Platten

Für die Transduktion von T-Lymphozyten oder Stammzellen mit Retronektin wurden unbeschichtete (*non-tissue-culture*) Zellkulturplatten verwendet, entweder 24- oder 6-Loch-Mikrotiterplatten. Pro Vertiefung wurden 400 bzw. 1000 μ l Retronektin (Konzentration 50 μ g/ml) eingesetzt und die Platten wurden 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Retronektin wurde nach der Verwendung im Kühlschrank gelagert und konnte bis zu viermal benutzt werden. Nach dem Entfernen des Retronektins wurden die Platten mit 2% BSA in PBS (400 bzw. 1000 μ l) für 30min. bei RT geblockt, einmal mit HBSS und einmal mit PBS gewaschen.

In jede Vertiefung wurden dann 1 bzw. 3 ml retroviraler Überstand (Kapitel 3.2.8.1) gegeben und die Platten wurden 30min. bei 2400rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann entfernt und zwei weitere Male Überstand zugegeben. Nach dem Zentrifugieren des dritten Überstands wurde dieser wieder verworfen und in eine Vertiefung einer 24-Loch-Mikrotiterplatten $3-5 \times 10^5$ stimulierter, Sca1⁺ Stammzellen in 500 μ l Stammzell-Medium

gegeben bzw. in eine Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatten $3-4 \times 10^6$ stimulierter T-Zellen in 3ml Maus-Medium-Spezial mit hIL-2 (100U/ml). Anschließend wurden die Platten im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert. Der Vorgang wurde am nächsten Tag mit einer neu beschichteten Platte wiederholt. 24 Stunden später wurden die Zellen mit zusätzlichem Medium versorgt oder wie im Fall der Stammzellen transplantiert. Die Transplantation der transduzierten T-Zellen erfolgte dann einen Tag später. Vor der Transplantation erfolgte eine FACS-Analyse hinsichtlich der Transduktionseffizienz und für die T-Zellen noch eine Färbung für CD4 und CD8 positive Zellen. Ein Teil der T-Zell-Transplantate für die Vektoren MP91-GFP, MP91-LMO2 und MP71- Δ TrkA wurde für spätere Analysen kryopräserviert.

Der genaue zeitliche Ablauf der Transplantation und das Transplantationsprinzip werden in Kapitel 4.2 schematisch dargestellt und erläutert.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Tierhaltungsbedingungen

Die Mäuse wurden entsprechend den Richtlinien der FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) gehalten und in der Tierhaltungsanlage des Georg-Speyer-Hauses weiter gezüchtet. Die Haltung der Tiere erfolgte ausschließlich unter Filterdeckel-Käfigen, sowie für immundefiziente Tiere in individuell ventilierten Käfigen (*individually ventilated cage, IVC*). Zur Keimabschirmung der Versuchstiere wurde der Raum mit Überdruck belüftet. Weiterhin wurde der Raum nur nach Anlegen von Schutzkleidung, OP-Gesichtsmaske, Handschuhen und Überschuhen betreten. Die Raumtemperatur betrug konstant 22°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% bis 60%. Der Lichtrhythmus folgte einem wechselnden Hell-Dunkel-Intervall von 12 Stunden. Die Lichtmenge betrug 300 Lux. Die Tiere wurden mit einer Standarddiät der Firma ssniff (Soest) und Leitungswasser versorgt und der allgemeine Gesundheitszustand täglich durch den Experimentator, das Tierpflegepersonal, sowie durch veterinärmedizinische Kontrollen überwacht.

3.3.2 Genotypisierung der Rag-1 defizienten Empfängertiere

Wie bereits in 2.13.1 erwähnt wurden die Maustämme bei der Firma Charles River Laboratories, Jaxmice, erworben und in der Tierhaltungsanlage des Georg-Speyer-Hauses

gezüchtet. Um eine kontrollierte Zucht der Tiere zu gewährleisten, wurde regelmäßig eine Genotypisierung des verwendeten Mausstamms Rag-1^{-/-} durchgeführt.

Die transgenen, Rag-1 K.O. (*knockout*) Mäuse wurden über eine homologe Rekombination einer Neomycin Resistenz-Kassette mit dem Rag-1 Gen generiert [193]. Bei der Amplifikation der jeweiligen Genvarianten erhielt man zwei unterschiedliche Fragmente für beide Genotypen. Das Fragment für das WT Rag-1 Allel betrug demnach 474bp und für die Neomycin-Kassette 530bp. Somit konnte zwischen dem Wildtyp und der K.O. Variante unterschieden werden. Bei Auftreten beider Fragmente konnten sogar heterozygote Tiere identifiziert werden (Abbildung 20).

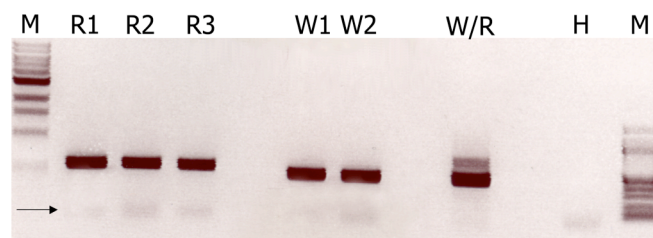


Abbildung 20 Genotypisierung der verwendeten Mausstämme

Agarose-Gel einer Rag-1 Genotypisierung. Die Banden R1-R3 zeigen die gleichen Fragmente mit etwa 530bp Größe für die Neomycin-Kassette. Hierbei handelte es sich also um homologe Rag-1^{-/-} Tiere. Die Banden W1 und W2 stammten von Wildtyp Mäusen und weisen die Rag-1 Wildtyp-Bande bei 474bp auf. Bei der Bande W/R handelte es sich um eine heterozygote Variante, bei welcher beide Fragmente amplifiziert wurden. H, H₂O Kontrolle. M, 1kb und 100bp Marker. → Oligonukleotid-Bande.

3.3.3 Blutentnahme für FACS und Hämogramm

Von den Mäusen wird die Entnahme von bis zu 10% des Blutvolumens in der Regel ohne erkennbare Nebenwirkungen vertragen. Zur Vermeidung von starken Nebenwirkungen darf jedoch nicht mehr als 15% des Blutvolumens entzogen werden.

Den Mäusen wurde Blut entweder aus der Schwanzvene entnommen oder durch Herzpunktion, wenn die Maus geopfert werden sollte.

Bei der Entnahme aus der Schwanzvene wurde die Tiere zunächst in einer Mausfalle fixiert und der Schwanz mit einer Rotlichtlampe erwärmt, es wurde dann mit einem Skalpell in die Schwanzvene geschnitten und das Blut mit EDTA beschichteten Kapillaren (Microvetten) aufgefangen. So wurden 50-100µl Blut entnommen.

Diese wurden nach einer Antikörper-Färbung und Erythrozyten-Lyse für die FACS-Analyse eingesetzt. Weiterhin wurden 5µl für die Erstellung eines Hämogramms genutzt. Hier wurde mit Hilfe des Scil Vet ABC der WBC (*white blood cell count*) bestimmt, um einen Hinweis über den leukämischen Status der Versuchstiere zu erlangen.

Für die Herzpunktion wurde die Maus mit Enfluran betäubt, durch einen Genickbruch getötet und das Herz schnellstmöglich nach Öffnen des Tiers mit einer Kanüle punktiert. Dabei konnte bis zu 1ml Blut gewonnen werden. Als Koagulans wurde Heparin eingesetzt.

Für die Bestimmung des Hämogramms konnte lediglich EDTA als Koagulans eingesetzt werden, deshalb wurde auch bei der Tötung der Tiere immer etwas Blut mit den EDTA beschichteten Microvetten entnommen.

3.3.4 Tötung und Sektion der Tiere

Offensichtlich erkrankte und Spendertiere wurden mit Enfluran narkotisiert und anschließend durch Genickbruch geopfert. Die toten Tiere wurden in Rückenlage fixiert und mit 70% Alkohol desinfiziert. Nach einem Schnitt von caudal nach cranial wurde zunächst das Fell von der Bauchdecke entfernt, ohne diese zu beschädigen. Somit konnten die inguinalen Lymphknoten isoliert werden. Nach Öffnen der Bauchdecke wurden alle makroskopisch sichtbaren Veränderungen der inneren Organe dokumentiert und für die weiteren Untersuchungen folgende Organe entfernt: Milz, Lymphknoten, Thymus (wenn vorhanden), Nieren, Leber, Herz, Lunge, Gehirn und Knochenmark (Tibia und Femur) bzw. die entsprechenden Tumore (Lymphome). Die Organe wurden vor der weiteren Präparation in PBS überführt und auf Eis gelagert.

3.3.5 Aufarbeitung der Organe für FACS und Histologie

Nach der Isolierung der beschriebenen lymphatischen Organe (wie bereits beschrieben), wurden für die FACS-Analyse und das Asservieren Einzelzellsuspension hergestellt.

Bei erkrankten Tieren wurden die lymphatischen Organe Milz, Lymphknoten, Thymus und Knochenmark immer im FACS und histologisch analysiert. Ein Teil des jeweiligen Organs wurde also für die Histologie eingebettet und der andere Teil zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet.

Die einzelnen Proben wurden hierzu in 6-Loch-Platten mit Hilfe eines Spritzenstempels durch einen Maschenfilter homogenisiert und in einem 15ml Falcon gesammelt. Die Zellsuspensionen wurden einmal mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Eine entsprechende Zellmenge wurde dann für die FACS-Analyse eingesetzt und ein anderer Teil der Zellen für weitere Analysen bei -80°C kryopräserviert.

Weiterhin wurden die entsprechenden Organe für die histologische Einbettung in so genannte Histosetten gelegt und in 10% Formal-Fixx fixiert. 24-36 Stunden nach der Fixierung wurden die Organe in 70% Ethanol gelagert.

Histologische Schnitte der fixierten Organe wurden nach der Vorschrift der pathologischen Datenbank RITA [199] vorgenommen und mit Hämatoxylin (HE) und Eosin gefärbt. Dies erfolgte als kommerzieller Service der Firma MFD Diagnostics GmbH (Wendelsheim).

Die histologische Begutachtung erfolgte in Kooperation mit Dr. Silvia Hartmann und Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann aus dem Pathologischen Institut der JWG Universität Frankfurt.

3.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Bei der Durchflusszytometrie werden gleichzeitig verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel gemessen. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander angeordnet und einzeln mittels eines Laserstrahls untersucht. Aufgrund ihrer Streulichteigenschaften können simultan Zellgröße (*forward scatter*, FSC) und Granularität (*sideward scatter*, SSC) für mehrere tausend einzelne Zellen bestimmt werden.

Nach Anfärbung mit einem Fluorochrom oder durch Expression fluoreszierender Proteine (wie z.B. grün fluoreszierendes Protein, GFP) können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Oberflächenproteine können mit einem Primärantikörper erkannt werden, wenn an diesen ein Fluorochrom gekoppelt ist, so kann man direkt die Expression des Oberflächenantigens detektieren. Ist der Primärantikörper ungekoppelt, so wird mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper detektiert. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur vorhandenen Zahl der Moleküle des Fluorochroms oder der Bindungsstellen für den Fluoreszenz-markierten Antikörper. Im Durchflusszytometer passieren die Zellen dann einen Laserstrahl, der die Fluoreszenzmarker anregt. Fluoreszierende und nicht fluoreszierende Zellen lassen sich so unterscheiden und voneinander trennen.

Ein nachgeschalteter Digital-Analogwandler und ein Computer mit der entsprechenden Software, ermöglichen nun eine Aufnahme bzw. Analyse dieser Signale.

In dieser Arbeit wurde für die Analyse der Daten die Software „CellQuest-Pro“ von BD genutzt.

3.4.1 Färbung von Einzelzellsuspensionen

Im FACS wurden die transduzierten Zellen oder Einzelzellsuspensionen aus isolierten Organen und Tumoren analysiert.

Für eine FACS-Färbung wurden 2×10^5 - 1×10^6 Zellen eingesetzt, wobei die verwendeten Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren. Die Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt, 5min. bei 1500rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Färbung in dem Restvolumen vorgenommen. Zu den Zellen wurden 0,5 bis 1 μ g jedes Antikörpers gegeben, der Reaktionsansatz wurde 15min. bei RT im Dunklen inkubiert und die Zellen anschließend dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Für die FACS-Messung wurden diese in 200 μ l FACS-Puffer oder 200 μ l 2%igem Formaldehyd in PBS zur Fixierung aufgenommen.

Bei einer indirekten Färbung (z.B. bei der Färbung für die verschiedenen TCR β -Ketten – mit dem Mouse V β TCR Screening Panel) wurde nach der Inkubation des ersten Antikörpers zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und dann ein sekundärer Antikörper zugegeben, der wiederum 15min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen für die FACS-Messung in 200 μ l FACS-Puffer oder 200 μ l 2%igem Formaldehyd in PBS zur Fixierung aufgenommen. Für die Färbung der Maus-Prä- α -TCR Kette wurde der Vorgang noch mit einem dritten Reagenz wiederholt (1. Maus IgG1 - α - Maus Prä-alpha-TCR, 2. Ratte - α - Maus IgG1-Biotin, 3. Streptavidin-APC).

3.4.2 Färbung von Leukozyten aus Blut

Wenn Leukozyten aus dem Blut angefärbt und im FACS analysiert werden sollten, mussten die Erythrozyten für die Messung lysiert werden. Daher wurden diese mit Hilfe einer Lyse-Lösung und ddH₂O lysiert.

Zu 50 μ l gut gemischtem Blut in einem FACS-Röhrchen wurden 0,5- 1 μ g jedes Antikörpers gegeben. Die Reaktionsansätze wurden gemischt und für 15min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 50 μ l Lyse-Lösung zugegeben, die Proben wurden gemischt und für 10min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Für die Lyse wurden 500 μ l ddH₂O zugegeben, die Reaktionsansätze wurden sofort gemischt und 10min. bei 1500rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde noch zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen wurden schließlich in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Eine Fixierung der Zellen war anschließend nicht mehr nötig, da der Lyse-Puffer bereits Formaldehyd enthielt.

4. Ergebnisse

Nach zunächst erfolgreicher, gentherapeutischer Behandlung von Kindern mit SCID-X1, wurde über einige Fälle von Leukämien bei diesen Patienten berichtet. Dies war auf eine gammaretrovirale Insertionsmutagenese in den transduzierten Blutstammzellen der Patienten zurückzuführen. Für die gammaretrovirale Transduktion reifer T-Zellen sind die Gefahren einer solchen Genotoxizität nicht hinreichend untersucht. Weiterhin ist völlig unklar, ob ausgereifte T-Lymphozyten überhaupt transformierbar sind. Zur Untersuchung dieser Frage, wurden in einer vergleichenden Analyse prominente T-Zell-Onkogene (LMO2, TCL1 und Δ TrkA) über gammaretroviralen Gentransfer in Blutstammzellen (HSC/HPC) bzw. reife T-Lymphozyten eingebracht und deren leukämisches Potential in einem Mausmodell untersucht.

4.1 Klonierung der gammaretroviralen Vektoren

Für die Transduktion der HSC/HPC und reifen T-Lymphozyten wurden zunächst gammaretrovirale Vektoren kloniert, die für die Onkogene LMO2, (LMO2-HA) und TCL1 kodierten. Der Vektor SF91- Δ TrkA wurde freundlicherweise von Dr. Zhixiong Li (MHH) bereitgestellt und bereits bei Meyer et al. [129] beschrieben.

Abbildung 21 zeigt eine schematische Darstellung der klonierten bzw. verwendeten Vektoren.

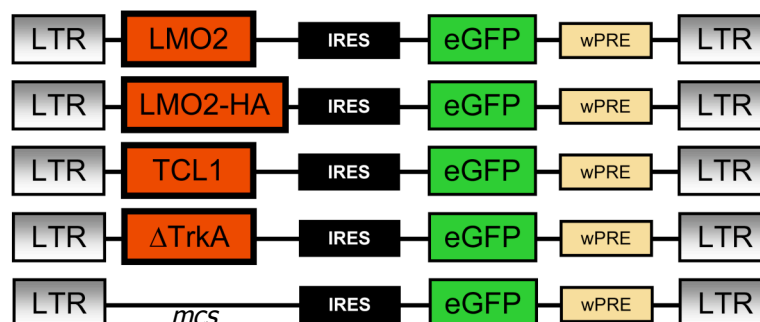


Abbildung 21 Verwendete gammaretrovirale Vektoren

Aufbau der verwendeten gammaretroviralen Vektoren. Ausgangsvektor für die Klonierungen war Vektor MP91-GFP (ganz unten), der eine *mcs*, ein IRES-Element und das grün fluoreszierende Protein GFP aufwies. SF91- Δ TrkA wurde bereitgestellt und musste nicht kloniert werden. Eine HA-markierte Version des LMO2 wurde für die Western-Blot Analyse generiert. Um die Expression der jeweiligen Transgene zu verstärken wurde ein wPRE-Element (*Woodchuck hepatitis virus post-regulatory element*) genutzt.

Als Grundlage, der in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen, diente der gammaretrovirale Vektor MP91-GFP. Nach einer mcs (*multiple cloning site*) und einem IRES-Element (*internal ribosome entry site*) wies dieser Vektor das Gen für das grün fluoreszierende Protein GFP (*green fluorescence protein*) auf, welches als Marker- und Kontrollgen diente.

Die cDNAs des murinen LMO2 und seiner HA-markierten Version (LMO2-HA) wurden freundlicherweise von O. Kustikova (MHH) bereitgestellt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit in MP91-GFP kloniert. Hierzu erfolgte ein Restriktionsverdau der Klonierungsplasmide B-LMO2 und B-LMO2-HA mit den Enzymen NotI und EcoRI. Die isolierten Fragmente wurden über die erwähnten Schnittstellen in MP91-GFP direkt vor das IRES-Element inseriert, um eine bicistronische Expression des jeweiligen Onko- und des Markergens (GFP) zu ermöglichen. Daraus resultierten die Vektoren MP91-LMO2 und MP91-LMO2-HA.

Die cDNA des murinen T-Zell Onkogens TCL1 wurde bei der Firma ImaGenes erworben und an die gleiche Position in MP91-GFP kloniert. Um die cDNA des TCL1 zu isolieren wurde der Klonierungsvektor B-TCL1 mit dem Enzym AvaII geschnitten und anschließend mit dem Klenow-Fragment behandelt, wobei die AvaII-Schnittstellen in glatte „blunt“-Enden umgewandelt wurden. Danach wurde mit NotI geschnitten und das TCL1 Fragment isoliert. MP91-GFP musste vor der Ligation mit diesem Fragment zunächst durch AgeI in der mcs geschnitten werden. Die entstandene Schnittstelle wurde ebenfalls mit Klenow behandelt, um auch hier ein kompatibles, glattes Ende zu erzeugen. Nach der Restriktion mit NotI konnten nun Insert-Fragment (blunt-TCL1-NotI) und retroviraler Vektor zu MP91-TCL1 ligiert werden. Alle fertigen Konstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert und mögliche Mutationen ausgeschlossen.

4.2 Verwendetes Mausmodell: Transplantationsprinzip und zeitlicher Ablauf

Empfängertiere (Rag-1^{-/-}, Ly5.2) wurden entweder mit $1-2 \times 10^7$ T-Zellen (C57BL/6, Ly5.1 bzw. OT-I, Ly5.2) oder $3-5 \times 10^5$ Blutstammzellen (C57BL/6, Ly5.1) pro Tier transplantiert. Die Zellen wurden in etwa 200-300µl PBS intravenös in die Schwanzvene der Rezipienten injiziert. Hierzu mussten die Tiere vorher in einer Mausfalle fixiert und der Schwanz mit einer Rotlichtlampe erwärmt werden, um durch eine Erweiterung der Blutgefäße die Schwanzvene besser sichtbar zu machen. Einen Tag vor der Transplantation mit murinen Stammzellen wurden die adulten Mäuse mit 5Gy durch eine Cäsiumstrahlenquelle bestrahlt. Da T-Zell transplantierte Tiere eine massive Kolitis entwickelten, wurden sie nach 12-16 Wochen geopfert und die Zellen jeweils in sekundäre Rezipienten transplantiert.

In Abbildung 22 sind das Transplantationsprinzip und der zeitliche Ablauf der Experimente aufgezeigt.

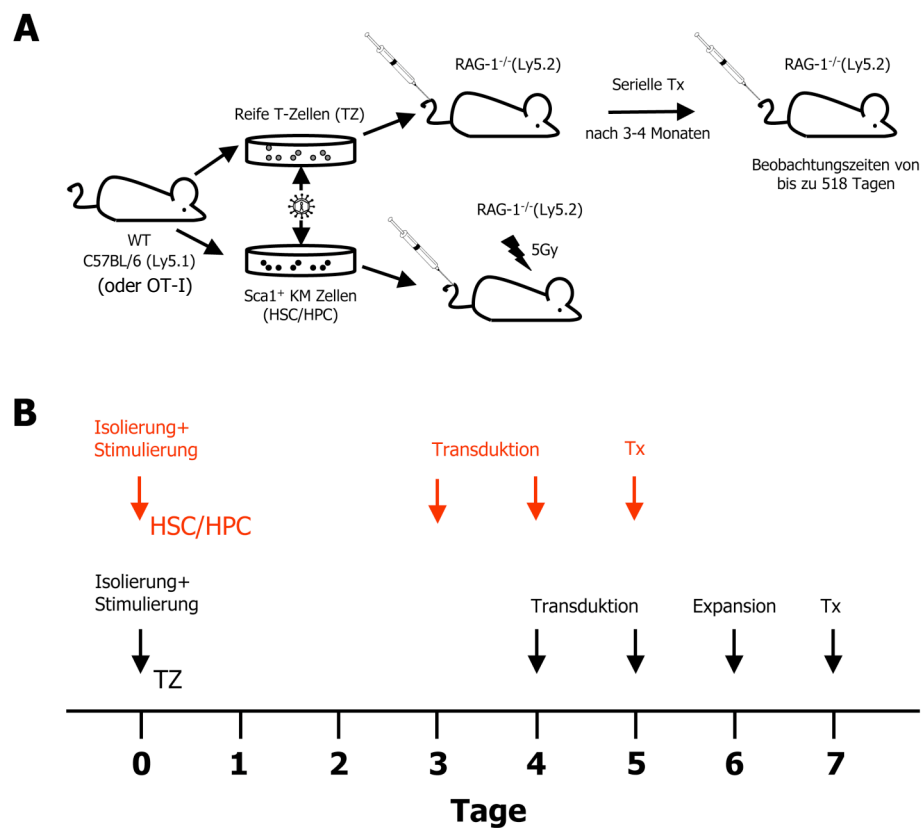


Abbildung 22 Transplantationsprinzip und zeitlicher Ablauf

A. C57BL/6 (Ly5.1 oder OT-I) WT Mäuse wurden als Spender für murine T-Lymphozyten (TZ) und Sca1⁺ HSCs/HPCs genutzt. Isolierte Sca1⁺ HSCs/HPCs wurden 3 Tage und reife T-Zellen 4 Tage stimuliert. Anschließend wurden die Zellen nach retroviraler Transduktion in Rag-1 defiziente Rezipienten transplantiert. Nach 12–16 Wochen entwickelten T-Zell transplantierte Tiere eine massive Kolitis und wurden geopfert. Die T-Zellen aus diesen Tieren wurden isoliert und einige Male seriell in sekundäre Rezipienten transplantiert (immer ein Donor für einen Rezipienten). B. Murine T- Zellen (TZ, ↓) wurden am vierten und fünften Tag nach der Isolierung transduziert. Am 6 Tag wurden die Zellen noch expandiert und am siebten Tag transplantiert. Murine Stammzellen (HSC/HPC, ↓) wurden am dritten und vierten Tag nach der Isolierung transduziert und am fünften Tag transplantiert.

4.3 Limitationen des verwendeten Mausmodells

4.3.1 Strahlungsinduzierte Lymphomentwicklung

Einige der Rag-1 defizienten Empfängertiere (3/54) entwickelten nach γ -Bestrahlung spontan CD4+CD8+ doppelpositive (DP) Lymphome. Die FACS-Analyse ergab, dass es sich bei den leukämischen Zellen um Empfängerzellen handelte (Ly5.2), die einen unreifen T-Zell Phänotyp aufwiesen (CD4+CD8+). Auch in der histologischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung

(HE-Färbung) konnten stark proliferierende Blasten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23C).

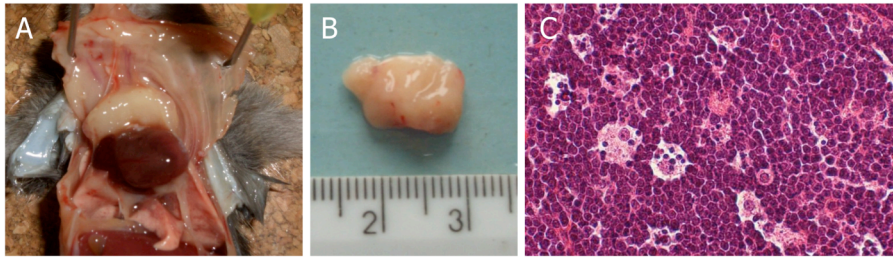


Abbildung 23 Strahlungsinduzierte Entwicklung von unreifen T-Zell Lymphomen

Nach γ -Bestrahlung entwickelte sich bei einigen Empfängertieren ein unreifes T-Zell Lymphom, welches sich durch eine massive Vergrößerung des Thymus präsentierte (A und B). Auch in einer histologischen HE-Färbung konnten verstärkte Blasteninfiltrate in den betroffenen Thymi (C), sowie in anderen Organen beobachtet werden.

Es wurden massive Vergrößerungen der Thymi beobachtet und die betroffenen Tiere mussten zwischen der 18. und 40. Woche nach Bestrahlung getötet werden. Diese Tiere sind nicht in die folgenden Analysen eingegangen.

4.3.2 Massive Kolitis nach T-Zell Transplantation

Nach 12-16 Wochen entwickelten T-Zell transplantierte Tiere (auch die GFP Kontrollgruppe) eine massive Kolitis. Nach einem starken Gewichtsverlust mussten die betroffenen Empfängertiere getötet werden. Geringe Antigenunterschiede zwischen Donor- und Rezipientenstamm waren möglicherweise der Grund für diese Reaktivität, obwohl beide den gleichen genetischen Hintergrund (C57BL/6) aufwiesen. Lymphozyten wurden aus den Milzen und Lymphknoten symptomatischer Tiere isoliert und wie in Abbildung 22 gezeigt jeweils in neue sekundäre Rezipienten transplantiert.

Wenn nötig, wurde dieser Vorgang bis zu viermal wiederholt, um eine effektive Langzeitbeobachtung der Lymphozyten *in vivo* zu gewährleisten. Interessanterweise wurde die Kolitis-Entwicklung durch die serielle Transplantation der Zellen nicht beschleunigt. Dies weist darauf hin, dass über die Zeit bzw. Passagierung autoreaktive Zellen in den transplantierten Empfängern nicht akkumulierten. Weiterhin blieb der Anteil genetisch-modifizierter T-Lymphozyten über den gesamten Zeitraum stabil (siehe Abbildung 32).

4.4 Vergleichbare retrovirale Transduktion und Expression der Onkogene in murinen Stammzellen und reifen T-Zellen bzw. deren unreifen Vorstufen

4.4.1 Transduktionseffizienzen und periphere Repopulierung

Reife T-Lymphozyten wurden mit anti-CD3/-CD28 beschichteten paramagnetische Partikeln für 4 Tage stimuliert und anschließend mit ecotropen Vektorüberständen transduziert. Für hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen (HSC/HPC) wurde zunächst eine Anreicherung von Sca1⁺ exprimierenden HSC/HPC vorgenommen. Diese wurden für 3 Tage mit den murinen Zytokinen mIL-3, mIL-6 und mSCF stimuliert. Nach zwei Transduktionsrunden mit den verschiedenen gammaretroviralen Vektoren (siehe Abbildung 21) wurden die reifen T-Lymphozyten mit bis zu 70% und die HSC/HPC mit bis zu 98% transduziert (Abbildung 24). Die Transduktionseffizienzen waren also für alle Vektoren in beiden Zelltypen vergleichbar hoch.

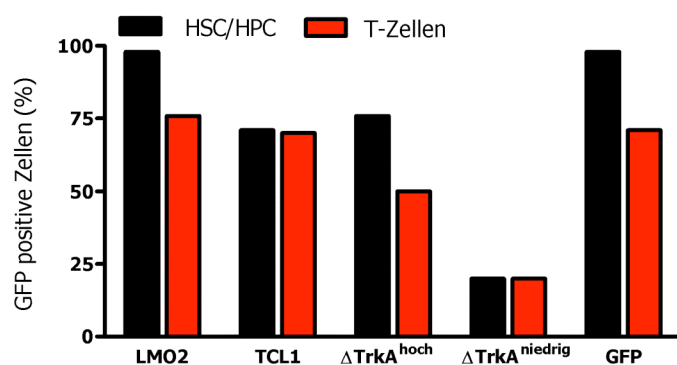


Abbildung 24 Transduktionseffizienz für HSC/HPC und reife T-Zellen

Transduktion der hämatopoetischen Stammzellen (schwarze Balken) und stimulierter, reifer T-Zellen (rote Balken). Für Δ TrkA wurden zwei Transplantate vorbereitet, eine hoch und eine niedrig transduzierte Population.

Für Δ TrkA wurde eine hoch und eine niedrig transduzierte Population angesetzt, da eine hohe Transduktion mit diesem Onkogen zu einem schnellen Erkranken der Rezipienten an einer drastischen, polyklonalen Proliferation myeloischer Zellen führt und die Tiere kaum T-Zell Neoplasien entwickeln. Weiterhin ist von der konstitutiven Form des TrkA bekannt, dass selbst einzelne Vektorkopien in hämatopoetischen Stammzellen für maligne Veränderungen der Hämatopoese sorgen [129]. Die transduzierten T-Zellen und HSC/HPC wurden in Rag-1 defiziente Rezipienten transplantiert (8-12 Tiere pro Vektor, pro Zelltyp) und 6 Wochen nach dem Zelltransfer wurde die Repopulierung der Empfänger mit Donorzellen untersucht. Aus der Schwanzvene transplantiert Tiere wurde Blut entnommen und hinsichtlich des Donormarkers CD45.1, des T-Zell Markers CD3 und des Transgens (GFP) im FACS untersucht. Wie in Abbildung 25 gezeigt, wurden zirkulierende reife Donor-T-Zellen in der Peripherie T-Zell und HSC/HPC transplantiert Tiere nachgewiesen.

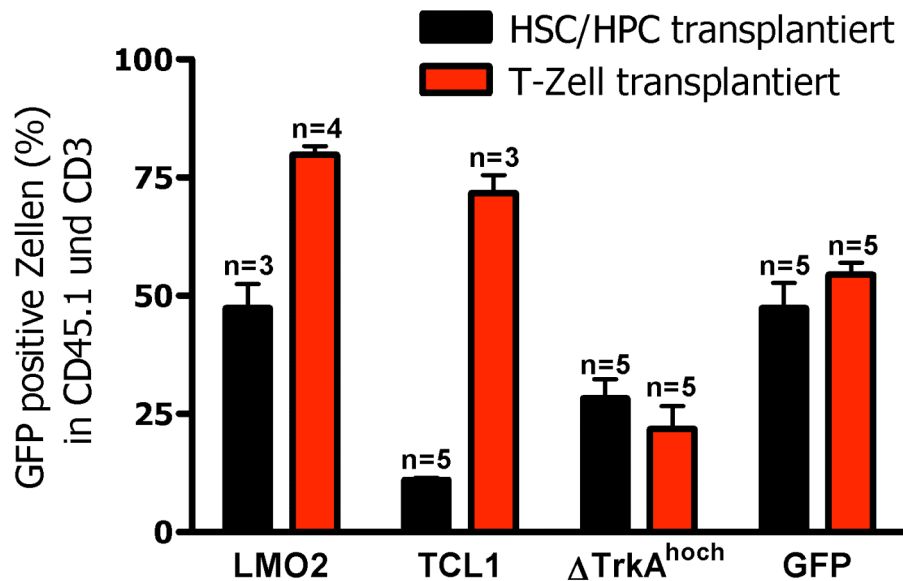


Abbildung 25 GFP-Expression in den peripheren T-Zellen von HSC/HPC und T-Zell transplantierten Empfängertieren

Sechs Wochen nach der Transplantation wurde den HSC/HPC und T-Zell transplantierten Rezipienten Blut entnommen. Gezeigt sind Prozent GFP positiver Zellen in der CD45.1- (Donorzellen) und CD3- (T-Zellen) Population von Tieren, die mit HSC/HPC (schwarze Balken) oder reifen T-Zellen (rote Balken) transplantiert wurden. Der Anteil transferierter, genetisch-modifizierter T-Zellen war zumindest ähnlich, z.T. sogar höher für T-Zell transplantierte Tiere. n=Anzahl der analysierten Rezipienten.

Die GFP-Expression in der durchflusszytometrischen Analyse für alle untersuchten Gruppen zeigte eindeutig eine Repopulierung genetisch-modifizierter Zellen. Die Expression für SF91- Δ TrkA^{hoch} und den Kontrollvektor MP91-GFP (25% bzw 50%) war für T-Zell und HSC/HPC transplantierte Tiere in T-Zellen nach Repopulierung ähnlich, obwohl die Transduktionseffizienzen für die HSC/HPC Transplantate höher gewesen waren (siehe Abbildung 24). Die GFP-Expression für MP91-LMO2 und MP91-TCL1 war für T-Zell repopulierte Tiere höher (70-80%), als für HSC/HPC rekonstituierte Rezipienten (11-55%).

4.4.2 Lymphatische Organe und direkte Onkogenexpression

Sechs Wochen nach der Transplantation wurde ein HSC/HPC transplantiertes Tier der MP91-GFP Kontrollgruppe getötet. Die Repopulierung primärer und sekundärer, lymphatischer Organe der transplantierten Maus (Thymus, Milz, Lymphknoten) wurde im Vergleich zu einer nicht-transplantierten Rag-1^{-/-} bzw. Ly5.1 Wildtyp-Maus untersucht (siehe Abbildung 26).

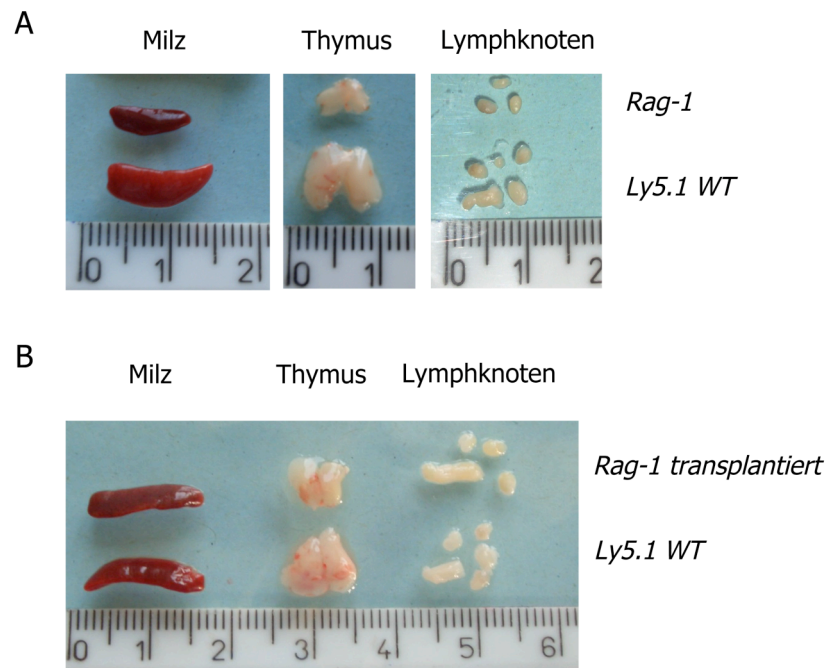


Abbildung 26 Repopulierung der lymphatischen Organe nach HSC/HPC Transplantation

Primäre und sekundäre lymphatische Organe in Rag-1^{-/-} bzw. Ly5.1 Wildtyp Mäusen vor (A) und nach (B) der Transplantation mit HSC/HPC. Die Größe der lymphatischen Organe ist nach der HSC/HPC Transplantation mit dem Wildtyp vergleichbar.

Nach der Transplantation mit HSC/HPC waren die lymphatischen Organe (Thymus, Milz, Lymphknoten) der Rag-1 defizienten Maus mit denen der Ly5.1 Wildtyp Maus vergleichbar. Weiterhin wurde die direkte Expression der Onkogene für einen Teil der HSC/HPC und T-Zell repopulierten Tiere per Western-Blot-Analyse ermittelt (Abbildung 27). Jeweils drei, der mit HSC/HPC oder T-Zellen transplantierten Tiere aus der MP91-LMO2-HA Gruppe, wurden 6 Wochen nach der Transplantation getötet. Isolierte Thymozyten von HSC/HPC transplantierten Tieren, sowie T-Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten T-Zell transplantierten Rezipienten zeigten vergleichbare Expressionsmengen an LMO2-HA (Abbildung 27A). Es wurden für beide Zelltypen die gleichen Mengen an GFP positiven Zellen für die Western-Blot Analyse eingesetzt (GFP Expression wurde durch FACS ermittelt). GFP diente hierbei also als Ladekontrolle und MP91-GFP transduzierte, reife T-Zellen als Negativkontrolle für die LMO2-HA Expression. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis des Western-Blots konnte auch per FACS eine vergleichbare Expressionsintensität in Lymphozyten aus T-Zell transplantierten und Thymozyten aus HSC/HPC transplantierten Tieren (Abbildung 27B) ermittelt werden. Der Histogramm-Blot zeigt eindeutig eine ähnliche GFP-Expressionshöhe für beide Zelltypen.

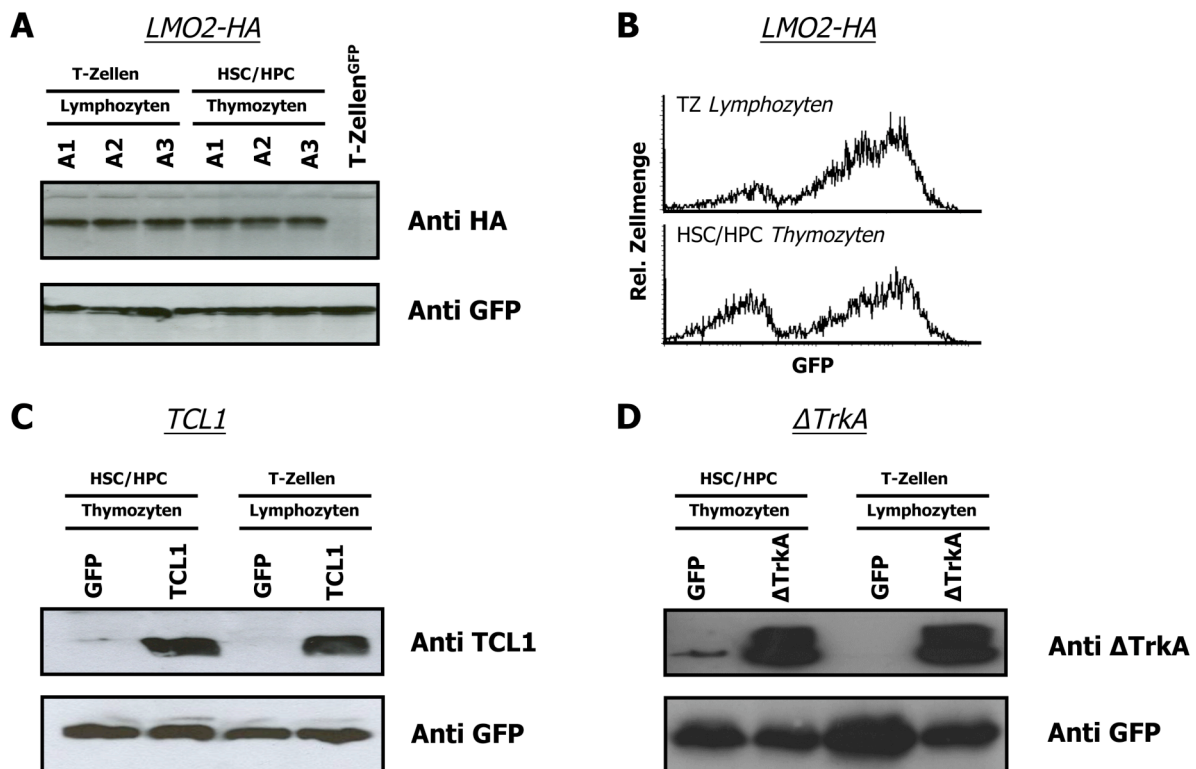


Abbildung 27 Onkogen-Expression in T-Lymphozyten und Thymozyten nach Transplantation mit transduzierten reifen T-Zellen und HSC/HPC

Rezipienten wurden 6 Wochen nach der Transplantation geopfert. Nach Isolierung der Thymozyten (HSC/HPC transplantierte Tiere) bzw. der T-Lymphozyten (T-Zell transplantierte Tiere) wurden diese mittels Western-Blot Analyse hinsichtlich der Expression von LMO2-HA (A,B), TCL1 (C) oder Δ TrkA (D) untersucht. T-Lymphozyten von MP91-GFP transduzierten reifen T-Zellen und Thymozyten von MP91-GFP transduzierten Progenitor-Zellen wurden als Negativkontrollen genutzt. Die GFP-Expression diente als Ladekontrolle, um den Einsatz gleicher Mengen an genetisch-modifizierten Zellen zu demonstrieren. Für MP91-LMO2-HA transduzierte Zellen zeigte die durchflusszytometrische Analyse von Lymphozyten bzw. Thymozyten, HSC/HPC und T-Zell transplantierte Tiere eine vergleichbare Expressionsintensität (B). A1-3 in (A) weist auf die Anzahl der geopferten Tiere hin.

In einem analogen Versuchsaufbau wurde außerdem die Expression von TCL1 und Δ TrkA in Thymozyten und Lymphozyten nach HSC/HPC oder T-Zell Transplantation analysiert (Abbildung 27C,D). Wieder wurden MP91-GFP transduzierte Zellen als Negativkontrolle genutzt. Thymozyten und T-Lymphozyten zeigten relativ zu GFP auch hier eine sehr ähnliche Expression für das jeweilige Onkogen (TCL1 oder Δ TrkA). GFP diente wieder als Kontrolle für die gleiche Beladung.

4.5 Onkogene transformieren primäre, murine Blutstammzellen nach retroviraler Transduktion

Nach der Transplantation von Onkogen-transduzierten HSC/HPC, entwickelten sich nach charakteristischen Latenzperioden bei allen Empfängertieren maligne Veränderungen der Hämatopoese (Abbildung 28).

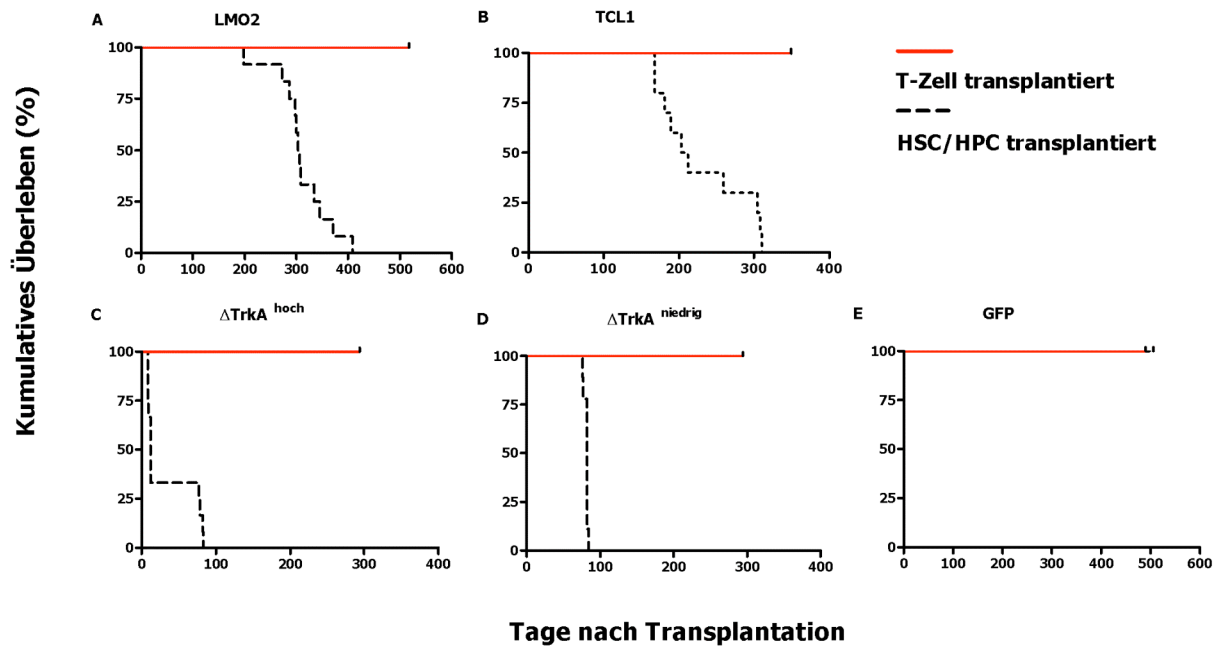


Abbildung 28 Überleben von T-Zell und HSC/HPC transplantierten Tieren

Rezipienten, die mit LMO2 (A), TCL1 (B), $\Delta TrkA^{hoch}$ (C) oder $\Delta TrkA^{niedrig}$ (D) transduzierten HSC/HPC transplantiert wurden, entwickelten maligne Veränderungen der Hämatopoese (gestrichelte, schwarze Linie, A-D). Kontrolltiere aus der MP91-GFP Gruppe und T-Zell transplantierte Tiere überlebten über einen sehr langen Beobachtungszeitraum (rote Linie A-E), ohne Anzeichen für Leukämien oder Lymphome.

HSC/HPC transplantierte Tiere der LMO2 Gruppe entwickelten nach 198-408 Tagen T-Zell lymphatische Leukämien (T-ALL). Hauptsächlich ein unreifer CD4+CD8+ (DP) Phänotyp wurde beobachtet. Folgende Organe waren in den erkrankten Tieren stark vergrößert: Thymus (bis zu 0,8g, Kontrolle Ly5.1 0,02g, siehe Abbildung 29 und Tabelle im Anhang), Milz (bis zu 0,6g, Kontrolle Ly5.1 0,09g, siehe Tabelle im Anhang) und in einigen Fällen auch die Lymphknoten (Lymphome aus mesenterischen, inguinalen und mandibulären Lymphknoten bis zu 1,3g, Kontrolle Ly5.1 0,05g, siehe Tabelle im Anhang). Die meisten für ein Hämogramm untersuchten Tiere (7 von 8 analysierten Tiere) wiesen einen erhöhten, leukämischen Wert für die weißen Blutzellen auf (WBC) auf (bis zu 200×10^3 Zellen/ μ l, Kontrolle Ly5.1 15×10^3 Zellen/ μ l, siehe Tabelle 21 und Tabelle im Anhang). Für einige der Tiere konnte kein Blutbild ermittelt werden, da diese vor der Analyse verstorben waren.

Die Kohorte der MP91-TCL1 Stammzell-transplantierten Tiere zeigte ein breiteres Spektrum an malignen Phänotypen. Leukämien/Lymphome entwickelten sich in dieser Gruppe 168-310 Tage nach der Transplantation (siehe Tabelle Anhang). Drei von neun Tieren entwickelten Leukämien/Lymphome mit einfach positivem (EP), reifzelligem Phänotyp (zwei waren CD4+ und eine war CD8+). Zwei von neun zeigten einen unreifen DP Phänotyp und die restlichen Rezipienten (4/9) entwickelten zu späteren Zeitpunkten (259-310 Tage nach Transplantation) CD19+ B-Zell-Tumore (B-ALL, siehe Tabelle 21 und Tabelle im Anhang). TCL1-induzierte Leukämien/Lymphome waren durch eine extreme Vergrößerung der Lymphknoten (bis zu 3,4g, siehe Abbildung 29 und Tabelle im Anhang), des Thymus und der Milz charakterisiert. Eines der transplantierten Tiere (TCL1_A3) präsentierte einen unklaren, nicht zu definierenden Phänotyp. Symptomatisch zeigte das Tier massive subkutane Infiltrate und eine starke Vergrößerung der Leber (4g, Leber einer WT Ly5.1 Kontrolle im Vergleich nur 1g, siehe Tabelle im Anhang). Leider konnte auch nach FACS-Analyse (für die Marker CD45.1, CD3, TCR β , CD8, CD4, CD19, CD11b) kein eindeutiger Phänotyp für das subkutane Infiltrat bestimmt werden und weiterhin wurde nur eine sehr schwache GFP Expression beobachtet. Auch in den TCL1 induzierten Leukämien/Lymphomen zeigten die meisten der analysierten Tiere (5/7) einen leukämischen WBC mit bis zu 96×10^3 Zellen/ μ l (siehe Tabelle im Anhang).

Mehr als die Hälfte der Mäuse (5/9), die mit SF91- Δ TrkA^{hoch} transduzierten HSC/HPC transplantiert wurden, entwickelten eine maligne, myeloische Proliferation, die von Meyer et al. als „transiente Leukämie“ (TL) bezeichnet wurde [129]. Diese zeichnete sich durch eine extrem kurze Latenz (<12 Tage) und die massive Proliferation CD11b+, myeloischer Vorläufer aus (siehe Abbildung 29, Tabelle 21 und Tabelle im Anhang). An der TL erkrankte Tiere zeigten eine extreme Vergrößerung der Milz (bis zu 4,8g, siehe Abbildung 29 und Tabelle im Anhang). Wie bereits bei Meyer et al. [129] beschrieben, entwickelten alle Tiere, die diese myeloproliferative Phase überlebten (4/9), T-Zell lymphoblastische Leukämien (T-ALL) mit einem unreifen, CD4+CD8+ DP Phänotyp. Diese wiesen mit bis zu 0,9g extreme Vergrößerungen des Thymus auf (siehe Abbildung 29, Tabelle 21 und Tabelle im Anhang).

Bemerkenswerterweise konnte in der Δ TrkA^{niedrig} Gruppe, mit einer Latenz von 76-85 Tagen nur der unreife, DP T-ALL Phänotyp beobachtet werden (9/9), ohne ein Auftreten der beschriebenen TL (siehe Tabelle 21 und Tabelle im Anhang).

In Tabelle 21 sind die Phänotypen der beobachteten Leukämien/Lymphome und WBC-Werte der Tiere für alle Onkogene dargestellt. Die genauen ausführlichen Tabellen zu allen beobachteten Leukämien/Lymphomen können dem Anhang entnommen werden.

Tabelle 21 Phänotypen der HSC/HPC induzierten Tumore und WBC der Tiere

Onkogen	DP	DN	EP	CD19	CD11b	WBC > 15.000/ μl
LMO2 (n=12)	10/12	1/12	1/12	0/12	0/12	7/8
TCL1 (n=10)	2/9	0/9	3/9	4/9	0/9	5/7
Δ TrkA ^{hoch} (n=12)	4/9	0/9	0/9	0/9	5/9	2/2
Δ TrkA ^{niedrig} (n=9)	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9	6/7

DP=doppelpositiv, DN=doppelnegativ, EP=einfach positiv für die T-Zell-Marker CD4 und CD8. n=Anzahl der Tiere pro Onkogen. Bei einigen Tieren konnte der Phänotyp oder WBC nicht ermittelt werden.

Maligne Veränderungen, wie stark vergrößerte Organe (Lymphome) wurden bei der Sektion dokumentiert und einige Beispiele sind in Abbildung 29A,D,G aufgezeigt.

Neben der makroskopischen Untersuchung der erkrankten Tiere, wurde für die Onkogen induzierten Tumore aller Gruppen eine histopathologische Untersuchung durchgeführt. Diese zeigte massive Blasteninfiltrate, in allen untersuchten Organen, der betroffenen Tiere. Untersucht wurden hierbei folgende Organe: Leber, Lunge, Herz, Nieren, Milz, Gehirn, Lymphknoten, Knochenmark und Thymus. Eine Auswahl histologischer Krankheitsbilder für alle drei Onkogene ist in Abbildung 29 zusammengefasst.

Charakteristisch für die Leukämien/Lymphome waren nicht nur die bereits erwähnten Blasteninfiltrate und Lymphome, sondern in einigen Fällen auch das Auftreten einer extramedullären Hämatopoese der Milz (Abbildung 29H), welche besonders bei myeloproliferativen Erkrankungen auftritt.

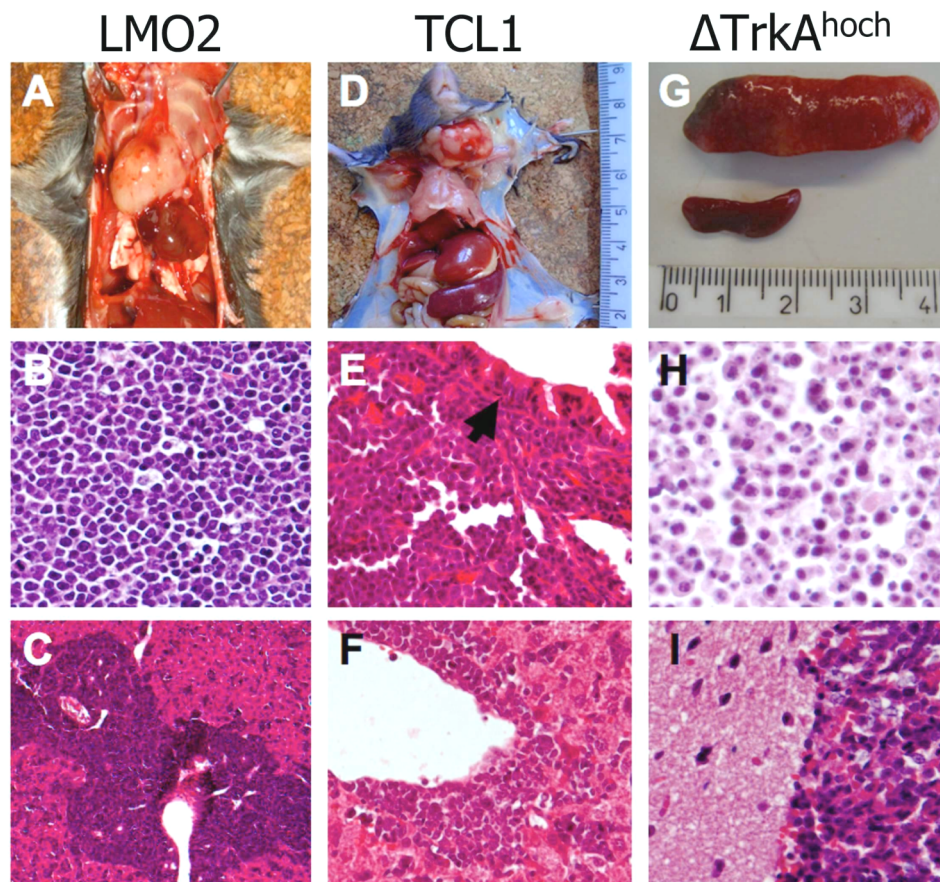


Abbildung 29 Histopathologie HSC/HPC induzierter Leukämien/Lymphome

(A) Autopsie von Tier LMO2_2. Es ist ein massiv vergrößerter Thymus zu sehen, der das komplette, obere Mediastinum ausfüllt. **(B)** Thymus von Tier LMO2_2 mit mittelgroßen Lymphoblasteninfiltraten. Makrophagen sind vermischt und zeigen ein sternförmiges Muster. **(C)** (LMO2_6_Leber) Lymphoblastische Infiltrate in den portalen Trakten und dem angrenzenden Leber- Parenchym. **(D)** Autopsie von Tier TCL1_1, welche eine Vergrößerung der lymphoretikularen Organe zeigt (Lymphknoten, Leber und Milz). **(E)** TCL1_1: mittelgroße Lymphoblasten, die das bronchiale Epithel unterlaufen (Pfeil). **(F)** (TCL1_7_Leber) Lymphoblastisches Infiltrat in einer zentralen Vene, das sich zum Leber-Parenchym erstreckt. **(G)** Massiv vergrößerte Milz von Tier $\Delta\text{TrkA}^{\text{hoch}}_5$, im Vergleich zu der Milz eines gesunden Kontrolltiers (darunter). **(H)** Milz von $\Delta\text{TrkA}^{\text{hoch}}_5$ mit extramedullärer Hämatopoese. **(I)** ($\Delta\text{TrkA}^{\text{hoch}}_{10}$ _Gehirn) Subarachnoidale lymphoblastische Infiltrate.

4.6 Integrationsanalyse der gammaretroviral induzierten Leukämien/Lymphome

Mit Hilfe der LM-PCR wurden die gammaretroviralen Integrationen bei allen HSC/HPC induzierten Tumoren charakterisiert. Die Integrationsprofile waren oligo- bis monoklonal (Abbildung 30).

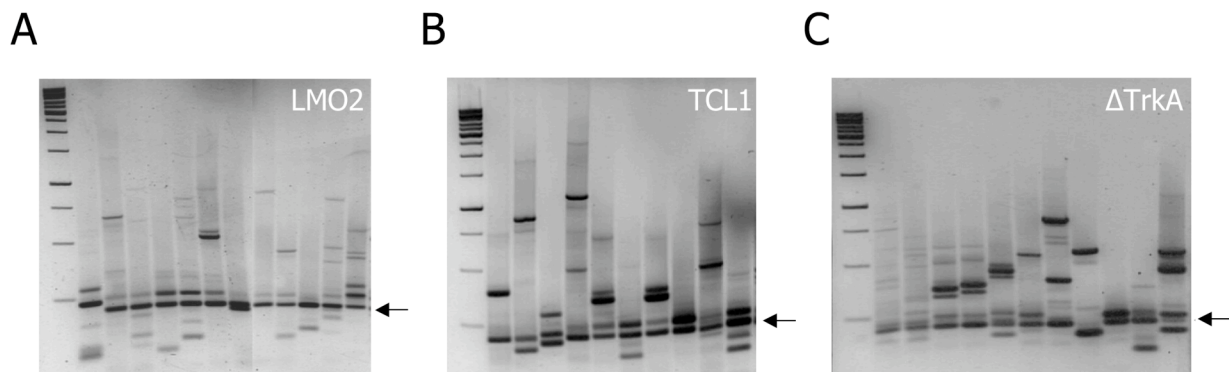


Abbildung 30 LM-PCR Analyse der HSC/HPC induzierten Tumore

Ligationsvermittelte PCR Analyse der HSC/HPC induzierten Tumore nach der Transduktion mit MP91-LMO2 (A), MP91-TCL1 (B) und SF91- Δ TrkA^{niedrig} (C). Die Tumore der Tiere Δ TrkA^{hoch}₃ und Δ TrkA^{hoch}₄ (C, Spur 2+3) waren aus der Gruppe mit Δ TrkA hoch transduzierten Zellen und wurden als Kontrolle für ein polyklonales Profil verwendet. In Spur 1 ist jeweils der DNA-Marker aufgetragen (A-C). ← Interne Kontrollbande für gammaretroviralen Vektor.

Die Tiere 3 und 4 aus der Δ TrkA^{hoch}-Gruppe (Abbildung 30C, Spur 2+3) zeigten ein hoch polyklonales Bandenmuster, welches bereits als typisch für den Phänotyp der transienten Leukämie beschrieben wurde [129]. Im Gegensatz dazu zeigten Leukämien/Lymphome mit einer längeren Latenz ein eher monoklonales Profil (Abbildung 30C, Spur 4-12). Als nächstes wurden die gammaretroviralen Integrationen hinsichtlich angrenzender Genombereiche untersucht. Hierzu wurden die nach LM-PCR ermittelten Sequenzen mit dem gesamten Mausgenom abgeglichen, um flankierende Genomregionen zu identifizieren. Für Δ TrkA wurden nur die Tumore der niedrig transduzierten Gruppe analysiert, da hier die Wahrscheinlichkeit kooperierende Integrationsereignisse aufzudecken höher war. Untersucht wurden die zu den Vektorintegrationen am nächsten und innerhalb 100kb (stromauf- oder abwärts) Entfernung gelegenen Gene. Gene in diesem Analysefenster wurden bezüglich ihres Vorkommens in den Datenbanken RTCGD und PANTHERDB analysiert (Tabellen 22 und 23). Die PANTHERDB gibt die biologischen Funktionen der betroffenen Gene wieder und klassifiziert diese in verschiedene Kategorien biologischer Prozesse und Signalwege.

Eine Über- bzw. Unterrepräsentierung der Gene in biologischen Prozessen und PANTHERDB-

Signalwegen wurde durch den Vergleich mit einem Referenzdatensatz des gesamten Mausgenoms (NCBI36) ermittelt (Tabelle 22). Die bioinformatische Analyse erfolgte in einem binomialen Test und wurde von M. Brugman (MHH) durchgeführt.

Eine genaue Liste aller identifizierten Gene kann dem Anhang entnommen werden.

Tabelle 22 PANTHERDB Klassifikation der HSC/HPC induzierten Tumore

Entfernung zur Integration →	NCBI36 (n=29917)	LMO2 (18 Integrationen)		TCL1 (10 Integrationen)		Δ TrkA ^{niedrig} (14 Integrationen)	
		100kb (n=44)	AN (n=14)	100kb (n=28)	AN (n=8)	100kb (n=66)	AN (n=12)
PANTHERDB Signalwege							
Alzheimer Krankheit -amyloide Sekretase Signalweg	73 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (6,1)	2 (17)
VEGF Signalweg	79 (0,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4,5)	2 (17)
JAK/STAT Signalweg	23 (0,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (3)	2 (17)
B-Zell Aktivierung	96 (0,3)	0 (0)	0 (0)	1 (3,6)	0 (0)	3 (4,5)	2 (17)
Interferon-gamma Signalweg	33 (0,11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (3)	1 (8,5)
FGF Signalweg	143 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4,5)	2 (17)
EGF Rezeptor Signalweg	153 (0,5)	0 (0)	0 (0)	1 (3,6)	0 (0)	3 (4,5)	2 (17)
TGF-beta Signalweg	154 (0,5)	3 (6,8)	2 (14,3)	1 (3,6)	0 (0)	3 (4,5)	1 (8,5)
Angiogenese	258 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4,5)	2 (17)
PANTHERDB Biologische Prozesse							
Intrazelluläre Signalkaskade	909 (3)	2 (4,5)	2 (14,3)	0 (0)	0 (0)	7 (11)	3 (25)
Proteinphosphorylierung	750 (2,5)	2 (4,5)	0 (0)	1 (3,6)	0 (0)	6 (9)	3 (25)
Nukleosid, Nukleotid und Nuklein- säure Metabolismus	3851 (13)	12 (27)	5 (36)	5 (18)	3 (38)	5 (8)	1 (8,5)
Signaltransduktion	4469 (15)	12 (27)	5 (36)	4 (14)	0 (0)	13 (20)	4 (33,3)
Rezeptorprotein Serin/Threonin Kinase Signalweg	39 (0,1)	1 (2,3)	2 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ligandvermittelte Signalwege	394 (1,3)	2 (4,5)	3 (21)	0 (0)	0 (0)	2 (3)	0 (0)
Onkogenese	468 (1,6)	2 (4,5)	2 (14,3)	0 (0)	0 (0)	1 (1,5)	0 (0)
Entwicklungsprozesse	2385 (8)	4 (9,1)	4 (29)	4 (14)	3 (38)	3 (4,5)	2 (17)
Zellproliferation und Differenzierung	1004 (3,4)	3 (6,8)	1 (7,1)	4 (14)	2 (25)	3 (4,5)	1 (8,5)
Muskelkontraktion	204 (0,7)	0 (0)	0 (0)	2 (7,1)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)
Zellzyklus	1005 (3,4)	2 (4,5)	0 (0)	2 (7,1)	2 (25)	4 (6,1)	1 (8,5)
Biologischer Prozess, nicht klassifiziert	12491 (42)	11 (25)	3 (21,4)	8 (29)	1 (12,5)	27 (41)	4 (33,3)

n=Anzahl aller flankierender Gene oder der Gene des NCBI36 Referenz-Datensatzes (Gesamtes Mausgenom). AN=am nächsten gelegene Gene. In Klammern ist der prozentuale Anteil (%) der Gene im jeweiligen Datensatz angegeben. Dem Referenzdatensatz (NCBI36) kann hierbei der zu erwartende Prozentsatz für jede Genklasse entnommen werden.

Interessanterweise traten in dem Datensatz aus der Δ TrkA^{niedrig}-Gruppe zwei integrationsflankierende Gene auf, Prkcq und Mapk11 (siehe Anhang und Tabelle 22), die in einigen verschiedenen Signalwegen wieder zu finden waren. Die Datensätze von LMO2 und TCL1 wiesen derartige Gene nicht auf.

Bei allen Onkogen-Gruppen lagen jedoch überrepräsentiert flankierende Gene vor, die in den biologischen Prozess der Signaltransduktion involviert sind. Nur wenige Onkogene und Tumorsuppressorgene waren in der Nähe der gammaretroviralen Integrationen lokalisiert. Als nächstes wurden die Gene des 100kb flankierenden Bereichs mit den Genen der RTCGD verglichen. Eine erstaunlich große Anzahl von Integrationen wies zumindest ein RTCGD Gen in diesem Analysefenster auf (Tabelle 23). In mehr als der Hälfte, der analysierten Insertionsstellen konnten Gene identifiziert werden, die mindestens einmal als Treffer in RTCGD aufgelistet sind. Die Anzahl, der als CIS geltenden Gene war hingegen jedoch eher gering (7-22%).

Tabelle 23 RTCGD Treffer in HSC/HPC induzierten Tumoren

Onkogen	Tumore analysiert	RTCGD^{alle} (nicht mehr als ein Treffer)[†]	RTCGD^{CIS} (zumindest zwei Treffer)^{††}
LMO2 (n=18 ₄₄ Gene)	10	14/18	4/18
TCL1 (n=10 ₂₈ Gene)	9	6/10	2/10
Δ TrkA ^{low} (n=14 ₆₆ Gene)	8	10/14	1/14

RTCGD Treffer in einem 100kb Analysefenster. n=Anzahl der analysierten Integrationsstellen/Anzahl der flankierenden Gene.[†]Treffer in allen RTCGD aufgelisteten Genen.^{††}Gene, die zumindest mit zwei Treffern in der RTCGD aufgelistet sind, diese werden als CIS (*common integration site*) bezeichnet.

4.7 Rolle der Rag-1 induzierten TCR-Rekombination bei der Leukämieentwicklung im vorliegenden Versuchsaufbau

Durch die Rekombinase-Aktivität während der TCR-Rekombination können chromosomale Translokationen induziert werden, welche die Entwicklung unreifzelliger T-Zell Leukämien begünstigen. Diese Bedingungen stellen natürlich einen grundlegenden Unterschied zwischen den miteinander verglichenen Zelltypen dar. In reifen T-Zellen ist dieser Vorgang der Maturierung bereits abgeschlossen und dadurch die Gefahr einer rekombinationsbedingten, chromosomalen Translokation nicht mehr gegeben.

Um diesen Faktor bei den induzierten Leukämien/Lymphomen auszuschließen, wurden LMO2 transduzierte, Rag-1 defiziente HSC/HPC transplantiert. Diese Rag-1^{-/-} HSC/HPC zeigten eine zu Wildtyp-Zellen vergleichbare Transformierbarkeit (Abbildung 31).

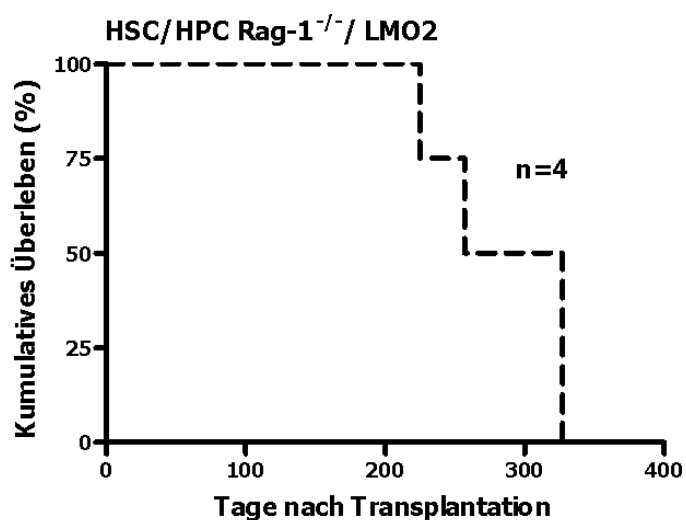


Abbildung 31 Überleben von Tieren nach Transplantation mit MP91-LMO2 transduzierten Rag-1^{-/-} HSC/HPC

Vier Tiere wurden mit MP91-LMO2 transduzierten Rag-1 defizienten HSC/HPC transplantiert. Die Leukämieentwicklung war vergleichbar mit der von transduzierten Wildtyp-Zellen (Abbildung 28). Die TCR Rekombination schien, zumindest im vorliegenden Versuchsaufbau, also keine wesentliche Rolle für die Tumorentwicklung zu spielen. n=Anzahl der Tiere.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Rag-1-Aktivität für die Transformation der Thymozyten in dem vorliegenden Versuchsaufbau keine wesentliche Rolle spielte.

4.8 Polyklonale, reife T-Zell Populationen können nicht durch retrovirale Transduktion mit Onkogenen transformiert werden

Kontrollvektor transduzierte HSC/HPC (MP91-GFP) verursachten keinerlei maligne Veränderungen und auch keines der T-Zell transplantierten Tiere entwickelte über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 518 Tagen ein/e Lymphom/Leukämie (siehe Abbildung 28). Reife T-Zellen zeigten eine stabile, hohe GFP-Expression (Abbildung 32). Sie lösten nach der Transplantation eine massive Kolitis aus und mussten deshalb alle 12-16 Wochen seriell transplantiert werden. Somit konnten die genetisch-modifizierten T-Zellen beträchtlich lange *in vivo* verfolgt werden, ohne einen Verlust der Transgenexpression aufzuweisen.

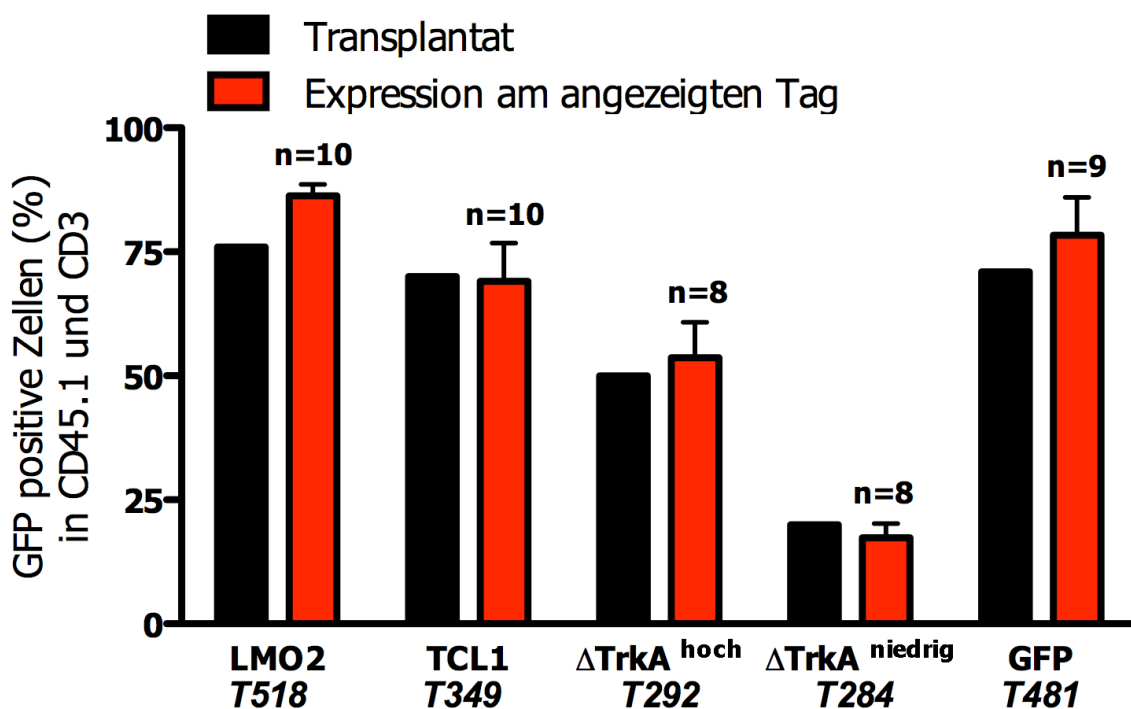


Abbildung 32 GFP-Expression in den Lymphknoten T-Zell transplantierte Tiere

Nach einer langen *in vivo* Beobachtungszeit der genetisch-modifizierten T-Zellen wurden T-Zell transplantierte Tiere geopfert. Die GFP-Expression (der CD45.1 und CD3 positiven) in den Lymphknoten getöteter Tiere (rote Balken), wurde mit dem jeweiligen Transplantat (schwarze Balken) verglichen. T=Tage nach Transplantation. n=Anzahl der analysierten/transplantierten Tiere. Es konnte eine stabile, hohe GFP-Expression für alle Vektorgruppen beobachtet werden.

In der Endanalyse wurden die Lymphknoten aus repopulierten Tieren isoliert und anschließend Einzelzellsuspensionen hinsichtlich des Spendermarkers CD45.1, des T-Zell-Markers CD3 und des Markergens GFP durchflusszytometrisch analysiert. Selbst nach extensiver Beobachtungszeit blieb die GFP-Expression in den repopulierten Tieren für alle Vektoren stabil und mit dem ursprünglichen Transplantat vergleichbar.

Alle Tiere wurden sorgfältig bezüglich einer Leukämie-Erkrankung untersucht. Milz oder Lymphknoten waren zu keinem Zeitpunkt vergrößert und es bestanden keine Anzeichen einer Leukämie.

Nach der LM-PCR Analyse zeigte sich für alle T-Zell transplantierten Gruppen ein oligo- bis polyklonales Integrationsprofil (Abbildung 33). Untersucht wurden jeweils 5 Tiere für jeden Vektor und mit dem Transplantat verglichen (außer bei MP91-TCL1). Auch über einen langen Beobachtungszeitraum, sowie nach seriellen Transplantationen konnte keine klonale, maligne Entwicklung der polyklonalen, reifen T-Zellen *in vivo* induziert werden.

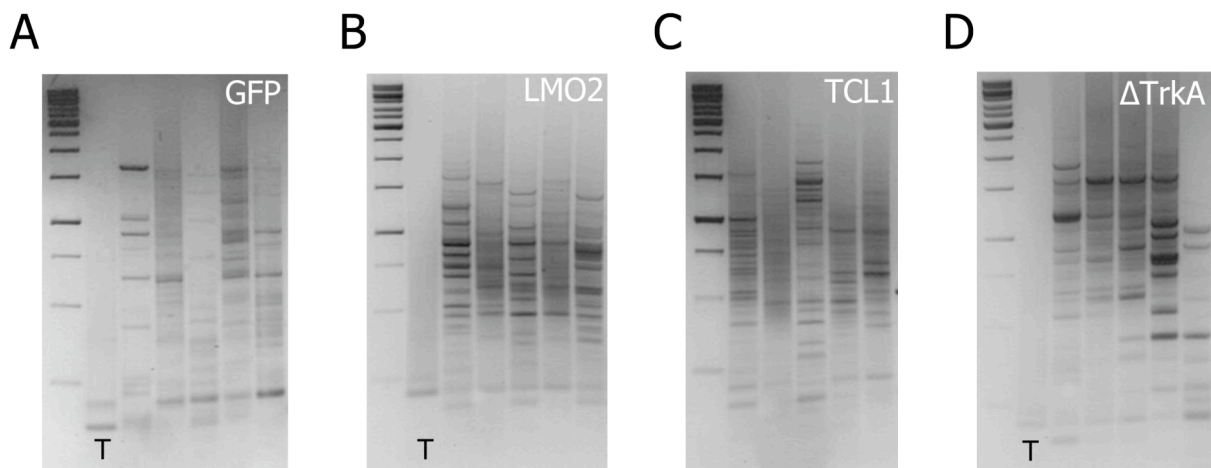


Abbildung 33 LM-PCR Analyse der T-Zell transplantierten Tiere

Isolierte, T-Zellen wurden nach langer Beobachtungszeit und Transgenexpression hinsichtlich ihres Integrationsprofils bzw. ihrer Klonalität untersucht. Analysiert wurden jeweils 5 Tiere der transduzierten Vektoren MP91-GFP (A), MP91-LMO2 (B), MP91-TCL1 (C) und SF91- Δ TrkA^{hoch} (D). Die ursprünglichen Transplantate (T) dienen als Referenz für eine polyklonale Ausgangssituation (A, B und D). In Spur 1 ist jeweils ein Marker aufgetragen.

4.9 Monoklonale T-Zell Populationen können nach retroviraler Transduktion transformiert werden

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den verglichenen Zelltypen ist die Funktion des T-Zell Rezeptors (TCR) bei reifen T-Lymphozyten. Im Gegensatz zu HSC/HPC sorgt dieser für eine große Diversität innerhalb der polyklonalen T-Zell Population. Die Interaktion zwischen TCR und dem MHC ermöglicht den reifen T-Zellen ihre Diversität, über eine periphere Homeostase aufrecht zu erhalten. Hierbei finden verschiedene T-Zell Klone (TCRs) verschiedene, stimulatorische Nischen, die für ein Überleben des jeweiligen T-Zell Klons sorgen. Besonders bei einer vorliegenden Lymphopenie (wie bei der Rag-1 Maus) ist dieser Mechanismus von entscheidender Bedeutung.

Um nun diesen TCR-gesteuerten Kontrollmechanismus zu mindern, bzw. im experimentellen Ansatz zu vernachlässigen, wurde eine monoklonale T-Zell Population eingesetzt.

Der Mausstamm OT-I zeichnet sich durch eine T-Zell Population mit lediglich einem einzigen, transgenen TCR aus. Dieser TCR ist spezifisch für Ovalbumin, welches von den T-Zellen dieser Tiere im MHC-Klasse I Kontext erkannt wird. Deshalb verfügen OT-I Mäuse fast ausschließlich über reife, CD8⁺ T-Lymphozyten. Es sind nur wenige CD4⁺ T-Zellen zu detektieren.

Genau wie polyklonale, WT T-Lymphozyten wurden auch monoklonale OT-I T-Zellen mit dem Vektor SF91- Δ TrkA und der Kontrolle MP91-GFP transduziert. Die Transduktionseffizienz war mit 7-20% für beide Vektoren eher gering und der Hauptteil der transduzierten Population war wie erwartet am Tag der Transplantation CD8⁺ (Abbildung 34).

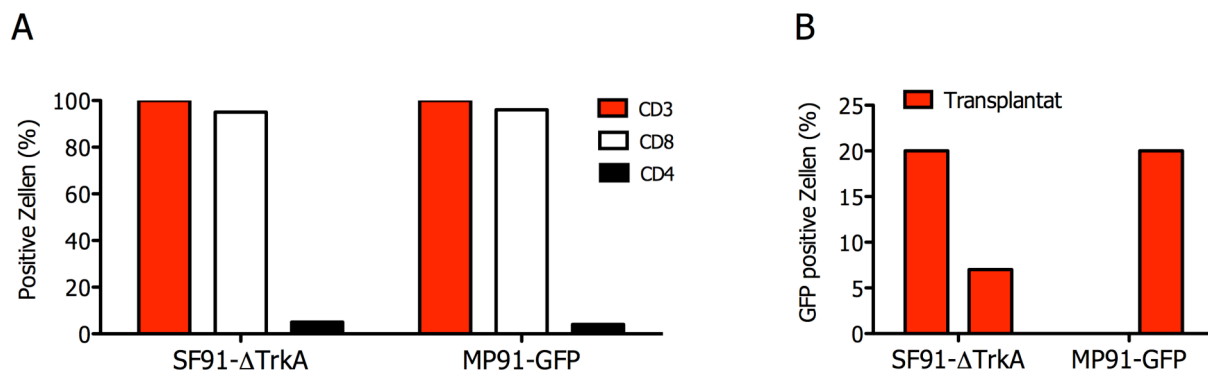


Abbildung 34 OT-I Transplantat nach Transduktion reifer, monoklonaler T-Zellen

Reife, monoklonale T-Zellen (A: CD3) wurden mit den Vektoren SF91- Δ TrkA und MP91-GFP transduziert. Am Tag der Transplantation waren die meisten der Zellen zytotoxische, CD8⁺ T-Zellen (A). Für Δ TrkA wurden zwei Transplantate vorbereitet: eines mit 20% und eines mit 7% Transduktionseffizienz (B).

Für SF91- Δ TrkA wurden zwei Transplantate vorbereitet: zwei Tiere wurden mit 7% und sechs Tiere mit 20% transduzierten T-Zellen transplantiert. Für die Kontrolle (MP91-GFP) wurden insgesamt 6 Tiere mit 20% transduzierten T-Zellen transplantiert. Die Transduktion der OT-I Zellen stellte sich als eher schwierig heraus, da die Zellen nach Stimulierung nicht so effektiv proliferierten, wie die polyklonalen T-Zellen.

Nach einer Latenzperiode von 91-127 Tagen entwickelten die Tiere der SF91- Δ TrkA Gruppe massive Leukämien/Lymphome. Interessanterweise erkrankten die Rezipienten, der mit 7% transduzierten Zellen als erstes. In Abbildung 35 sind das Überleben der mit monoklonalen T-Zellen transplantierten Rag-1 Tiere und repräsentativ die Autopsie eines erkrankten Tieres gezeigt.

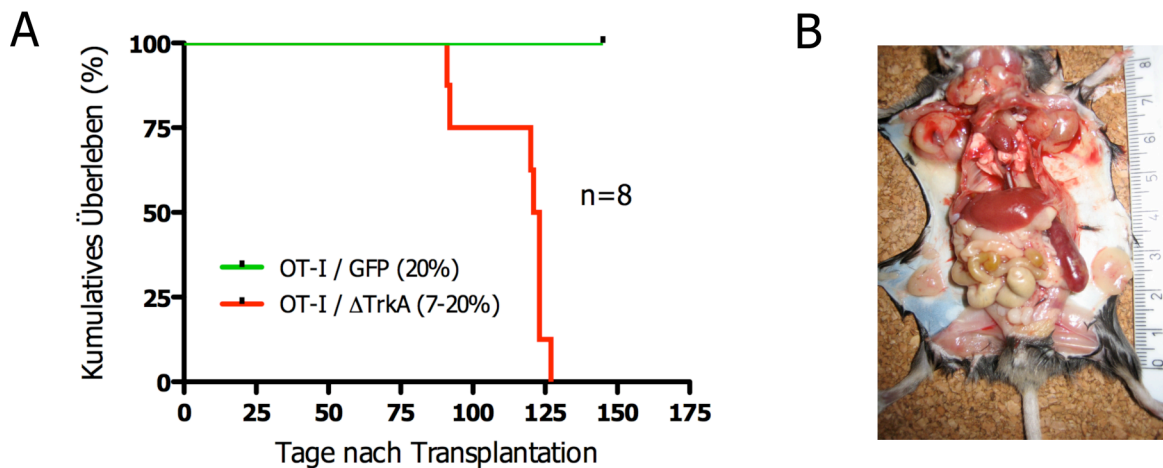


Abbildung 35 Überleben nach Transplantation transduzierter, monoklonaler T-Zellen und Autopsie eines an Leukämie erkrankten Tieres

Rag-1 defiziente Tiere wurden mit transduzierten, monoklonalen T-Lymphozyten des OT-I Mausstamms transplantiert. OT-I/SF91- Δ TrkA transplantierte Tiere entwickelten nach einer kurzen Latenzperiode von 91-127 Tagen Leukämien/Lymphome (rote Linie in A). Nach Transduktion Kontrollvektor transduzierter Zellen (grüne Linie in A), ließen sich hingegen keinerlei maligne Veränderungen beobachten. B: Autopsie eines Tieres nach Δ TrkA Transplantation und induziertem Lymphom. Gezeigt ist eine massive Vergrößerung der Lymphknoten und der Milz.

Wie auch bei den HSC/HPC beobachtet, entwickelten Kontrollvektor transplantierte Tiere nach Transplantation keinerlei maligne Veränderungen.

Die entwickelten Leukämien/Lymphome zeichneten sich alle durch einen reifen T-Zell Phänotyp, eine starke Vergrößerung der lymphoretikulären Organe (Milz und Lymphknoten) und teilweise leukämische WBC aus (Tabelle 24).

Tabelle 24 Induzierte Leukämien/Lymphome nach Transplantation Δ TrkA transduzierter, monoklonaler T-Zellen

Tier	Tranplantat SF91- Δ TrkA (%)	Lymphom	CD4	CD8	WBC > 15.000/ μ l	Tage nach Transplantation
1	7	LN+Milz	+	-	ja	91
2	7	LN+Milz	+	-	n.b.	92
3	20	Milz	-	+	ja	120
4	20	Milz	-	+	n.b.	121
5	20	Milz	-	+	n.b.	123
6	20	Milz	-	+	n.b.	123
7	20	Milz	-	+	n.b.	123
8	20	Milz	-	+	ja	127

LN=Lymphknoten, n.b.=nicht bestimmt.

Auch wenn fast ausschließlich CD8+ T-Zellen transplantiert wurden, so zeigten die Leukämien/Lymphome mit der kürzesten Latenzperiode (siehe Tabelle 24, Tiere 1 und 2) einen reifen, CD4+ Phänotyp. Dies ist besonders interessant, da der Anteil Δ TrkA transduzierter CD4+ T-Zellen im 7%-Transplantat nur 0,2% betrug. Bei einer Gesamtmenge von 1×10^7 transplantierten Zellen, sind dies lediglich 2×10^4 Zellen. Insbesondere Tier 1 (Abbildung 34B) wies einen sehr aggressiven Tumor auf. Dieser wurde nach der FACS-Analyse *in vitro* kultiviert. Die Kultivierung erfolgte unabhängig von IL-2 und seriell transplantierte Tiere erkrankten nach einer sehr kurzen Latenzphase von nur einer Woche an Leukämien/Lymphomen. Das Ergebnis der LM-PCR lieferte ein monoklonales Integrationsprofil, jedoch flankierte die retrovirale Insertion kein offensichtlich Leukämie-induzierendes Gen (Slc12a3, Nup93, Herpud1).

4.10 Immortalisierung einer reifen, polyklonalen T-Zell Population in Kultur

Nach der Transduktion von polyklonalen, primären T-Lymphozyten mit den Vektoren MP91-GFP und MP91-LMO2, wurden diese über mehrere Wochen *in vitro* passagiert. Vor der Kultivierung wurden die Transduktionseffizienz (mittels GFP-Expression), sowie das CD4/8-Verhältnis innerhalb der Population durchflusszytometrisch ermittelt (Abbildung 36).

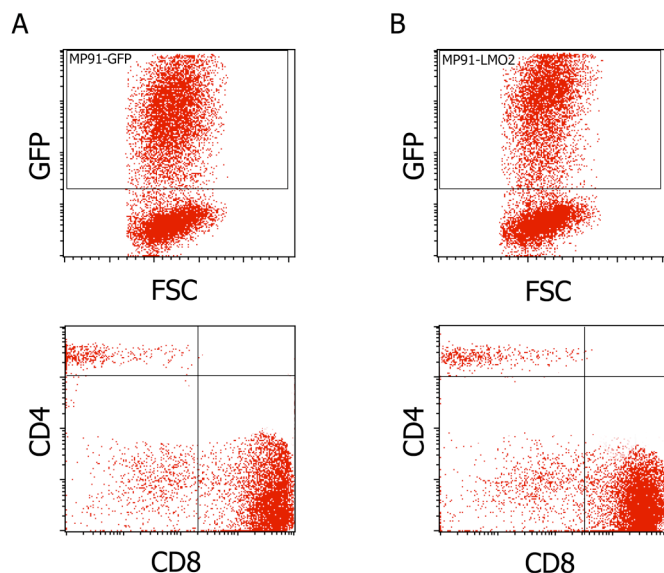


Abbildung 36 GFP-Expression und CD4/8-Verhältnis nach Transduktion

Transduktionseffizienz und CD4/CD8-Verhältnis nach Transduktion mit MP91-GFP (A) und MP91-LMO2 (B). Etwa 50-60% der transduzierten Zellen exprimierten jeweils den transferierten Vektor (GFP-Expression). Nach der Stimulation, Expansion und Transduktion setzte sich die Population fast ausschließlich aus CD8 Zellen zusammen (unten).

50-60% der transduzierten Zellen exprimierten 48 Stunden nach der 2. Transduktionsrunde den jeweils transferierten Vektor. Übereinstimmend mit den übrigen T-Zell Experimenten waren nach Stimulation, Expansion und Transduktion überwiegend CD8+ T-Zellen in der Kultur. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Frisches Medium und IL-2 wurden

zugesetzt und in Abständen von 2 Wochen die GFP-Expression im FACS untersucht. Nach einer Kultivierungszeit von 5-6 Wochen wurde die MP91-GFP transduzierte Population verworfen, da über 90% der Zellen in Apoptose gegangen waren. Im Gegensatz dazu konnte bei der MP91-LMO2 transduzierten Kultur ein drastischer Anstieg der GFP-Expression beobachtet werden (von 50-60% auf 98%), der mit einer Immortalisierung einherging. Die Zellen konnten über Monate kultiviert werden. Sie waren nahezu 100% GFP positiv (Abbildung 37A, links). Interessanterweise ergab die Analyse, der T-Zell Marker CD4 und CD8, einen unreifzelligen, doppelt negativen Phänotyp (Abbildung 37A, rechts). Dass es sich um T-Zellen handelte, konnte durch eine positive CD3 Färbung ermittelt werden (Abbildung 37A, Mitte und 37B). Um den genauen Phänotyp der Zellen zu bestimmen, wurde mittels FACS-Analyse ein Markerprofil erstellt (Abbildung 37B).

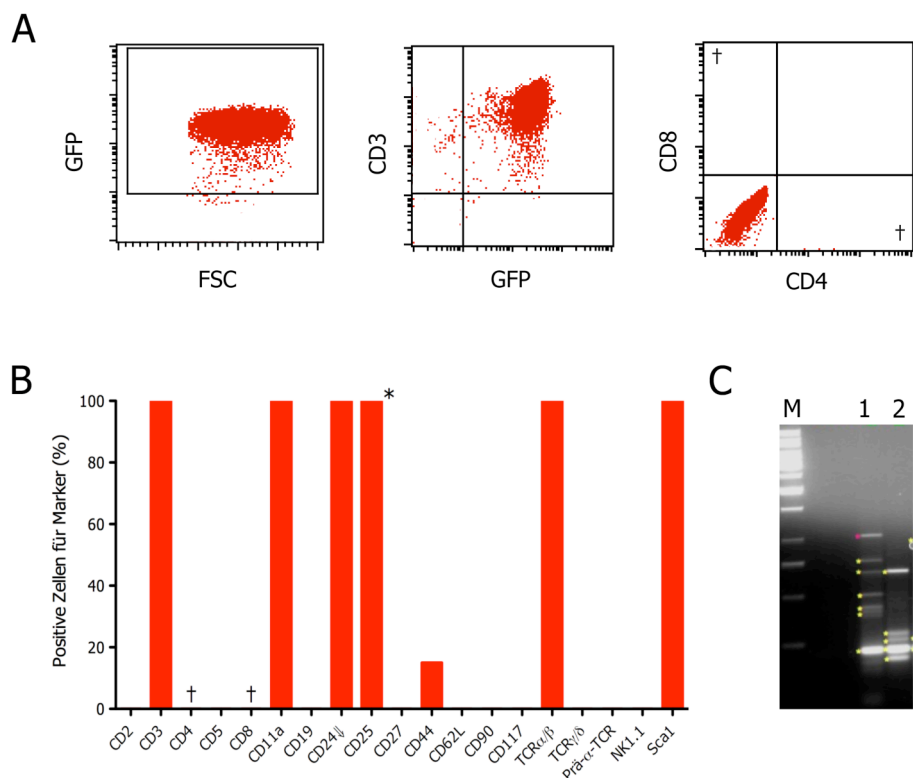


Abbildung 37 FACS-Analyse, Markerprofil und Integrationsanalyse einer immortalisierten T-Zell Population

FACS-Analyse einer MP91-LMO2 transduzierten T-Zell-Population nach 5-6 Wochen in Kultur (A). Über 90% der Zellen exprimierten den gammaretroviralen Vektor. Obwohl es sich um T-Zellen handelte, konnten keine CD4 oder CD8 positiven Zellen detektiert werden (\dagger). Das erstellte Markerprofil (B) ergab jedoch einen eher reifen T-Zell Phänotyp mit positivem Signal für CD3, CD24 \downarrow (niedrig), TCR α/β bzw. für die Aktivierungsmarker Sca1 und CD25. Negativ hingegen waren die Signale für eher unreife Marker wie CD2, CD5 und Prä- α -TCR. Besonders auffällig war die hohe Expression für die α -Kette des IL2-Rezeptors, CD25 (*). Die Integrationsanalyse (C) der immortalisierten Population (Spur 2) zeigte im Vergleich zu einer kurzzeitig stimulierten Kultur (Spur 1) einen eher oligo- bis monoklonalen Charakter. Flankierend zu einer der Integrationen in der immortalisierten Population lagen die Gene für die α -Ketten des IL15- und IL-2-Rezeptors (*). M, Marker.

Wie bereits erwähnt, konnte eine positive Färbung für den T-Zell-Marker CD3 beobachtet werden und außerdem für den T-Zell Rezeptor ($\text{TCR}\alpha/\beta$), obwohl ein CD4/CD8 DN Phänotyp vorlag. Ebenfalls positiv war der Leukozyten-Marker CD11a. Nicht nachweisbar waren die Marker für B-Zellen (CD19), NK-Zellen (NK1.1), andere T-Zell Typen ($\text{TCR}\gamma/\delta$), Stammzellen (CD90, CD117) und T-Vorläuferzellen (CD2, CD5, Prä- α -TCR). CD24 wurde zwar von allen Zellen exprimiert, jedoch mit geringer (\Downarrow niedrig) Intensität. Die Marker CD62L und CD27 wurden nicht detektiert, dafür ein geringer Anteil an CD44+ Zellen. Besonders auffällig war die hohe Expression der spezifischen T-Zell-Aktivierungsmarker Sca1 und CD25.

Die Integrationsanalyse der immortalisierten Population zeigte im Vergleich zu einer kurzzeitig kultivierten Referenzkultur ein oligo- bis monoklonales Insertionsprofil (Abbildung 37C). Unter den betroffenen Sequenzen erwies sich eine Integration als besonders interessant. Die gammaretrovirale Integration konnte in Nähe der Gene für die α -Ketten des IL15- und IL-2-Rezeptors lokalisiert werden.

4.11 Klonalität und Wachstumsverhalten der *in vitro* immortalisierten T-Zell Population

Da die LM-PCR Analyse der immortalisierten Kultur mehrere Banden zeigte (siehe Abbildung 37C), konnte es sich um eine Population von diversen Klonen mit einer Integration oder um einen Klon mit mehreren Integrationen handeln.

Um dies zu ermitteln, wurde eine Klonierung der Zellen mittels limitierender Verdünnung durchgeführt. Auswachsende Klone wurden anschließend ebenfalls einer Integrationsanalyse unterzogen (Abbildung 38).

IM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

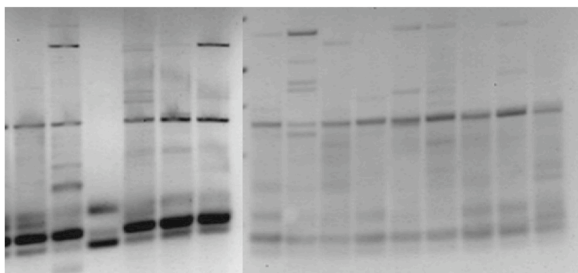


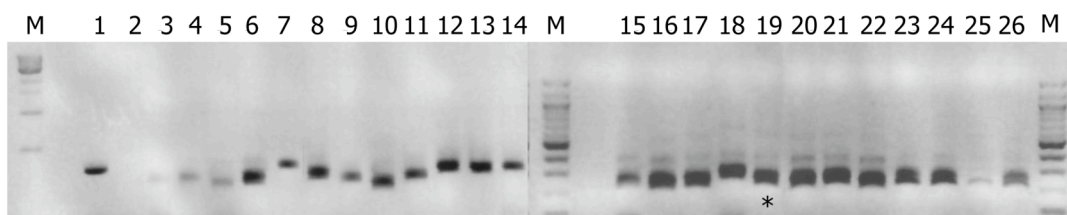
Abbildung 38 LM-PCR nach limitierender Verdünnung

Nach limitierender Verdünnung wurden auswachsende Klone mittels LM-PCR analysiert. Das Integrationsprofil der verschiedenen Klone (1-14) war mit der ursprünglichen Mischpopulation (IM) vergleichbar.

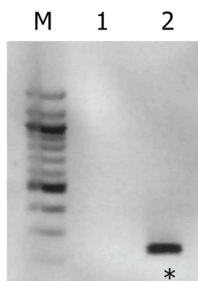
Die LM-PCR Analyse zeigte für alle 14 ausgewachsenen Klone ein sehr ähnliches Bandenmuster, welches auch mit der ursprünglichen immortalisierten Mischpopulation vergleichbar war (Abbildung 38, Spur IM).

Neben der limitierenden Verdünnung wurde deshalb auch die Rekombination der TCR β -Kette betrachtet, um weiteren Aufschluss über die Klonalität der immortalisierten Population zu erlangen. Wäre eine gemeinsame Vorläuferzelle von der Integration betroffen, so hätten verschiedene T-Zell Klone mit den gleichen Integrationen beobachtet werden können. Die Analyse des TCR sollte deshalb den klonalen Ursprung der Kultur nachweisen. Im Vergleich zu einer polyklonalen, Wildtyp T-Zell Population aus mononuklearen Milzzellen wurde deshalb mittels PCR- bzw. FACS-Analyse die Rekombination der verschiedenen TCR β -Ketten (Vb1, 2, 3, 4, 5.1, 5.2, 5.3, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) analysiert (Abbildung 39). Die polyklonalen T-Zellen wurden aus der Milz einer Wildtyp Ly5.1 Maus isoliert und sollten als Positivkontrolle für die Rekombination aller untersuchten TCR β -Ketten dienen. Durch die Detektion der verschiedenen TCR β -Ketten konnte also die Klonalität der jeweiligen Population ermittelt werden.

A



B



C

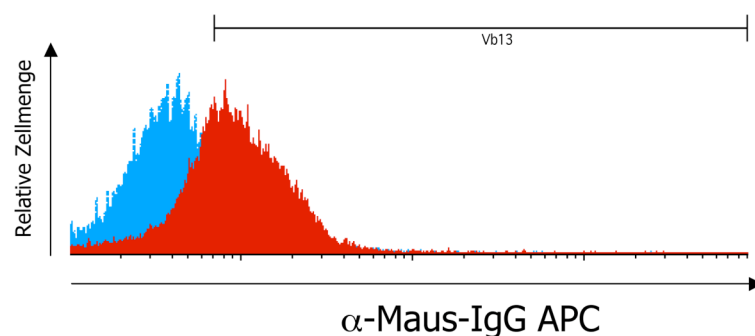


Abbildung 39 PCR- und FACS Analyse der TCR β -Ketten Rekombination

RNA wurde aus einer polyklonalen, WT (A) bzw. der immortalisierten Population (B) isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für die jeweilige PCR Reaktion. Wie zu erwarten, konnte in der polyklonalen, murinen WT Population mononuklearer Milzzellen ein Signal für alle untersuchten TCR β -Ketten detektiert werden (A). Bei Spur 1 handelt es sich um eine Kontrolle (Aktin). Spur 2, Wasserkontrolle. Von links gesehen Spur 3-26: Vb1, 2, 3, 4, 5.1, 5.2, 5.3, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20. Für die immortalisierte Population konnte lediglich ein Signal für die Vb13-Kette (*) detektiert werden (B). Dieses Ergebnis konnte anschließend durchflusszytometrisch bestätigt werden (C). Negativkontrolle: nicht gefärbte, blaue Population in (C). M, Marker.

Im Vergleich zu der WT-Population konnte bei den immortalisierten Zellen lediglich ein Signal für die Vb13-Kette detektiert werden (Abbildung 39B und C). Dies wies auf eine monoklonale T-Zellkultur hin.

Das Wachstumsverhalten der immortalisierten Kultur zeigte eine hohe IL-2 Abhängigkeit. Mit sinkenden IL-2 Konzentrationen setzte eine massive Apoptose innerhalb der Population ein. Um die IL-2 Abhängigkeit zu verdeutlichen, wurden diverse Kulturbedingungen, mit verschiedenen Mengen an IL-2 (400U/ml, 100U/ml, 50U/ml und 0U/ml) gewählt. Nach einer Inkubation von 2 Tagen wurde die jeweilige Kultur mit dem Apoptose-Marker Annexin V gefärbt (Abbildung 40).

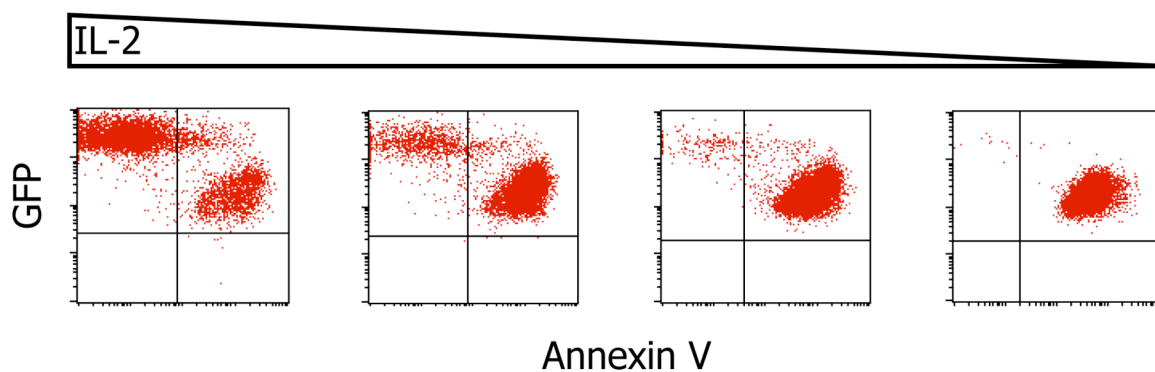


Abbildung 40 IL-2 Abhängigkeit der immortalisierten T-Zell Population

Immortalisierte T-Zellen wurden mit verschiedenen IL-2 Konzentrationen kultiviert (von links, 400U/ml, 100U/ml, 50U/ml und 0U/ml). 2 Tage nach Kultivierung wurden die Zellen jeweils mit dem Apoptose-Marker Annexin V gefärbt. Mit sinkenden IL-2 Konzentrationen konnte eine Zunahme apoptotischer Zellen beobachtet werden.

Es konnte eindeutig beobachtet werden, dass mit sinkenden IL-2 Konzentrationen die Färbung für Annexin V anstieg. Weiterhin nahm die Intensität der GFP-Expression innerhalb der Kultur ab. Annexin V gefärbte T-Zellen zeigten für alle analysierten IL-2 Konzentrationen eine geringere GFP-Expression, als Annexin V negative Zellen. Hoch GFP exprimierende Zellen zeigten keine Anzeichen von Apoptose.

Weiterhin sollte das Wachstumsverhalten direkt mit nicht-manipulierten, primären T-Lymphozyten verglichen werden. Hierzu wurde in einem Wettbewerbsversuch mit nicht-transduzierten, aber für 4 Tage stimulierten, primären T-Lymphozyten eine Mischkultur angesetzt. Diese setzte sich aus 10% der immortalisierten und 90% der nativen Zellpopulation zusammen (Tag 0). Es wurden insgesamt 4 Versuche gleichzeitig gestartet. Die Zellen wurden täglich mit IL-2 (100U/ml) versorgt und am Tag 2, 6 und 8 wurde eine FACS-Analyse bezüglich des Wachstumsverhaltens durchgeführt. Die immortalisierte Population konnte hierbei durch die Expression von GFP von der Konkurrenzpopulation unterschieden werden.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die immortalisierte Population bereits nach 8 Tagen die komplette Kultur dominierte und die Konkurrenzpopulation verdrängt hatte (Abbildung 41).

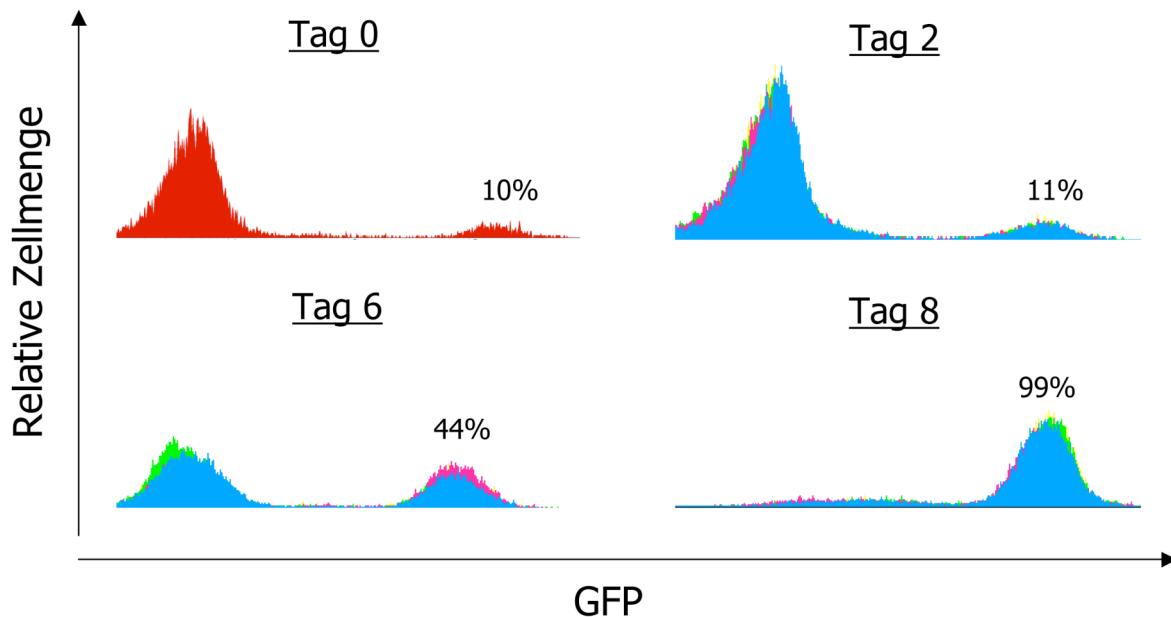


Abbildung 41 Wettbewerbsversuch zum Wachstumsverhalten der immortalisierten T-Zell Population

Mischversuch zum Wachstumsverhalten der immortalisierten Population. Stimulierte, primäre T-Lymphozyten wurden als Konkurrenzpopulation gewählt. Der Anteil an immortalisierten Zellen betrug zu Beginn des Experiments 10% an der Gesamtkultur (Tag 0). Insgesamt wurden 4 Versuche gleichzeitig angesetzt, die alle ein deckungsgleiches Ergebnis lieferten (blaue, rote, grüne und gelbe Populationen im Histogramm-Blot). Die FACS-Analyse an Tag 2, 6 und 8 zeigte eindeutig die Dominanz der immortalisierten Zellen, diese übernahmen am letzten Tag der Analyse mit 99% die komplette Kultur. Die Zellen wurden täglich mit 100U/ml IL-2 versorgt.

Abschließend wurden die immortalisierten Zellen noch in 4 bestrahlte (5Gy) Rag-1 defiziente Rezipienten transplantiert. Es sollte untersucht werden, ob die Zellen ein/e Lymphom/Leukämie induzieren. Leider konnten schon einige Tage nach der Transplantation keine Zellen in den Mäusen detektiert werden. Es handelte sich also um einen ausschließlich immortalisierten, hoch IL-2 abhängigen, aber nicht voll transformierten T-Zell Klon.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das leukämische Potential muriner, reifer T-Zellen und muriner Blutstammzellen (HSC/HPC), nach gammaretroviralem Gentransfer potenter T-Zell Onkogene direkt miteinander verglichen. Bei beiden Zelltypen wurden sehr hohe Transduktionseffizienzen für alle drei analysierten Onkogene (LMO2, TCL1 und Δ TrkA) erzielt. Insgesamt wurden 52 HSC/HPC und 45 T-Zell transplantierte Tiere evaluiert. Alle Rezipienten, die mit T-Zell Onkogen transduzierten HSC/HPC transplantiert wurden, entwickelten nach charakteristischen Latenzperioden Leukämien/Lymphome. Im Gegensatz dazu, zeigten T-Zell transplantierte Tiere keinerlei Anzeichen hämatologischer Malignisierung, selbst nach sehr langen Beobachtungszeiträumen von 284 bis 518 Tagen.

Eine Transformation reifer T-Zellen konnte jedoch in Δ TrkA transduzierten, TCR-monoklonalen T-Zellen aus TCR-transgenen OT-I Mäusen induziert werden. Auch *in vitro* wurde nach gammaretroviraler Transduktion, zumindest die Immortalisierung einer polyklonalen, reifen T-Zell Population beobachtet.

5.1 Transformation muriner Blutstammzellen nach gammaretroviraler Transduktion

Um eine Insertionsmutagenese zu erzielen, wurden beide Zelltypen, reife T-Zellen und HSC/HPC mit hohen Vektorkopien behandelt (siehe Abbildung 24) und in Rag-1 defiziente Mäuse transplantiert. Die hohen Transduktionseffizienzen, mit bis zu 98%, entsprachen multiplen Integrationen/Vektorkopien pro Zelle (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25 Transduktionseffizienzen und daraus resultierende Anzahl der Vektorkopien

Vektorkopien (\emptyset)	Transduktionseffizienz (%)	Zu erwartende Verteilung von Zellen mit...Vektorkopien (nach Transduktion) in %								
		1	2	3	4	5	6	7	8-	>8
0,3	22,1	88,0	11,0	0,9	0,1	*	*	*	*	*
0,5	39,9	77,1	19,3	3,2	0,4	*	*	*	*	*
1	63,2	58,2	29,1	9,7	2,4	0,5	0,1	*	*	*
2	86,5	31,3	31,3	20,9	10,4	4,2	1,4	0,4	0,1	*
3	95,0	15,7	23,6	23,6	17,7	10,6	5,3	2,3	0,9	0,4
4	98,2	7,5	14,9	19,9	19,9	15,9	10,6	6,1	3,0	2,2
5	99,3	3,4	8,5	14,1	17,7	17,7	14,7	10,5	6,6	6,9

* Geringer als 0,05%. Tabelle modifiziert nach [200].

Wie in Tabelle 25 aufgezeigt [200], liegt bei einer so hohen Transduktionseffizienz die durchschnittliche Vektorkopienanzahl bei 3-5 Integrationen pro Zelle. In einigen Zellen integrierten die transferierten Vektoren sicherlich noch häufiger als 3-5-mal. Dies hätte man auf genomischer Ebene, mittels qPCR ermitteln müssen. Durch eine erhöhte Anzahl der Insertionsstellen und zusätzlich transferierte Onkogene sollte die Genotoxizität durch Insertionsmutagenese stark begünstigt werden. Für Δ TrkA wurde zusätzlich eine niedrig transduzierte Gruppe, mit nur 20% angesetzt (etwa 90% der Zellen mit 1 Kopie). Für dieses Onkogen war bekannt, dass es auch mit einer einzigen Kopie eine transformierende Wirkung ausübt.

5.1.1 Phänotypen der HSC/HPC induzierten Tumore

Nach der Transplantation genetisch-modifizierter HSC/HPC, wurde für alle untersuchten Onkogene ein großes transformierendes Potential beobachtet. Die Rezipienten erkrankten nach, für jedes Onkogen spezifischen Latenzperioden und zeigten verschiedene Tumorphänotypen.

Für das Onkogen LMO2 konnten am häufigsten unreife, T-Zell lymphatische Leukämien (T-ALL) beobachtet werden, die einen CD8+CD4+ (DP) Phänotyp aufwiesen (siehe Tabelle 21 und Tabelle im Anhang). Im Gegensatz dazu wird für LMO2 transgene Mäuse ein CD8-CD4- (DN) Phänotyp beschrieben [168]. Weiterhin wurde dieser DN Phänotyp auch in einer Studie mit lentiviral LMO2-transduzierten HSC/HPC beobachtet [152]. Diese Diskrepanz könnte auf den Unterschied der verwendeten Vektoren zurückgeführt werden und auf das daraus resultierende Integrationsverhalten. Im Vergleich zu den transgenen Tieren wiesen die transplantierten Zellen im vorliegenden Experiment eine viel höhere Kopienzahl des betreffenden Onkogens auf. Die damit verbundene höhere Expression könnte mögliche Unterschiede zum Transgen-Modell erklären. Die Inkubationszeit für die Leukämie-/Lymphom-Entwicklung im vorliegenden Experiment verhielt sich dagegen mit 198-408 Tagen ähnlich wie in den erwähnten Studien.

Für TCL1 entwickelten sich 168-310 Tage nach der Transplantation maligne Veränderungen der Hämatopoese. Hingegen zeigen TCL1 transgene Tiere erst 450-600 Tage nach der Geburt eine Lymphom/Leukämie-Entwicklung [174]. Die erhöhte Kopienzahl des TCL1 pro Zelle könnte auch hier dazu geführt haben, dass die malignen Veränderungen früher eingetreten sind. Interessanterweise hatten einige der beobachteten Leukämien/Lymphome einen CD4+ (EP) Phänotyp (Tabelle 21). Für TCL1-induzierte Leukämien/Lymphome in transgenen Tieren ist ein reifzelliger Phänotyp zwar beschrieben, jedoch mit CD8+ (EP)

Zellen. Ein reifzelliger, CD4+ (EP) Phänotyp wie auch in unseren Experimenten beobachtet wird häufiger beim Menschen diagnostiziert [201]. Ein wesentlicher Unterschied zu den transgenen Tieren ist natürlich auch die ektope Expression des TCL1 über einen gammaretroviralen Vektor. Kooperierende Insertionsereignisse, also transaktivierte Gene könnten möglicherweise der Grund für die beobachteten Phänotypen sein, auch wenn durch die Integrationsanalyse keine offensichtlich kooperierenden Gene identifiziert wurden.

Dass TCL1 auch für die Entwicklung von B-Zell Tumoren sorgt, ist aus der Literatur bekannt [202] und konnte auch hier gezeigt werden.

Die bei ΔTrkA beobachtete Malignisierung der Hämatopoese wurde bereits von Meyer et al. beschrieben [129]. Bei der $\Delta\text{TrkA}^{\text{hoch}}$ transduzierten Gruppe entwickelten sich genau wie bei Meyer et al. hyper-akute myeloische Proliferationen (transiente Leukämien), dies konnte in der $\Delta\text{TrkA}^{\text{niedrig}}$ Gruppe nicht beobachtet werden. Möglicherweise proliferierten die transduzierten Zellen bei einer geringen Transduktionseffizienz wahrscheinlich im Vergleich zu der hoch-transduzierten Gruppe wesentlich schwächer, da in den Zellen der $\Delta\text{TrkA}^{\text{niedrig}}$ Gruppe weniger Kopien des Onkogens vorlagen. Weiterhin verfügen Rag-1 defiziente Tiere über keine endogenen T-Zellen. Nach der Bestrahlung und der Transplantation der HSC/HPC wurde die Thymopoese stark begünstigt, somit konnten sich im weiteren Verlauf maligne T-Vorläuferzellen durchsetzen.

5.1.2 Integrationsanalyse der generierten Leukämien/Lymphome

Die Integrationsanalyse der HSC/HPC induzierten Leukämien/Lymphome ergab für alle untersuchten Onkogenengruppen ein oligo- bis monoklonales Integrationsprofil.

Insgesamt konnte in allen experimentellen Gruppen festgestellt werden, dass bevorzugt Gene der Signaltransduktion von den gammaretroviralen Integrationen betroffen waren (siehe Tabelle 22). Dies könnte ein Hinweis auf eine Gruppe von Genen sein, die eine kollaborierende Wirkung zu den entsprechenden Onkogenen aufweisen. Bei einem LMO2-induzierten Tumor konnte zumindest ein Gen identifiziert werden (Snx10), das aus der gleichen Familie wie ein bereits prognostizierter Kooperationspartner (Snx12) für dieses Onkogen stammte [203]. Die Anzahl, der CIS Gene war jedoch insgesamt eher gering (siehe Tabelle 23) und weist darauf hin, dass alleine die transferierten Onkogene für eine Transformation der Zellen sorgten. Mindestens für ΔTrkA ist diese Hypothese, durch die niedrig transduzierte Gruppe belegt. Zusammenfassend muss jedoch festgestellt werden, dass die geringe Anzahl der untersuchten Integrationen und flankierenden Gene keine statistisch signifikanten Aussagen zulässt.

5.2 Transformationsresistenz polyklonaler, reifer T-Zellen

Die Transduktionseffizienzen waren für HSC/HPC und reife T-Zellen vergleichbar hoch (Abbildung 24). Dennoch konnten reife T-Zellen, auch nach extrem langer *in vivo* Beobachtung nicht transformiert werden. Mögliche Gründe für diese relative Transformationsresistenz könnten einerseits auf eine unzureichende Expression der transferierten Onkogene, oder auf die grundlegenden Unterschiede der verglichenen Zelltypen zurückzuführen sein. Und obwohl in einigen Fällen sogar eine Anreicherung GFP-positiver T-Zellen erfolgte (Abbildung 32, Gruppen LMO2, $\Delta\text{TrkA}^{\text{hoch}}$ und GFP), konnte in der Integrationsanalyse kein klonales Ungleichgewicht beobachtet werden. Die Integrationsprofile waren über den gesamten Beobachtungszeitraum polyklonal (Abbildung 33). Es sollte auszuschließen sein, dass potentiell transformierte T-Zellen immunologisch kontrolliert wurden, da GFP in Mäusen immunogen ist [204;205]. Im Verlauf des Experiments kam es aber nicht zur Eliminierung GFP-positiver Zellen.

5.2.1 Expressionsprofile polyklonaler, reifer T-Zellen im Vergleich zu murinen Blutstammzellen

Expressionsunterschiede zwischen den verglichenen Zelltypen können die in dieser Arbeit beobachtete Transformationsresistenz reifer T-Zellen nicht erklären. Eine ineffiziente Expression der untersuchten Onkogene in reifen T-Zellen konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da reife T-Zellen und aus Stammzelltransplantaten generierte Thymozyten für alle transduzierten Vektoren sehr ähnliche Expressionsstärken zeigten (Abbildung 27). Außerdem konnten durch eine sehr schwache Transduktion monoklonale, reife OT-I T-Zellen mit ΔTrkA transformiert werden. Die Expression der Onkogene nach retroviralem Gentransfer sollte also hinreichend gewesen sein. Weiterhin konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum in den genetisch modifizierten, reifen T-Zellen eine hohe GFP-Expression beobachtet werden. Wie die Analysen in 4.4.2 zeigen, korrelierte die GFP-Expression mit der Expression des jeweiligen Onkogens.

5.2.2 Mögliche Mechanismen/Gründe für die Transformationsresistenz polyklonaler, reifer T-Zellen

Die präsentierten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass aktivierte T-Zellen weniger empfänglich für die Transformation mit den drei analysierten Onkogenen sind, als T-Vorläuferzellen. Verschiedene T-Zell Merkmale könnten der Grund für diese relative Resistenz sein. Das Enzym Telomerase, welches in den meisten somatischen Zellen nicht nachweisbar ist, zeigt eine hohe Aktivität in Subpopulationen unreifer Thymozyten. In Krebszellen ist die Aktivität dieses Enzyms unerlässlich, um die extensive Teilung der malignen Zellen zu gewährleisten [206]. Im Gegensatz zu den unreifen T-Vorläufern, ist die Telomerase-Aktivität in ruhenden, peripheren Lymphozyten eher gering [207]. Andererseits kann diese Aktivität durch eine Stimulierung über CD3/CD28 oder Mitogen auch in reifen T-Zellen induziert werden [207;208]. Weiterhin ist beschrieben, dass die Länge der Telomere mit der *in vivo* Persistenz der transferierten T-Zellen korreliert [209]. Da die repopulierten T-Zellen über einen sehr langen Beobachtungszeitraum verfolgt wurden, ist zu vermuten, dass eine Telomerase-Aktivität innerhalb dieser Zellen vorhanden war. Deshalb kann ein Unterschied in der Telomerase-Aktivität, als mögliche Erklärung für die höhere Transformations-empfindlichkeit der HSC/HPC weitgehend ausgeschlossen werden.

Ein entscheidender Unterschied zwischen beiden Zelltypen ist, dass unreife Thymozyten wahrscheinlich häufiger in den mitotischen Zyklus eintreten und sich damit häufiger teilen als reife T-Zellen. Somit besteht für diese Zellen eine höhere Gefahr, zusätzlich transformationsfördernde Mutationen zu akkumulieren. In den vorliegenden T-Zell Experimenten wurden jedoch serielle Transplantationen vorgenommen. Diese induzierten nach jedem Transfer eine Lymphopenie-getriebene, homeostatische Proliferation in den Rag-1 defizienten Rezipienten. Die homeostatische Proliferation reifer T-Zellen, in lymphopenischer Umgebung (wie Rag-1 defizienten Mäusen) ist bereits gut beschrieben [123] und sorgte in dem verwendeten Versuchsaufbau für eine hohe Teilungsrate der *in vivo* beobachteten T-Zellen. Man kann also nicht von quieszenten, reifen T-Zellen sprechen, sondern von aktivierten, stark proliferierenden Effektor-T-Zellen.

Während der Rekombination des TCR kann es zu chromosomalen Translokationen kommen, die in den differenzierenden Thymozyten eine anomale Expression, von (Proto-)onkogenen zur Folge haben können [160]. Diese Translokationen könnten in HSC/HPC transplantierten Tieren als zusätzlich transformationsförderndes Ereignis dienen, das bei reifen T-Zellen nicht vorhanden ist. Bedauerlicherweise konnten die nach Transplantation von HSC/HPC generierten Tumorzellen nicht *in vitro* kultiviert werden und eine Analyse des chromosomalen Phänotyps war deshalb nicht möglich. Lediglich der Karyotyp einer/s

LMO2-induzierten Leukämie/Lymphoms zeigte eine Trisomie 17, aber keine chromosomalen Translokationen.

Weiterhin wurde die Rolle der TCR-Rekombination bei den malignen Veränderungen der HSC/HPC genauer betrachtet. HSC/HPC von Rag-1 defizienten Mäusen sind nicht zu einer signifikanten TCR-Rekombination in der Lage [193]. Gleichwohl zeigten diese Zellen, nach gammaretroviralem Gentransfer von LMO2, ein mit Wildtyp-Zellen vergleichbares Transformationspotential (Abbildung 31 und 28A). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass zumindest in unserem Versuchsaufbau die Rekombination des TCR keine besondere Rolle spielte. Außerdem wurde das Transformationspotential Rag-1 defizienter, LMO2-transgener HSC/HPC bereits für das doppelt-transgene Mausmodell beschrieben [210]. Die Rekombination des TCR scheint also keinen wesentlichen Beitrag zur Tumorigenese von LMO2 zu leisten.

5.3 Einschränkungen des verwendeten Modells

Eine der Hauptlimitationen des verwendeten Modells ist, dass ausschließlich Gedächtnis- (*Memory*) T-Zellen bezüglich ihres Transformationspotentials betrachtet wurden. Da der *ex vivo*, gammaretrovirale Gentransfer eine Stimulierung und Expansion der T-Lymphozyten implizierte. Alle ursprünglich naiven T-Zellen konvertierten durch diesen Stimulus mit α -CD3, α -CD28 *ex vivo* zu Gedächtniszellen [211]. Um das Transformationspotential naiver T-Zellen zu evaluieren, könnten in zukünftigen Studien beispielsweise Zytokin-präsentierende lentivirale Vektoren genutzt werden [212]. Diese könnten ein Überleben der nativen T-Zellen (z.B. über IL-7 Präsentation) bei effizientem Gentransfer vermitteln. Da für eine Transduktion mit lentiviralen Vektoren keine extensive Stimulierung der T-Zellen nötig ist [213], würde ein Phänotypwechsel der T-Zellen verhindert und außerdem ein *in vivo* Langzeit-Überleben der T-Zellen begünstigt. Es ist eindeutig gezeigt, dass intensive Stimulierung und Expansion die *in vivo* Überlebensfähigkeit reifer T-Zellen stark beeinflussen [209]. Andererseits gleicht das hier verwendete Transduktionsprotokoll absichtlich den meisten Gentherapie-Studien, die auf gammaretroviralem Gentransfer in primäre T-Lymphozyten basieren [214;215;216], um eine Risikoeinschätzung gammaretroviralen Gentransfers in reife T-Zellen zu evaluieren.

Dennoch ergab sich durch die angewandte Prozedur ein vermutlich für das Experiment nachteiliges Szenario. Nach der Stimulierung und Expansion der T-Zellen, waren in der Kultur fast ausschließlich zytotoxische, CD8⁺ T-Zellen zu finden (über 90%, Abbildung 34A).

Dies galt nicht nur für die OT-I Zellen, sondern auch für die polyklonalen, reifen WT T-Zellen

(siehe Abbildung 36). CD4⁺ Zellen stellten in den Transplantaten einen ganz geringen Anteil. Damit fehlten natürlich auch entscheidende Populationen, wie die CD4⁺, regulatorischen T-Zellen (T_{regs}). So könnte man annehmen, dass die nach T-Zell Transplantation beobachtete Kolitis, auf eine mögliche Autoimmunreaktion zurückzuführen war, die aufgrund fehlender regulatorischer T-Zellen nicht kontrolliert werden konnte.

T_{regs} sind bekannt, für ihre entscheidende Fähigkeit/Rolle Autoimmunerkrankungen zu unterdrücken [217]. Um dies und die Manipulation der Zellen als Grund für die beobachteten Symptome auszuschließen, wurden vom Experimentator frisch isolierte, naive T-Zellen in Rag-1 defiziente Tiere transplantiert. Auch hier ergab sich, bei einem normalen CD4/CD8-Verhältnis der gleiche Krankheitsverlauf. Dies lässt vermuten, dass kleine Unterschiede zwischen Donor- und Rezipienten-Stamm für die beobachtete Erkrankung verantwortlich waren.

Erstaunlicher- und glücklicherweise führte die serielle Transplantation der T-Zellen nicht zur Akkumulation autoreaktiver Zellen, alle Tiere erkrankten nach ähnlichen Latenzperioden. Obwohl beide Mausstämme den gleichen Hintergrund aufwiesen (C57BL/6), waren möglicherweise geringe Antigenunterschiede zwischen Donor- und Rezipientenstamm für die Reaktivität der Zellen verantwortlich. Hierbei könnten beispielsweise Unterschiede der Darmflora ausschlaggebend gewesen sein. Erstens wurden beide Stämme in verschiedenen Einrichtungen generiert und zweitens sind Rag-1 Mäuse durch ihre Immundefizienz anfälliger. In weiteren Arbeiten soll innerhalb der Gruppe von Laer der Grund für die beobachtete Symptomatik untersucht werden.

Eines der weiteren Einschränkungen in der vorliegenden Versuchsdurchführung war die Entstehung von strahlungsinduzierten Lymphomen. Nach γ -Bestrahlung entwickelten einige der Tiere CD8⁺CD4⁺ doppelpositive (DP) Lymphome, die auf Empfängerzellen zurückzuführen waren. In früheren Studien mit Rag-1 und Rag-2 defizienten Mausstämmen konnte bereits gezeigt werden, dass durch die sublethale γ -Bestrahlung eine von dem TCR β -Signalweg unabhängige Differenzierung von CD4⁻/CD8⁻ in doppelpositive (DP) CD4⁺CD8⁺ Thymozyten induziert wird [218;219]. Wegen einer längeren Observationszeit in der vorliegenden Studie konnte die Entwicklung dieser DP Zellen erstmals verfolgt und das Auftreten der Leukämien/Lymphome beobachtet werden.

Weiterhin besteht die Frage, ob die gewählten Onkogene ein transformierendes Potential in reifen T-Zellen entfalten können oder ob sie für die Malignisierung reifer T-Zellen unzureichend sind. Zumindest TCL1 sollte jedoch eine relativ gute Wahl gewesen sein, da hauptsächlich dieses Onkogen bei der Entwicklung humaner, reifzelliger T-Zell Leukämien/Lymphome involviert ist und auch in der Maus einen einfach positiven (EP)-Phänotyp induziert [220;221].

Außerdem konnten monoklonale, reife OT-I T-Zellen durch Δ TrkA transformiert werden. Das transformierende Potential dieses Onkogens kann also für reife T-Zellen nicht in Frage gestellt werden. Ein weiteres, geeignetes Onkogen wäre das von HTLV-I stammende tax. Für dieses Onkogen ist bekannt, dass es im Rahmen der HTLV-I Infektion eine entscheidende Rolle bei den malignen Veränderungen reifer T-Zellen spielt [179;178].

Das Fusionsgen NPM/ALK sorgt ebenfalls für die Entstehung von reifzelligem T-Zell Lymphomen [222;223]. Virale Gene wie tax und Fusionsgene wie NPM/ALK sind zwar für die Induktion von T-Zell Lymphomen bekannt, spielen aber bei der Untersuchung gammaretroviraler Genotoxizität keine Rolle, da sie nicht von den Nebenwirkungen der Insertionsmutagenese betroffen sein können. In weiterführenden Experimenten sollen jedoch auch diese Gene hinsichtlich ihres transformierenden Potentials in reifen T-Zellen untersucht werden.

Abschließend bleibt die Frage nach der für den Patienten nötigen Relevanz, der aus Mausmodellen erhaltenen Daten. Die aus dem kongenen Maussystem gewonnenen Erkenntnisse, sind nicht unbedingt, uneingeschränkt auf den Menschen zu übertragen. Man sollte den Versuchsansatz auch in humanisierten Mausmodellen [141;224] reproduzieren.

5.4 Entwicklung reifer T-Zell Leukämien/Lymphome nach Transduktion monoklonaler OT-I T-Zellen

Ein potentiell interessanter Mechanismus wie die Leukämogenese bei adulten T-Zell Leukämien/Lymphomen kontrolliert werden könnte, bildet die klonale Konkurrenz polyklonaler, reifer T-Zellen um stimulatorische Nischen. Diese Nischen bestehen aus spezifischen MHC/Selbstpeptid-Komplexen und liefern die nötigen Überlebenssignale für periphere T-Lymphozyten. Der homeostatische Mechanismus konserviert die Polyklonalität der T-Zell Population [123] und reguliert die Proliferation der peripheren T-Lymphozyten [124]. Dieser Mechanismus könnte möglicherweise dem Auswachsen prämaligener T-Zell Klone entgegenwirken. In einem polyklonalen Versuchsansatz ist es denkbar, dass potentiell präleukämische Klone durch die Konkurrenz innerhalb der stimulatorischen Nischen nicht genügend Überlebenssignale bekämen und dadurch ihr Auswachsen kontrolliert würde (siehe Abbildung 42A). Deshalb wurden OT-I Mäuse als Donorstamm für eine monoklonale, hauptsächlich CD8+ T-Zell Population gewählt. Diese Mäuse verfügten über nur einen, transgenen TCR [225] und der Kontrollmechanismus der MHC-TCR Nischen wurde somit aufgehoben.

Monoklonale T-Lymphozyten aus OT-I TCR-transgenen Mäusen waren, mit einer ähnlichen Zeitkinetik (zumindest bei Δ TrkA), wie entsprechend genetisch-modifizierte hämatopoetische

Stammzellen transformierbar (siehe Abbildung 35A und 28D). TCR-monoklonale, reife T-Lymphozyten ließen sich mit ΔTrkA transformieren, während polyklonale T-Lymphozyten gegen die Transformation mit ΔTrkA resistent waren. Die Hypothese ist nun, dass durch die Einschränkung des T-Zell Repertoires möglicherweise freie MHC-Nischen von potentiell transformierten T-Zellen besetzt werden konnten. Ein „präleukämischer Klon“ konnte demnach konkurrenzlos innerhalb der neu erschlossenen Nischen auswachsen (siehe Abbildung 42B).

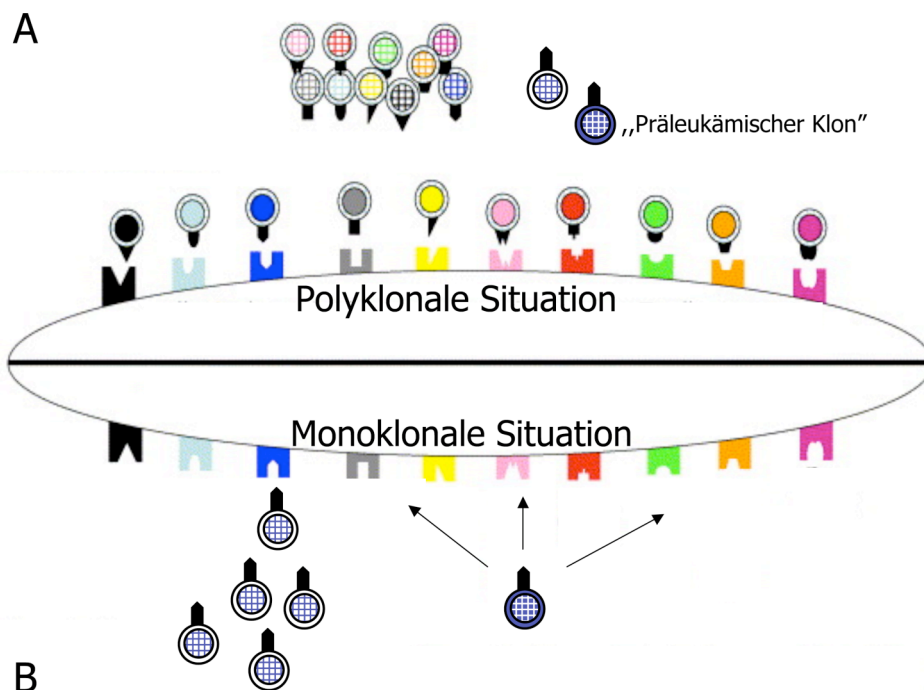


Abbildung 42 Vorgeschlagenes Nischenmodell zur Kontrolle „präleukämischer Klone“

In einer polyklonalen Situation (A) sind alle stimulatorischen Nischen von Konkurrenzellen besetzt. Präleukämische Klone könnten so entweder verloren gehen oder durch die homeostatischen Mechanismen kontrolliert werden. In einer monoklonalen Situation (B: bei einem OT-I Transplantat), gibt es für die Besetzung der Nischen keine Konkurrenz. Potentiell präleukämische Klone könnten genügend stimulatorische Nischen finden, die ein Auswachsen zu einer/m Leukämie/Lymphom ermöglichen würden. Abbildung modifiziert nach [123].

Hierfür spricht die Tatsache, dass aus dem geringen Anteil genetisch modifizierter CD4+ Zellen (0,2% an der Gesamtpopulation) die Tumorbildung mit der kürzesten Latenz erfolgte. Für OT-I Zellen ist eine MHC-Kreuzreaktivität (auch zu MHC Klasse-II) bekannt [226], die bei einer völligen Konkurrenzlosigkeit das Auswachsen transformierter Zellen zusätzlich begünstigen müsste. Umso komplexer das Repertoire der T-Zell-Population, desto eingeschränkter ist die Möglichkeit freie, stimulatorische Nischen zu besetzen.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, sollte man in einem Umkehrexperiment, zu der monoklonalen, transduzierten OT-I Population, verschiedene Populationen polyklonaler T-Zellen kotransplantieren. Höhere Anteile polyklonaler T-Zellen sollten vermehrt

stimulatorische Nischen besetzen, und verstärkt in der Lage sein das Auswachsen prämaligener Klone zu kontrollieren.

Dem widersprechend wurde aber beschrieben, dass aktivierte/Gedächtnis-T-Zellen nicht auf die MHC-TCR Überlebenssignale angewiesen sind und ihre Proliferation im Wesentlichen über Zytokine kontrollieren [116;227;228]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass nach einer Ablation des TCR, also der Unterbindung des MHC-TCR Signals naive und Gedächtnis-T-Zellen verschwinden [229;230].

Sowohl im polyklonalen, als auch im monoklonalen Versuchsansatz wurden reine T-Lymphozyten transplantiert (siehe Abbildung 34A). Die Unterschiede bei mono- und polyklonalen T-Zellen lassen sich also nicht durch die Anwesenheit anderer Zellpopulationen im Transplantat (NK-, B-Zellen) erklären. Anzunehmen wäre nun auch, dass OT-I T-Lymphozyten intrinsisch ein bislang unentdecktes erhöhtes Transformationspotential haben. Des Weiteren könnte der OT-I TCR durch eine hohe MHC-Affinität besonders aktiv sein und dadurch eine Malignisierung unterstützen. Für eine hohe Affinität des OT-I TCR gibt es in der Literatur Hinweise [226;122]. Es sollten in nachfolgenden Arbeiten verschiedene TCR-transgene, monoklonale T-Zell Populationen (pmel-1 [231], P14 [232], OT-II [233], etc.) für die Transduktion eingesetzt werden und weitere Onkogene in diesem monoklonalen Szenario analysiert werden (LMO2, TCL1, NPM/ALK oder tax von HTLV-I).

Eine Kontrolle durch polyklonale T-Zellen wäre aber auch über andere Kontrollmechanismen denkbar. So könnten T_{regs} das Auswachsen von prämaligen Klonen unterdrücken. Hier ist aber nicht klar, wie T_{regs} zwischen malignen und normalen Klonen unterscheiden könnten. Weiterhin wäre möglich, dass das Immunsystem (verschiedene TCR) leukämische Antigene in prämaligen Klonen erkennt und diese spezifisch eliminiert. In der Stammzell-transplantierten Maus wäre das Tier gegen diese Antigene tolerant, daher entwickelte sie Leukämien und Lymphome. Die mit monoklonalen T-Zellen transplantierte Maus war jedoch immun-inkompetent, und nicht dazu in der Lage eine Neoplasie immunologisch zu kontrollieren. Gegen diese Hypothese der Toleranz spricht allerdings, dass GFP mit dem Onkogen in allen Versuchen koexprimiert wurde. Wie bereits erwähnt (siehe 5.2) wurde in den Onkogen-exprimierenden T-Zell-Mäusen über den gesamten Beobachtungszeitraum GFP stabil, auf einem hohen Niveau in den peripheren T-Lymphozyten der Mäuse exprimiert. Eine spezifische Immunkontrolle, über leukämische Antigene reifer T-Zell-Leukämien/Lymphome scheint somit in diesem Modell unwahrscheinlich, sollte aber überprüft werden.

5.5 In vitro Immortalisierung polyklonaler, reifer T-Zellen

In vitro konnten reife T-Zellen durch den gammaretroviralen Gentransfer eines Onkogens immortalisiert werden. Nach gammaretroviraler Transduktion mit LMO2 wurde nach einigen Wochen der Kultivierung eine Population immortalisierter Zellen generiert. Es handelte sich um eine monoklonale, reife T-Zell Population, die jedoch im Laufe der Kultivierung die T-Zell Marker CD4 und/oder CD8 nicht mehr exprimierte (Abbildung 37A). Deshalb wurde für diese Population ein Markerprofil erstellt. Dass es sich um einen kontaminierenden, anderen Zelltyp handelte, konnte ausgeschlossen werden (Abbildung 37B). Und die Analyse der TCR β -Kette erwies, dass die Population von einer reifen T-Zelle abstammte (Abbildung 39B+C). Der Verlust der T-Zell Marker CD4 und/oder CD8 könnte ein Hinweis auf eine Rückdifferenzierung der betroffenen Zellen sein. Für reife lymphoide Zellen ist bereits bekannt, dass sie im Zuge einer Malignisierung die Expression Zell-spezifischer Gene herunterregulieren [187]. Der fehlenden Markerexpression könnte aber auch die extrem lange Kultivierung zugrunde liegen. Die Zellen wuchsen in sehr starker Abhängigkeit von IL-2. Wie Abbildung 40 zeigt, waren in der Kultur selbst bei sehr hohen Mengen an IL-2 (400U/ml) viele apoptotische Zellen zu detektieren. Aber durch die wahrscheinlich Insertionsbedingte, hohe Expression der IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25), war die immortalisierte Population dennoch frisch stimulierten, kokultivierten T-Zellen überlegen (Abbildung 41). Die immortalisierten Zellen konnten vermutlich die zugesetzten IL-2-Ressourcen besser nutzen und verdrängten dadurch die nicht-manipulierten Zellen. Ähnlich wie bei der monoklonalen Situation, spielten *in vitro* die Kontrollmechanismen über MHC-TCR keine Rolle. In der Kultur wuchsen also die Zellen am besten, die einen Wachstumsvorteil aufwiesen. Dass die Zellen nach Transplantation, *in vivo* nicht überlebensfähig waren, wies auf eine Immortalisierung hin und dokumentierte dass die Zellen nicht voll transformiert waren.

Eine nach gammaretroviralen Gentransfer generierte T-Zell Immortalisierung durch Insertionsmutagenese wurde noch nicht beschrieben. Bislang konnte durch den retroviralen Transfer des IL-15 Gens ein Zytokin-unabhängiges Wachstum von reifen T-Zellen induziert werden [234]. Und außerdem wurde durch retrovirale Transduktion des anti-apoptischen Gens Bcl-2 eine verlängerte *in vivo* Persistenz reifer, Tumor-spezifischer T-Zellen induziert [235].

5.6 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann man sagen, dass auch unter extremen Bedingungen mit Onkogen-Transduktion und multipler, zufälliger Vektorintegration polyklonale, reife T-Zell Populationen nicht zu transformieren waren. Somit lässt sich auf eine hohe Sicherheit für polyklonale T-Zell Therapien schließen, die auf Transgenen basieren, welche keinen proliferativen Vorteil verleihen. Beispiele hierfür sind Suizid-Gene wie die Herpes-Simplex-Kinase [106] oder anti-HIV Gene [101]. Die in dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass diese kein erhöhtes Risiko für eine durch Insertionsmutagenese bedingte Krebsentwicklung bieten. Die Sicherheit der Transduktion von oligoklonalen Populationen mit neutralen Transgenen, wie z.B. dem TCR, muss jedoch genauer evaluiert werden. Wie das in dieser Arbeit vorgestellte Beispiel der monoklonalen OT-I Zellen gezeigt hat, spielen die populationsdynamischen Abläufe eine entscheidende Rolle bei der Transformation. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, warum sich reifzellige T-Zell Leukämien/Lymphome hauptsächlich erst im höheren Alter, mit dem Sinken des T-Zell Repertoires entwickeln.

Außerdem weisen die gewonnenen Erkenntnisse darauf hin, dass selbst reifzellige T-Zell Leukämien/Lymphome, die im Menschen durch Gene wie TCL1 induziert werden, eventuell auf transformierte T-Vorläuferzellen zurückzuführen sind und nicht auf reife T-Zellen. Dies bleibt jedoch, vor dem Hintergrund der monoklonalen T-Zellen noch zu beweisen. Ganz generell ist hier zum ersten Mal die Transformierbarkeit reifer T-Zellen gezeigt worden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Hallek, M., et al.,** [*Basis of gene therapy: principles and state of development*]. Internist (Berl), 2001. **42**(10): p. 1306-8, 1311-3.
2. **Sambrook, J., et al.,** *The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **60**(4): p. 1288-95.
3. **Hill, M. and J. Hillova,** *Virus recovery in chicken cells tested with Rous sarcoma cell DNA.* Nat New Biol, 1972. **237**(71): p. 35-9.
4. **Topp, W.C., D.B. Rifkin, and M.J. Sleight,** *SV40 mutants with an altered small-t protein are tumorigenic in newborn hamsters.* Virology, 1981. **111**(2): p. 341-50.
5. **Terheggen, H.G., et al.,** *Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency.* Z Kinderheilkd, 1975. **119**(1): p. 1-3.
6. **Kantoff, P.W., et al.,** *Correction of adenosine deaminase deficiency in cultured human T and B cells by retrovirus-mediated gene transfer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6563-7.
7. **Drumm, M.L., et al.,** *Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer.* Cell, 1990. **62**(6): p. 1227-33.
8. **Fink, J.K., et al.,** *Correction of glucocerebrosidase deficiency after retroviral-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells from patients with Gaucher disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(6): p. 2334-8.
9. **Partridge, T.A.,** *Gene therapy. Muscle transfection made easy.* Nature, 1991. **352**(6338): p. 757-8.
10. **Thompson, A.R., et al.,** *Gene transfer as an approach to cure patients with hemophilia A or B.* Curr Stud Hematol Blood Transfus, 1991(58): p. 59-62.
11. **Hacein-Bey, S., et al.,** [*Gene therapy of X-linked severe combined immunologic deficiency (SCID-X1)*]. Pathol Biol (Paris), 2001. **49**(1): p. 57-66.
12. **Ott, M.G., et al.,** *Mobilization and transduction of CD34(+) peripheral blood stem cells in patients with X-linked chronic granulomatous disease.* J Hematother Stem Cell Res, 2002. **11**(4): p. 683-94.
13. **Friedmann, T.,** *Progress toward human gene therapy.* Science, 1989. **244**(4910): p. 1275-81.
14. **Miller, A.D.,** *Human gene therapy comes of age.* Nature, 1992. **357**(6378): p. 455-60.
15. **Anderson, W.F.,** *Human gene therapy.* Science, 1992. **256**(5058): p. 808-13.
16. **Weinhold, M., et al.,** *Dual T cell receptor expressing CD8+ T cells with tumor- and self-specificity can inhibit tumor growth without causing severe autoimmunity.* J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5534-42.

17. **Kessels, H.W., et al.,** *Immunotherapy through TCR gene transfer.* Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 957-61.
18. **Chamoto, K., et al.,** *Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells.* Cancer Res, 2004. **64**(1): p. 386-90.
19. **Morgan, R.A., et al.,** *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.* Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
20. **Bonini, C., et al.,** *HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia.* Science, 1997. **276**(5319): p. 1719-24.
21. **Maze, R., H. Hanenberg, and D.A. Williams,** *Establishing chemoresistance in hematopoietic progenitor cells.* Mol Med Today, 1997. **3**(8): p. 350-8.
22. **Coffin, J.M.,** *Retroviridae: the viruses and their replication.* In: *Fields Virology* (B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds.), pp. 763-844. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996.
23. **Cann, A.J.,** *Principles of molecular virology.* Academic Press, London, 1993.
24. **Ding, L., S. Lu, and N.C. Munshi,** *In vitro packaging of an infectious recombinant adeno-associated virus 2.* Gene Ther, 1997. **4**(11): p. 1167-72.
25. **Lee, M.G., E.J. Kremer, and M. Perricaudet,** *Adenoviral vectors.* Mol Cell Biol Hum Dis Ser, 1995. **5**: p. 20-32.
26. **Yang, Y., et al.,** *Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4407-11.
27. **Anderson, W.F., G.J. McGarrity, and R.C. Moen,** *Report to the NIH Recombinant DNA Advisory Committee on murine replication-competent retrovirus (RCR) assays (February 17, 1993).* Hum Gene Ther, 1993. **4**(3): p. 311-21.
28. **Hodgson, C.P.,** *The vector void in gene therapy.* Biotechnology (N Y), 1995. **13**(3): p. 222-5.
29. **Verma, I.M. and N. Somia,** *Gene therapy -- promises, problems and prospects.* Nature, 1997. **389**(6648): p. 239-42.
30. **Rous, P.,** *Landmark article (JAMA 1911;56:198). Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. By Peyton Rous.* Jama, 1983. **250**(11): p. 1445-9.
31. **Bittner, J.J.,** *Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice.* Science, 1936. **84**(2172): p. 162.
32. **Poiesz, B.J., et al.,** *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
33. **Gallo, R.C., et al.,** *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 1983. **220**(4599): p. 865-7.

34. **Barre-Sinoussi, F., et al.,** *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
35. **Miller, A.D. and G.J. Rosman,** *Improved retroviral vectors for gene transfer and expression.* Biotechniques, 1989. **7**(9): p. 980-2, 984-6, 989-90.
36. **Naldini, L.,** *Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells.* Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(5): p. 457-63.
37. **Blaese, R.M., et al.,** *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years.* Science, 1995. **270**(5235): p. 475-80.
38. **Weiss, R.,** *Viral RNA-dependent DNA polymerase RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.* Rev Med Virol, 1998. **8**(1): p. 3-11.
39. **Jones, I.M. and Y. Morikawa,** *The molecular basis of HIV capsid assembly.* Rev Med Virol, 1998. **8**(2): p. 87-95.
40. **Palu, G., et al.,** *Progress with retroviral gene vectors.* Rev Med Virol, 2000. **10**(3): p. 185-202.
41. **Bukrinsky, M.I., et al.,** *Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6580-4.
42. **Roe, T., et al.,** *Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis.* Embo J, 1993. **12**(5): p. 2099-108.
43. **Lewis, P.F. and M. Emerman,** *Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus.* J Virol, 1994. **68**(1): p. 510-6.
44. **Watanabe, S. and H.M. Temin,** *Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(19): p. 5986-90.
45. **Mann, R., R.C. Mulligan, and D. Baltimore,** *Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus.* Cell, 1983. **33**(1): p. 153-9.
46. **Katz, R.A., R.W. Terry, and A.M. Skalka,** *A conserved cis-acting sequence in the 5' leader of avian sarcoma virus RNA is required for packaging.* J Virol, 1986. **59**(1): p. 163-7.
47. **Roth, M.J., P.L. Schwartzberg, and S.P. Goff,** *Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: dependence on IN function and terminal DNA sequence.* Cell, 1989. **58**(1): p. 47-54.
48. **Colicelli, J. and S.P. Goff,** *Mutants and pseudorevertants of Moloney murine leukemia virus with alterations at the integration site.* Cell, 1985. **42**(2): p. 573-80.
49. **Brown, P.O., et al.,** *Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2525-9.

50. **Katzman, M., et al.,** *The avian retroviral integration protein cleaves the terminal sequences of linear viral DNA at the in vivo sites of integration.* J Virol, 1989. **63**(12): p. 5319-27.
51. **Sherman, P.A. and J.A. Fyfe,** *Human immunodeficiency virus integration protein expressed in Escherichia coli possesses selective DNA cleaving activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5119-23.
52. **Craigie, R., T. Fujiwara, and F. Bushman,** *The IN protein of Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration in vitro.* Cell, 1990. **62**(4): p. 829-37.
53. **Katz, R.A., et al.,** *The avian retroviral IN protein is both necessary and sufficient for integrative recombination in vitro.* Cell, 1990. **63**(1): p. 87-95.
54. **Bor, Y.C., et al.,** *Target-sequence preferences of HIV-1 integration complexes in vitro.* Virology, 1996. **222**(1): p. 283-8.
55. **Schmidt, M., et al.,** *Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples.* Hum Gene Ther, 2001. **12**(7): p. 743-9.
56. **Schmidt, M., et al.,** *High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR).* Nat Methods, 2007. **4**(12): p. 1051-7.
57. **Ochman, H., A.S. Gerber, and D.L. Hartl,** *Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction.* Genetics, 1988. **120**(3): p. 621-3.
58. **Schroder, A.R., et al.,** *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots.* Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
59. **Wu, X., et al.,** *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration.* Science, 2003. **300**(5626): p. 1749-51.
60. **Wu, X. and S.M. Burgess,** *Integration target site selection for retroviruses and transposable elements.* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2588-96.
61. **Bor, Y.C., F.D. Bushman, and L.E. Orgel,** *In vitro integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA into targets containing protein-induced bends.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10334-8.
62. **Muller, H.P. and H.E. Varmus,** *DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes.* Embo J, 1994. **13**(19): p. 4704-14.
63. **Lund, A.H., et al.,** *Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice.* Nat Genet, 2002. **32**(1): p. 160-5.
64. **Kim, R., et al.,** *Genome-based identification of cancer genes by proviral tagging in mouse retrovirus-induced T-cell lymphomas.* J Virol, 2003. **77**(3): p. 2056-62.
65. **Suzuki, T., et al.,** *New genes involved in cancer identified by retroviral tagging.* Nat Genet, 2002. **32**(1): p. 166-74.

66. **Akagi, K., et al.,** *RTCGD: retroviral tagged cancer gene database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D523-7.
67. **Miller, A.D., et al.,** *Use of retroviral vectors for gene transfer and expression*. Methods Enzymol, 1993. **217**: p. 581-99.
68. **Yu, S.F., et al.,** *Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3194-8.
69. **Schambach, A., et al.,** *Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells*. Mol Ther, 2006. **13**(2): p. 391-400.
70. **Naldini, L., et al.,** *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
71. **Kumar, M., et al.,** *Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(15): p. 1893-905.
72. **Kaplan, A.H. and R. Swanstrom,** *Human immunodeficiency virus type 1 Gag proteins are processed in two cellular compartments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4528-32.
73. **Farson, D., et al.,** *A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(8): p. 981-97.
74. **Klages, N., R. Zufferey, and D. Trono,** *A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors*. Mol Ther, 2000. **2**(2): p. 170-6.
75. **Sparacio, S., et al.,** *Generation of a flexible cell line with regulatable, high-level expression of HIV Gag/Pol particles capable of packaging HIV-derived vectors*. Mol Ther, 2001. **3**(4): p. 602-12.
76. **Levine, B.L., et al.,** *Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17372-7.
77. **Connolly, J.B.,** *Lentiviruses in gene therapy clinical research*. Gene Ther, 2002. **9**(24): p. 1730-4.
78. **Orkin, S.H.,** *Development of the hematopoietic system*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(5): p. 597-602.
79. **Silver, L. and J. Palis,** *Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1154-64.
80. **Lasky, L.A.,** *Hematopoiesis: wandering progenitor cells*. Curr Biol, 1996. **6**(10): p. 1238-40.
81. **Socolovsky, M., et al.,** *Cytokines in hematopoiesis: specificity and redundancy in receptor function*. Adv Protein Chem, 1998. **52**: p. 141-98.
82. **Socolovsky, M., H.F. Lodish, and G.Q. Daley,** *Control of hematopoietic differentiation: lack of specificity in signaling by cytokine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6573-5.

83. **Metcalf, AlphaMed Press, Chapter Three: Hematopoietic Subpopulations, Their Detection and Regulation, Fig. 3.2** (<http://www.bloodlines.stemcells.com/chapters.html>). 2007.
84. **Abkowitz, J.L., et al., Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals.** *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2665-7.
85. **Thomas, E.D., et al., Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy.** *N Engl J Med*, 1957. **257**(11): p. 491-6.
86. **Thomas, E.D., Bone marrow transplantation: a review.** *Semin Hematol*, 1999. **36**(4 Suppl 7): p. 95-103.
87. **Williams, D.A., et al., Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse.** *Nature*, 1984. **310**(5977): p. 476-80.
88. **Kohn, D.B., Gene therapy for hematopoietic and immune disorders.** *Bone Marrow Transplant*, 1996. **18 Suppl 3**: p. S55-8.
89. **Dunbar, C.E., Gene transfer to hematopoietic stem cells: implications for gene therapy of human disease.** *Annu Rev Med*, 1996. **47**: p. 11-20.
90. **Dirksen, U., et al., Fanconi anemia and beta c deficiency-associated pulmonary alveolar proteinosis as two hereditary diseases of childhood which are potentially curable by stem cell gene therapy but require different therapeutic approaches.** *Klin Padiatr*, 1999. **211**(4): p. 329-35.
91. **Ferrari, G., et al., An in vivo model of somatic cell gene therapy for human severe combined immunodeficiency.** *Science*, 1991. **251**(4999): p. 1363-6.
92. **Kohn, D.B. and N. Sarver, Gene therapy for HIV-1 infection.** *Adv Exp Med Biol*, 1996. **394**: p. 421-8.
93. **Fehse, B., et al., Highly-efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin.** *Br J Haematol*, 1998. **102**(2): p. 566-74.
94. **Walker, R.E., et al., Peripheral expansion of pre-existing mature T cells is an important means of CD4+ T-cell regeneration HIV-infected adults.** *Nat Med*, 1998. **4**(7): p. 852-6.
95. **Ranga, U., et al., Enhanced T cell engraftment after retroviral delivery of an antiviral gene in HIV-infected individuals.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(3): p. 1201-6.
96. **Walker, R.E., et al., Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection.** *Blood*, 2000. **96**(2): p. 467-74.
97. **Mitsuyasu, R.T., et al., Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects.** *Blood*, 2000. **96**(3): p. 785-93.
98. **Brodie, S.J., et al., HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death.** *J Clin Invest*, 2000. **105**(10): p. 1407-17.

99. **Deeks, S.G., et al.,** *A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy.* Mol Ther, 2002. **5**(6): p. 788-97.
100. **Morgan, R.A., et al.,** *Preferential survival of CD4+ T lymphocytes engineered with anti-human immunodeficiency virus (HIV) genes in HIV-infected individuals.* Hum Gene Ther, 2005. **16**(9): p. 1065-74.
101. **van Lunzen, J., et al.,** *Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus.* Mol Ther, 2007. **15**(5): p. 1024-33.
102. **Bordignon, C., et al.,** *Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients.* Science, 1995. **270**(5235): p. 470-5.
103. **Onodera, M., et al.,** *Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency.* Blood, 1998. **91**(1): p. 30-6.
104. **Economou, J.S., et al.,** *In vivo trafficking of adoptively transferred interleukin-2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes. Results of a double gene marking trial.* J Clin Invest, 1996. **97**(2): p. 515-21.
105. **Tiberghien, P., et al.,** *Use of donor T-lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase in allogeneic bone marrow transplantation: a phase I-II study.* Hum Gene Ther, 1997. **8**(5): p. 615-24.
106. **Tiberghien, P., et al.,** *Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft.* Blood, 2001. **97**(1): p. 63-72.
107. **Traversari, C., et al.,** *The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies.* Blood, 2007. **109**(11): p. 4708-15.
108. **Matzinger, P. and S. Guerder,** *Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?* Nature, 1989. **338**(6210): p. 74-6.
109. **Schatz, D.G., M.A. Oettinger, and D. Baltimore,** *The V(D)J recombination activating gene, RAG-1.* Cell, 1989. **59**(6): p. 1035-48.
110. **Shinkai, Y., et al.,** *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement.* Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
111. **Kappler, J.W., N. Roehm, and P. Marrack,** *T cell tolerance by clonal elimination in the thymus.* Cell, 1987. **49**(2): p. 273-80.
112. **Germain, R.N.,** *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
113. **Robey, E. and B.J. Fowlkes,** *Selective events in T cell development.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 675-705.

114. **Hare, K.J., E.J. Jenkinson, and G. Anderson,** *An essential role for the IL-7 receptor during intrathymic expansion of the positively selected neonatal T cell repertoire.* J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2410-4.
115. **Stockinger, B., G. Kassiotis, and C. Bourgeois,** *Homeostasis and T cell regulation.* Curr Opin Immunol, 2004. **16**(6): p. 775-9.
116. **Jameson, S.C.,** *Maintaining the norm: T-cell homeostasis.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 547-56.
117. **Murali-Krishna, K., et al.,** *Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection.* Immunity, 1998. **8**(2): p. 177-87.
118. **Blattman, J.N., et al.,** *Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells.* J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 657-64.
119. **Marrack, P., et al.,** *Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells.* Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 107-11.
120. **Tan, J.T., et al.,** *Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells.* J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1523-32.
121. **Kassiotis, G., R. Zamoyka, and B. Stockinger,** *Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells.* J Exp Med, 2003. **197**(8): p. 1007-16.
122. **Kieper, W.C., J.T. Burghardt, and C.D. Surh,** *A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis.* J Immunol, 2004. **172**(1): p. 40-4.
123. **Min, B. and W.E. Paul,** *Endogenous proliferation: burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings.* Semin Immunol, 2005. **17**(3): p. 201-7.
124. **Troy, A.E. and H. Shen,** *Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition.* J Immunol, 2003. **170**(2): p. 672-6.
125. **Wong, S. and O.N. Witte,** *Modeling Philadelphia chromosome positive leukemias.* Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5644-59.
126. **MacKenzie, K.L., et al.,** *Mutant N-ras induces myeloproliferative disorders and apoptosis in bone marrow repopulated mice.* Blood, 1999. **93**(6): p. 2043-56.
127. **Traver, D., et al.,** *Mice defective in two apoptosis pathways in the myeloid lineage develop acute myeloblastic leukemia.* Immunity, 1998. **9**(1): p. 47-57.
128. **Louz, D., et al.,** *Erythroid defects and increased retrovirally-induced tumor formation in Evi1 transgenic mice.* Leukemia, 2000. **14**(11): p. 1876-84.
129. **Meyer, J., et al.,** *Remarkable leukemogenic potency and quality of a constitutively active neurotrophin receptor, deltaTrkA.* Leukemia, 2007. **21**(10): p. 2171-80.
130. **Holtzschke, T., et al.,** *Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene.* Cell, 1996. **87**(2): p. 307-17.

131. **Bartholomew, C. and J.N. Ihle**, *Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the Evi-1 myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(4): p. 1820-8.
132. **Joosten, M., et al.**, *Large-scale identification of novel potential disease loci in mouse leukemia applying an improved strategy for cloning common virus integration sites*. Oncogene, 2002. **21**(47): p. 7247-55.
133. **Endicott KM, G.H.**, *Hemograms and myelograms of healthy female mice C-57 brown and CFW strains*. Blood, 1947. **1:165-167**.
134. **Perkins, A.S.**, *The pathology of murine myelogenous leukemias*. Curr Top Microbiol Immunol, 1989. **149**: p. 3-21.
135. **Vannucchi, A.M., et al.**, *Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2559-68.
136. **Kogan, S.C., et al.**, *Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice*. Blood, 2002. **100**(1): p. 238-45.
137. **Hahn, W.C. and R.A. Weinberg**, *Modelling the molecular circuitry of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 331-41.
138. **Bunting, K.D., et al.**, *Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2269-79.
139. **Gong, J.K., P.G. Braunschweiger, and C.A. Glomski**, *Anemic stress as a trigger of myelogenous leukemia in the unirradiated RF mouse*. Science, 1972. **177**(45): p. 274-6.
140. **Holyoake, T.L., et al.**, *In vivo expansion of the endogenous B-cell compartment stimulated by radiation and serial bone marrow transplantation induces B-cell leukaemia in mice*. Br J Haematol, 2001. **114**(1): p. 49-56.
141. **Traggiai, E., et al.**, *Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice*. Science, 2004. **304**(5667): p. 104-7.
142. **Donahue, R.E. and C.E. Dunbar**, *Update on the use of nonhuman primate models for preclinical testing of gene therapy approaches targeting hematopoietic cells*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(6): p. 607-17.
143. **Puck, J.M.**, *IL2RGbase: a database of gamma c-chain defects causing human X-SCID*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 507-11.
144. **McCormack, M.P. and T.H. Rabbitts**, *Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency*. N Engl J Med, 2004. **350**(9): p. 913-22.
145. **Hacein-Bey-Abina, S., et al.**, *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science, 2003. **302**(5644): p. 415-9.

146. **Hacein-Bey-Abina, S., et al.,** *A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency.* N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 255-6.
147. **Cole, A.,** *Child in gene therapy programme develops leukaemia.* Bmj, 2008. **336**(7634): p. 13.
148. **Li, Z., et al.,** *Murine leukemia induced by retroviral gene marking.* Science, 2002. **296**(5567): p. 497.
149. **Ott, M.G., et al.,** *Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1.* Nat Med, 2006. **12**(4): p. 401-9.
150. **Baum, C., et al.,** *Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells.* Blood, 2003. **101**(6): p. 2099-114.
151. **Dave, U.P., N.A. Jenkins, and N.G. Copeland,** *Gene therapy insertional mutagenesis insights.* Science, 2004. **303**(5656): p. 333.
152. **Woods, N.B., et al.,** *Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma.* Nature, 2006. **440**(7088): p. 1123.
153. **Look, A.T.,** *Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias.* Science, 1997. **278**(5340): p. 1059-64.
154. **Marshall, C.J.,** *Tumor suppressor genes.* Cell, 1991. **64**(2): p. 313-26.
155. **Rabbitts, T.H.,** *Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias.* Cell, 1991. **67**(4): p. 641-4.
156. **Rabbitts, T.H.,** *Chromosomal translocations in human cancer.* Nature, 1994. **372**(6502): p. 143-9.
157. **Korsmeyer, S.J.,** *Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes.* Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 785-807.
158. **Sanchez-Garcia, I.,** *Consequences of chromosomal abnormalities in tumor development.* Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 429-53.
159. **Richardson, C., M.E. Moynahan, and M. Jasin,** *Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations.* Genes Dev, 1998. **12**(24): p. 3831-42.
160. **Mitani, K.,** *Chromosomal abnormalities and oncogenes.* Int J Hematol, 1996. **63**(2): p. 81-93.
161. **Uckun, F.M., et al.,** *Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia.* Blood, 1998. **91**(3): p. 735-46.
162. **Grabher, C., H. von Boehmer, and A.T. Look,** *Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 347-59.

163. **Garcia, I.S., et al.,** *A study of chromosome 11p13 translocations involving TCR beta and TCR delta in human T cell leukaemia.* *Oncogene*, 1991. **6**(4): p. 577-82.
164. **Rabbitts, T.H.,** *LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes.* *Genes Dev*, 1998. **12**(17): p. 2651-7.
165. **Grutz, G.G., et al.,** *The oncogenic T cell LIM-protein Lmo2 forms part of a DNA-binding complex specifically in immature T cells.* *Embo J*, 1998. **17**(16): p. 4594-605.
166. **Fisch, P., et al.,** *T-cell acute lymphoblastic lymphoma induced in transgenic mice by the RBTN1 and RBTN2 LIM-domain genes.* *Oncogene*, 1992. **7**(12): p. 2389-97.
167. **Larson, R.C., et al.,** *T cell tumours of disparate phenotype in mice transgenic for Rbtn-2.* *Oncogene*, 1994. **9**(12): p. 3675-81.
168. **Larson, R.C., et al.,** *The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice.* *Oncogene*, 1995. **11**(5): p. 853-62.
169. **Neale, G.A., J.E. Rehg, and R.M. Goorha,** *Disruption of T-cell differentiation precedes T-cell tumor formation in LMO-2 (rhombotin-2) transgenic mice.* *Leukemia*, 1997. **11 Suppl 3**: p. 289-90.
170. **Neale, G.A., J.E. Rehg, and R.M. Goorha,** *Ectopic expression of rhombotin-2 causes selective expansion of CD4-CD8- lymphocytes in the thymus and T-cell tumors in transgenic mice.* *Blood*, 1995. **86**(8): p. 3060-71.
171. **Reuther, G.W., et al.,** *Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia.* *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(23): p. 8655-66.
172. **Ravandi, F., et al.,** *Mature T-cell leukemias.* *Cancer*, 2005. **104**(9): p. 1808-18.
173. **Teitell, M.A.,** *The TCL1 family of oncoproteins: co-activators of transformation.* *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(8): p. 640-8.
174. **Virgilio, L., et al.,** *Deregulated expression of TCL1 causes T cell leukemia in mice.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3885-9.
175. **Pekarsky, Y., C. Hallas, and C.M. Croce,** *Molecular basis of mature T-cell leukemia.* *Jama*, 2001. **286**(18): p. 2308-14.
176. **Jeang, K.T., et al.,** *Life, death, and tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation.* *J Biol Chem*, 2004. **279**(31): p. 31991-4.
177. **Yoshida, M.,** *Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control.* *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 475-96.
178. **Hasegawa, H., et al.,** *Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I.* *Nat Med*, 2006. **12**(4): p. 466-72.
179. **Ohsumi, T., et al.,** *The Tax protein of HTLV-1 promotes oncogenesis in not only immature T cells but also mature T cells.* *Nat Med*, 2007. **13**(5): p. 527-8.

180. **Warner, J.K., et al.,** *Concepts of human leukemic development.* Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7164-77.
181. **Singh, S.K., et al.,** *Identification of human brain tumour initiating cells.* Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
182. **Passegue, E., et al.,** *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11842-9.
183. **Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch,** *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay.* J Natl Cancer Inst, 1971. **46**(2): p. 411-22.
184. **Bruce, W.R. and H. Van Der Gaag,** *A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo.* Nature, 1963. **199**: p. 79-80.
185. **Wodinsky, I., J. Swiniarski, and C.J. Kensler,** *Spleen colony studies of leukemia L1210. 3. Differential sensitivities of normal hematopoietic and resistant L1210 colony-forming cells to 6-mercaptopurine (NSC-755).* Cancer Chemother Rep, 1968. **52**(2): p. 251-5.
186. **Krivtsov, A.V., et al.,** *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9.* Nature, 2006. **442**(7104): p. 818-22.
187. **Mathas, S., et al.,** *Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma.* Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 207-15.
188. **Surh, C.D. and J. Sprent,** *Regulation of mature T cell homeostasis.* Semin Immunol, 2005. **17**(3): p. 183-91.
189. **Stitz, J., et al.,** *Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1.* Virology, 2000. **273**(1): p. 16-20.
190. **Pear, W.S., et al.,** *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8392-6.
191. **Hartley, J.W. and W.P. Rowe,** *Clonal cells lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses.* Virology, 1975. **65**(1): p. 128-34.
192. **Janowska-Wieczorek, A., et al.,** *Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment.* Blood, 2001. **98**(10): p. 3143-9.
193. **Mombaerts, P., et al.,** *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes.* Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
194. **Hogquist, K.A., et al.,** *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection.* Cell, 1994. **76**(1): p. 17-27.
195. **Currier, J.R.a.R.M.A.,** *Spectratype/Immunoscope Analysis of the Expressed TCR Repertoire.* In: Current Protocols in Immunology (Unit 10.28), 2000.

196. **Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson**, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
197. **Mueller, P.R. and B. Wold**, *In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR*. Science, 1989. **246**(4931): p. 780-6.
198. **Ye, J., S. McGinnis, and T.L. Madden**, *BLAST: improvements for better sequence analysis*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W6-9.
199. **Bahnemann, R., et al.**, *RITA--registry of industrial toxicology animal-data--guides for organ sampling and trimming procedures in rats*. Exp Toxicol Pathol, 1995. **47**(4): p. 247-66.
200. **Fehse, B., et al.**, *Pois(s)on--it's a question of dose*. Gene Ther, 2004. **11**(11): p. 879-81.
201. **Taylor, A.M., et al.**, *Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia*. Blood, 1996. **87**(2): p. 423-38.
202. **Herling, M., et al.**, *TCL1 in B-cell tumors retains its normal b-cell pattern of regulation and is a marker of differentiation stage*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(7): p. 1123-9.
203. **de Ridder, J., et al.**, *Co-occurrence analysis of insertional mutagenesis data reveals cooperating oncogenes*. Bioinformatics, 2007. **23**(13): p. i133-41.
204. **Stripecke, R., et al.**, *Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy*. Gene Ther, 1999. **6**(7): p. 1305-12.
205. **Skelton, D., N. Satake, and D.B. Kohn**, *The enhanced green fluorescent protein (eGFP) is minimally immunogenic in C57BL/6 mice*. Gene Ther, 2001. **8**(23): p. 1813-4.
206. **Greider, C.W.**, *Telomerase activity, cell proliferation, and cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 90-2.
207. **Weng, N.P., et al.**, *Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2471-9.
208. **Hiyama, K., et al.**, *Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3711-5.
209. **Zhou, J., et al.**, *Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 7046-52.
210. **Drynan, L.F., T.L. Hamilton, and T.H. Rabbitts**, *T cell tumorigenesis in Lmo2 transgenic mice is independent of V-D-J recombinase activity*. Oncogene, 2001. **20**(32): p. 4412-5.
211. **Markt, S., et al.**, *Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1290-8.

212. **Verhoeyen, E., et al.,** *IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes.* Blood, 2003. **101**(6): p. 2167-74.
213. **Cavaliere, S., et al.,** *Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence.* Blood, 2003. **102**(2): p. 497-505.
214. **Lum, L.G., et al.,** *Immune modulation in cancer patients after adoptive transfer of anti-CD3/anti-CD28-costimulated T cells-phase I clinical trial.* J Immunother (1997), 2001. **24**(5): p. 408-19.
215. **Levine, B.L., et al.,** *Adoptive transfer of costimulated CD4+ T cells induces expansion of peripheral T cells and decreased CCR5 expression in HIV infection.* Nat Med, 2002. **8**(1): p. 47-53.
216. **Garlie, N.K., et al.,** *T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer.* J Immunother (1997), 1999. **22**(4): p. 336-45.
217. **Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky,** *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice.* Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 191-7.
218. **Guidos, C.J., et al.,** *Development of CD4+CD8+ thymocytes in RAG-deficient mice through a T cell receptor beta chain-independent pathway.* J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 1187-95.
219. **Zuniga-Pflucker, J.C., et al.,** *Sublethal gamma-radiation induces differentiation of CD4-/CD8- into CD4+/CD8+ thymocytes without T cell receptor beta rearrangement in recombinase activation gene 2-/- mice.* J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1517-21.
220. **Virgilio, L., et al.,** *Chromosome walking on the TCL1 locus involved in T-cell neoplasia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9275-9.
221. **Virgilio, L., et al.,** *Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12530-4.
222. **Kuefer, M.U., et al.,** *Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice.* Blood, 1997. **90**(8): p. 2901-10.
223. **Chiarle, R., et al.,** *NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors.* Blood, 2003. **101**(5): p. 1919-27.
224. **Macchiarini, F., et al.,** *Humanized mice: are we there yet?* J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1307-11.
225. **Clarke, S.R., et al.,** *Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection.* Immunol Cell Biol, 2000. **78**(2): p. 110-7.
226. **Hao, Y., N. Legrand, and A.A. Freitas,** *The clone size of peripheral CD8 T cells is regulated by TCR promiscuity.* J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1643-9.

227. **Seddon, B., P. Tomlinson, and R. Zamoyska,** *Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells.* Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 680-6.
228. **Schluns, K.S. and L. Lefrancois,** *Cytokine control of memory T-cell development and survival.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 269-79.
229. **Labrecque, N., et al.,** *How much TCR does a T cell need?* Immunity, 2001. **15**(1): p. 71-82.
230. **Polic, B., et al.,** *How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8744-9.
231. **Overwijk, W.W., et al.,** *Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells.* J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 569-80.
232. **Pircher, H., et al.,** *Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen.* Nature, 1989. **342**(6249): p. 559-61.
233. **Barnden, M.J., et al.,** *Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements.* Immunol Cell Biol, 1998. **76**(1): p. 34-40.
234. **Hsu, C., et al.,** *Cytokine-independent growth and clonal expansion of a primary human CD8+ T-cell clone following retroviral transduction with the IL-15 gene.* Blood, 2007. **109**(12): p. 5168-77.
235. **Charo, J., et al.,** *Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T-cell survival.* Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 2001-8.

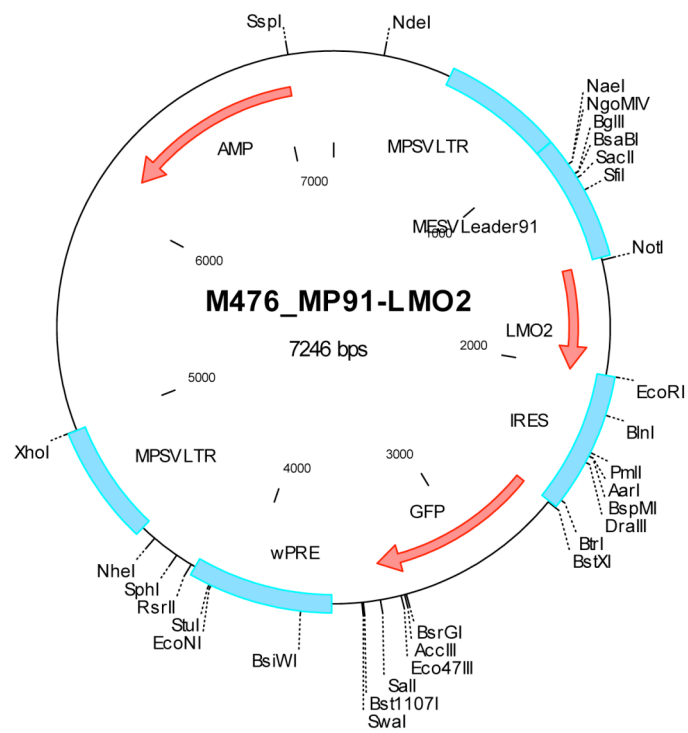
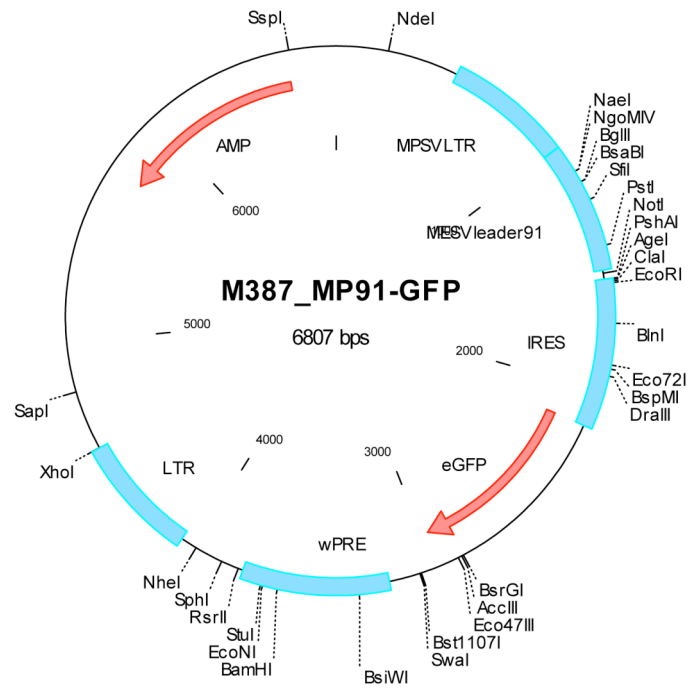
7. Anhang

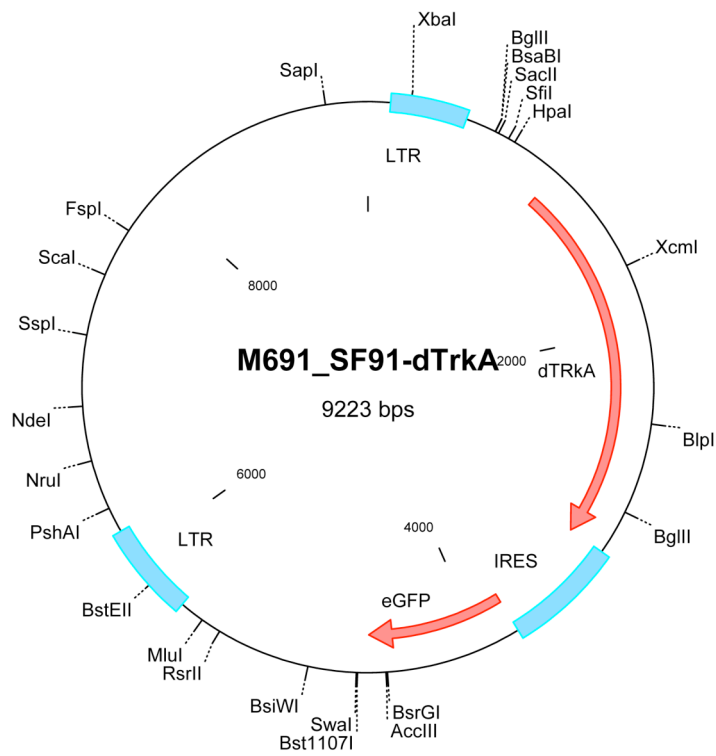
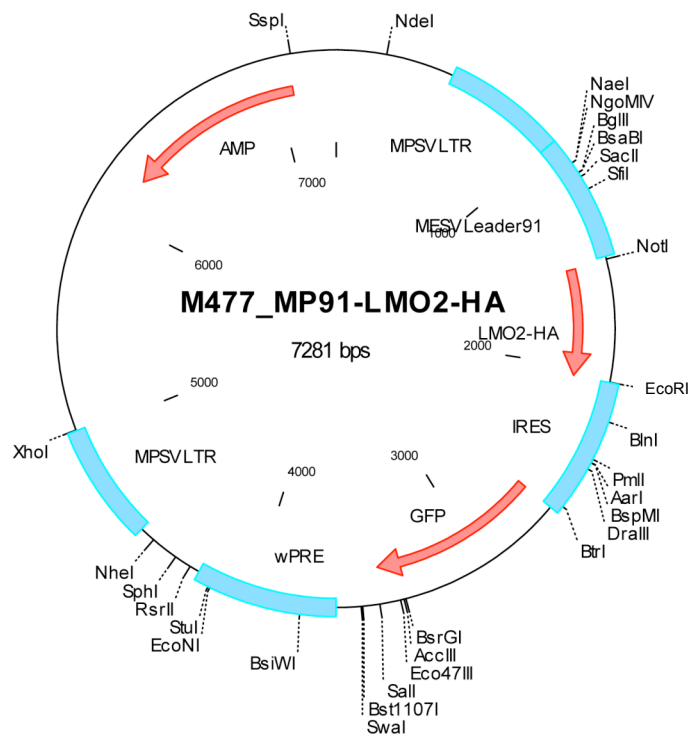
7.1 Abkürzungsverzeichnis

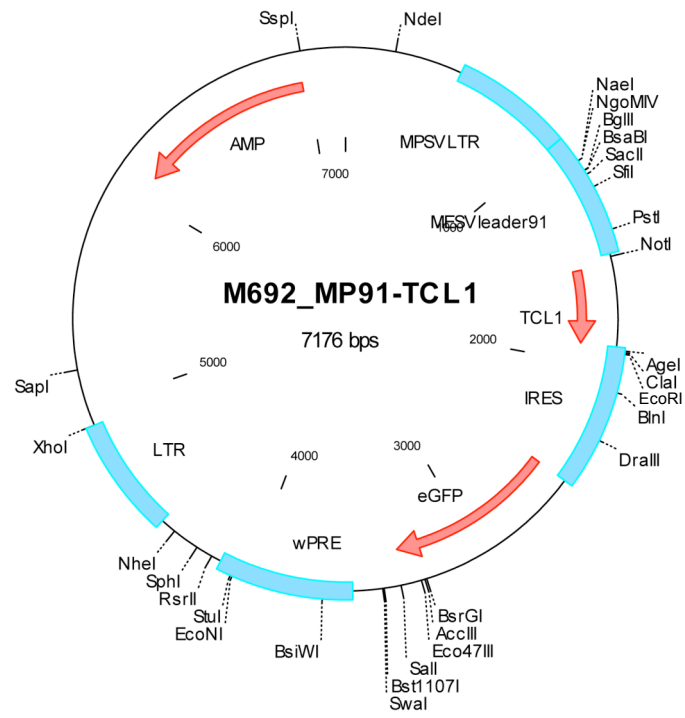
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CIS	Gemeinsame Integrationsstellen (<i>common integration sites</i>)
ddH ₂ O	Autoklaviertes Reinstwasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelnegativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	Doppelpositiv
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env	Hüllprotein (<i>Envelope</i>)
EP	Einfach positiv
EtOH	Alkohol
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Gag	Gruppenspezifische Antigene
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HA	Hämagglutinin
HE	Hämatoxylin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSC/HPC	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen
HTLV-I	<i>Human T-lymphotropic Virus type 1</i>
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IVC	Individuell ventilierter Käfig
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LM-PCR	Ligationsvermittelte PCR
LN	Lymphknoten
LSC	Leukämische Stammzelle

LTR	<i>Long terminal repeats</i>
mcs	<i>Multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min.	Minute
MLV	Murines Leukämievirus
MNC	<i>Mononuclear cells</i>
MSA	Murines Serum Albumin
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PoI	Polymerase
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RCL	Replikationskompetentes Lentivirus
RCR	Replikationskompetentes Retrovirus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
Sec.	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SIN	<i>Self inactivating</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell Rezeptor
TL	Transiente Leukämie
TZ	T-Zellen
UTR	Untranslatierte Region
ü.N.	Über Nacht
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen (<i>weight per volume</i>)
wPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
WT	Wildtyp

7.2 Plasmidkarten







7.3 Phänotypen der HSC/HPC induzierten Tumore

LMO2

Onkogen/Tier	Tumor	Gewicht (g) [#]	Phänotyp/ Marker	WBC [#] (x 10 ³ / µl)	Tage nach Tx	Histologische Diagnose
LMO2_A1	Milz LN	0.65 1.3	CD3+	200	198	n.b.
LMO2_A2 [†]	Thymus	0.76	CD3+, CD8+,CD4+	13	272	T-ALL
LMO2_A3	Thymus Milz	0.6 0.5	CD3+, CD8+,CD4+	48	286	T-ALL
LMO2_A4 [*]	Thymus	0.4	CD3+, CD8+,CD4+	35	298	T-ALL
LMO2_A5	Thymus	0.6	CD3+, CD8+,CD4+	n.b.	300	T-ALL
LMO2_A6 ^{**††}	Thymus	0.7	CD3+, CD8+,CD4+	30	303	n.b.
LMO2_A7	Thymus Milz	0.6 0.2	CD3+, CD8+,CD4niedrig	n.b.	306	T-ALL
LMO2_A8	Thymus Milz	0.8 0.3	CD3+, CD8+,CD4niedrig	n.b.	309	T-ALL
LMO2_A9q	Thymus	0.6	CD3+, CD8+,CD4+	30	335	n.b.
LMO2_A10 [*]	Thymus	0.8	CD3+, CD8+,CD4+	n.b.	345	n.b.
LMO2_A11	Thymus	0.7	CD3+, CD8+,CD4+	63	371	n.b.
LMO2_A12	Milz	0.55	CD3niedrig CD8+	25	408	n.b.

n.b., nicht bestimmt; Tx, Transplantation; T-ALL, T-Zell akute lymphozytische Leukämie; WBC, weiße Blutzellen.

*HSC/HPC Transplantat wurde mit MP91-LMO2-HA. [†]Abbildung 29 A and B

^{††}Abbildung 29 C [#]Gewicht des Thymus: 0.02 g, Milz: 0.09 g und LN (Lymphknoten):

0.05 g (Durchschnitt aus 5 Wildtyp-Mäusen), WBC für normale Wildtyp-Mäuse war $15 \pm 2 \times 10^3 / \mu\text{l}$ (n=5).

TCL1

Onkogen/Tier	Tumor	Gewicht (g) [#]	Phänotyp/ Marker	WBC [#] (x 10 ³ / µl)	Tage nach Tx	Histologische Diagnose
TCL1_A1 [†]	Thymus	0.6	CD3+, CD4+	24	168	T-ALL
	Milz	0.4				
	LN	3.4				
TCL1_A2	Thymus	0.2	CD3+, CD8+,CD4+	27	168	T-ALL
	Milz	0.9				
	LN	2.0				
TCL1_A3	Leber	4.0	n.b.	10	181	n.b.
	Milz	0.4				
TCL1_A4	Thymus	0.6	CD3+, CD8+,CD4+	55	189	n.b.
TCL1_A5	Thymus	0.4	CD3+, CD8+,CD4niedrig	60	203	n.b.
	LN	0.3				
TCL1_A6	LN	0.5	CD3+, CD4+	n.b.	212	n.b.
TCL1_A7 ^{††}	LN	3.1	CD19+	2,9	259	B-ALL
	Milz	0.7				
TCL1_A8	LN	3.4	CD19+	96	304	n.b.
	Milz	0.5				
TCL1_A9	LN	2.9	CD19+	n.b.	308	n.b.
	Milz	0.9				
TCL1_A10	LN	1.4	CD19+	n.b.	310	n.b.

n.b., nicht bestimmt; Tx, Transplantation; T-ALL, T/B-Zell akute lymphozytische Leukämie; WBC, weiße Blutzellen. [†] Abbildung 29 D und E, ^{††} Abbildung 29 F, [#]Siehe Tabelle A.LMO2

Δ TrkA^{hoch}

Onkogen/Tier	Tumor	Gewicht (g) [#]	Phänotyp/ Marker	WBC [#] (x 10 ³ / μ l)	Tage nach Tx	Histologische Diagnose
Δ TrkA ^{hoch} _A1	Milz	0.5	n.b.	n.b.	8	n.b.
Δ TrkA ^{hoch} _A2	Milz	0.5	n.b.	n.b.	8	n.b.
Δ TrkA ^{hoch} _A3	Milz	0.5	n.b.	n.b.	8	n.b.
Δ TrkA ^{hoch} _A4	Milz	0.6	CD11b	n.b.	9	n.b.
Δ TrkA ^{hoch} _A5 [†]	Milz	0.6	CD11b	n.b.	12	AML (TL)
Δ TrkA ^{hoch} _A6	Milz	0.5	CD11b	n.b.	12	n.b.
Δ TrkA ^{hoch} _A7	Milz	4.8	CD11b	n.b.	12	n.b.
Δ TrkA ^{hoch} _A8	Milz	0.5	CD11b	n.b.	12	n.b.
Δ TrkA ^{hoch} _A9	Thymus	0.6	CD3+, CD8+,CD4+	n.b.	77	T-ALL
Δ TrkA ^{hoch} _A10 ^{††}	Thymus Milz	0.9 0.6	CD3+, CD8+,CD4+	100	78	T-ALL
Δ TrkA ^{hoch} _A11	Thymus Milz	0.6 0.5	CD3+, CD8+,CD4+	n.b.	82	T-ALL
Δ TrkA ^{hoch} _A12	Thymus Milz	0.4 1.2	CD3+, CD8+,CD4+	33	83	T-ALL

n.b., nicht bestimmt; Tx, Transplantation; T-ALL, T-Zell akute lymphozytische Leukämie; WBC, weiße Blutzellen;

AML, Akute myeloische Leukämie; TL, Transiente Leukämie. [†] Abbildung 29 G und H, ^{††} Abbildung 29 I, [#]Siehe

Tabelle A. LMO2

ΔTrkA^{niedrig}

Onkogen/Tier	Tumor	Gewicht (g) [#]	Phänotyp/ Marker	WBC [#] (x 10 ³ / μl)	Tage nach Tx	Histologische Diagnose
ΔTrkA ^{niedrig} _A1	Thymus	0.7	CD3+, CD8+,CD4+	7,7	76	n.b.
ΔTrkA ^{niedrig} _A2	Thymus	0.6	CD3+, CD8+,CD4+	n.b.	77	n.b.
ΔTrkA ^{niedrig} _A3	Thymus	0.7	CD3+, CD8+,CD4+	72	82	n.b.
ΔTrkA ^{niedrig} _A4	Thymus	0.6	CD3+, CD8+,CD4+	ND	82	n.b.
ΔTrkA ^{niedrig} _A5	Thymus	0.6	CD3+, CD8+,CD4+	19,4	82	n.b.
ΔTrkA ^{niedrig} _A6	Thymus	0.7	CD3+, CD8+,CD4+	58,2	82	n.b.
ΔTrkA ^{niedrig} _A7	Thymus	0.5	CD3+, CD8+,CD4+	68,5	82	n.b.
ΔTrkA ^{niedrig} _A8	Thymus	0.6	CD3+, CD8+,CD4+	60,2	82	n.b.
ΔTrkA ^{niedrig} _A9	Thymus	0.3	CD3+, CD8+,CD4+	27	85	n.b.

n.b., nicht bestimmt; Tx, Transplantation; WBC, weiße Blutzellen. [#]Siehe Tabelle A.LMO2

7.4 Integrationsanalyse der HSC/HPC induzierten Tumore

LMO2_A

Tier und Lokus	Gen-ID	Chromosom	Position zum Transkriptionsstart (Intron, Exon)	Orientierung
LMO2_A1				
Rgl1	19731	1 G2	+ 10 kb [2. Intron]	F
LMO2_A2				
Ggta1	14594	2 B	+ 15 kb [1. Intron]	R
4930402F06Rik	74854	2 B	- 49 kb	F
4930568D16Rik	75859	2 B	- 78 kb	F
1700081D17Rik	73523	14 D2	+ 216 kb [6. Intron]	F
Egr3	13655	14 D2	- 21 kb	F
Bin3	57784	14 D2	- 44 kb	F
2610301G19Rik	219158	14 D2	+ 98 kb	R
9930012K11Rik	268759	14 D2	+ 111 kb	R
Pdlim2	213019	14 D2	+ 122 kb	R
LMO2_A3				
Smad3	17127	9 D	+ 37 kb (1. Intron)	F
2310007F21Rik	66939	9 D	+ 119 kb	R
Gm774	331487	X D	+ 1 kb (1. Exon)	R
Zdhhc15	108672	X D	+ 187 kb	F
LMO2_A5				
Mical1	171580	10 B1	0 kb	F
Smpd2	20598	10 B1	+ 14 kb	R
Ppil6	73075	10 B1-B2	- 14 kb	F
Cd164	53599	10 B2	- 43 kb	F
5033413D22Rik	75973	10 B2	+ 84 kb	R
Zbtb24	268294	10 B1	+ 27 kb	F
LOC629441	629441	10 B1	+ 68 kb	F
LOC633971	633971	10 B1	+ 94 kb	F
Pus1	56361	5 F	- 1kb	F
LOC667297	667297	5 F	+ 11 kb	R
Ep400	75560	5 F	- 10 kb	F
Ddx51	69663	5 F	+ 128 kb	R
Noc4l	100608	5 F	- 128 kb	F
Ulk1	22241	5 F	+ 29 kb	F
AW049829	100900	5 F	+ 59 kb	F
Chek2	50883	5 F	- 59 kb	R
Scap2	54353	6 B3	+173 kb	F
Snx10	71982	6 B3	+ 295 kb	R
LMO2_A6				
Dpysl5	65254	5 B1	+ 48 kb	R
Mapre3	100732	5 B1	+ 55 kb	R
1110039B18Rik	68796	5 B1	- 0 kb	R
9430057O19Rik	231093	5 B1	- 19 kb	R
2310016E02Rik	67695	5 B1	+ 38 kb	F
Emilin1	100952	5 B1	- 44 kb	R
Khk	16548	5 B1	- 52 kb	R
Cgref1	68567	5 B1	+ 76 kb	F
Abhd1	57742	5 B1	- 80 kb	R
Preb	50907	5 B1	+ 192 kb	F

LMO2 B

Tier und Lokus	Gen-ID	Chromosom	Position zum Transkriptionsstart (Intron, Exon)	Orientierung
LMO2_A8				
LOC666745	666745	5 C3.1	+ 4 kb	R
Klh5	71778	5 C3.1	- 28 kb	F
Wdr19	213081	5 C3.1	- 96 kb	F
LOC666735	666735	5 C3.1	+ 66 kb	F
9130005N14Rik	68303	5 C3.3	+ 134 kb	F
Tlr6	21899	5 C3.1	- 144 kb	R
Sdc1	20969	12 A1.1	+ 63 kb	F
Pum2	80913	12 A1.1	+ 159 kb	F
9930038B18Rik	319503	12 A1.1	+ 43 kb	R
Laptn4a	17775	12 A1.1	- 87 kb	F
Matn3	17182	12 A1.1	- 114 kb	F
LMO2_A10				
Sdcbp	53378	4 A1	+ 4 kb (1. Intron)	F
Cyp7a1	13122	4 A1	- 96 kb	R
Nsmaf	18201	4 A1	+ 82 kb	R
Tox	252838	4 A1	+ 619 kb	R
LMO2_A11				
Epb4.1l4b	54357	4 B3	+ 52 kb (2. Intron)	R
Ptpn3	545622	4 B3	+ 195 kb	R
Dym	69190	18 E2	+ 244 kb	R
Smad7	17131	18 E2	- 105 kb	R
EG626058	626058	1 G3	- 2 kb	F
Lamc1	226519	1 G3	- 83 kb	F
1700012A16Rik	71836	1 G3	- 9 kb	R
Dhx9	13211	1 G3	+ 72 kb	F
LMO2_A12				
Pgpep1	66522	8 C1	+ 13 kb	R
Lsm4	50783	8 B3.3	- 27 kb	F
Jund1	16478	8 C2	- 53 kb	F
LOC637079	637079	8 B3.3	- 62 kb	F
Pde4c	110385	8 B3.3	- 78 kb	F
Rab3a	19339	8 B3.3	- 108 kb	F
Gdf15	23886	8 B3.3	- 14 kb	R
Lrrc25	211228	8 B3.3	+ 29 kb	F
Ssbp4	76900	8 C1	- 38 kb	R
Isyna1	71780	8 B3.3	+ 52 kb	F
Ell	13716	8 B3.3	+ 106 kb	F

TCL1

Tier und Lokus	Gen-ID	Chromosom	Position zum Transkriptionsstart (Intron, Exon)	Orientierung
TCL1_A1				
Hs1bp3	58240	12 A1.1	+ 58 kb	R
Gdf7	238057	12 A1.1	- 53 kb	F
1110057K04Rik	68832	12 A1.1	+ 163kb	R
LOC544830	544830	12 A1.1	+ 111 kb	F
TCL1_A2				
Traf1	22029	2 B	+ 26 kb	R
Hc	15139	2 cen -C1	+ 125 kb	R
Phf19	74016	2 B	- 22 kb	R
D730039F16Rik	77996	2 B	+ 62 kb	F
Psm5	66998	2 B	- 65 kb	R
EG623370	623370	2 B	+ 99 kb	F
Fbxw2	30050	2 B	- 110 kb	R
TCL1_A3				
Slc35b4	58246	6 B1	+ 20 kb (3' UTR)	R
Lrguk	74354	6 B1	+ 128 kb	F
TCL1_A4				
Tnni2	21953	7 F5	+ 1 kb (1. inton)	F
Syt8	55925	7 F5	+ 8 kb	F
Ctsd	13033	7 F5	- 55 kb	R
6330512M04Rik	320802	7 F5	- 70 kb	R
Lsp1	16985	7 F5	- 29 kb	F
Tnnt3	21957	7 F5	- 56 kb	F
Mrpl23	19935	7 F5	- 90 kb	F
Wwp2	66894	8 D3	+ 116 kb	F
EG668012	668012	8 D3	- 115 kb	R
Nob1 (=Psm58bp1)	67619	8 D2	- 127 kb	R
Nqo1	18104	8 D3	- 149 kb	R
Nfat5	54446	8 D2	+ 258 kb	F
Psm57	17463	8 D3	+ 37 kb	R
TCL1_A5				
EG664874	664874	5 C3.3	+ 28 kb	R
Kit	16590	5 C3.3	+ 156 kb	F
TCL1_A6				
Dis3l	213550	9 C	- 6 kb	R
Tipin	66131	9 D	+ 66 kb	F
Map2k1	26395	9 C	- 94 kb	R
Uchl4	93841	9 C	+ 112 kb	F
Megf11	214058	9 C	- 38 kb	F
TCL1_A7				
EG664874	664874	5 C3.3	+ 28 kb	R
Kit	16590	5 C3.3	+ 156 kb	F
TCL1_A9				
Ptma	19231	1 D	- 4 kb	R
Pde6d	18582	1 D	+ 60 kb	F
Cops7b	26895	1 D	- 64 kb	R
LOC100040414	100040414	1 D	+ 49 kb	R
1700019O17Rik	71863	1 D	+ 96 kb	R
Noxa1	241275	2 A3	- 16 kb	R
Entpd8	72090	2 A3	+ 31 kb	F
Nelf	56876	2 A3	+ 57 kb	F
Pnpla7	241274	2 A3	+ 136 kb	F
Nrarp	67122	2 A3	- 69 kb	F
A830007P12Rik	227612	2 A3	+ 85 kb	R
A730008L03Rik	58202	2 A3	+ 100 kb	R
TCL1_A10				
Dip2c	208440	13 A1	+ 152 kb	R

Δ TrkA^{niedrig} A

Tier und Locus	Gen-ID	Chromosom	Position zum Transkriptionsstart (Intron, Exon)	Orientierung
dTrkA^{hoch}-A3+				
Blr1	12145	9 A5.2	- 11 kb	R
Bcl9l	80288	9 B	+ 38 kb	F
Upk2	22269	9 A5.2	- 83 kb	R
Foxr1	382074	9 B	- 96 kb	R
Ddx6	13209	9 B	- 68 kb	F
LOC667406	667406	9 A5.2	+ 73 kb	R
Mtdh	67154	15 B3.3	+ 14 kb (1. intron)	F
Cmas	12764	6 G3	- 3 kb	R
Gm766	330440	6 G3	+ 51 kb	F
EG665037	665037	6 G3	- 60 kb	R
Abcc9	20928	6 G2	- 51 kb	F
dTrkA^{niedrig}-A1				
Spred2	114716	11 A3.2	+ 70 kb (1. intron)	R
LOC100041937	100041937	11 A3.1	+ 76 kb	R
Actr2	66713	11 A3.1	+ 118 kb	F
dTrkA^{niedrig}-A2				
Pstpip1	19200	9 C	+ 0 kb (1. exon)	R
Tspan3	56434	9 C	- 72 kb	F
Rcn2	26611	9 C	+ 48 kb	R
LOC665005	665005	9 B	+ 63 kb	R
LOC664995	664995	9 B	+ 99 kb	R
dTrkA^{niedrig}-A3				
EG383080	383080	15 E1	+ 3 kb	R
Rbx1	56438	15 E1	+ 54 kb	F
Ep300	328572	15 E1	- 65 kb	F
Snx11	74479	11 D	+ 12 kb	F
Cbx1	12412	11 D	- 23 kb	R
LOC629750	629750	11 D	+ 32 kb	F
Nfe2l1	18023	11 D-E	+ 62 kb	F
Copz2	56358	11 D	- 85 kb	R
LOC665436	665436	11 D	- 99 kb	R
Prkcq	18761	2 A1	+ 20 kb (1. intron)	R
dTrkA^{niedrig}-A4				
Plxnb2	140570	15 E3	+ 7 kb (2. intron)	F
LOC100043185	100043185	15 E3	+ 10 kb	F
1700027J05Rik	69440	15 E3	+ 25 kb	F
Saps2	71474	15 F1	- 40 kb	R
Mapk11	19094	15 E3	- 22 kb	F
Mapk12	29857	15 E3	- 31 kb	F
Hdac10	170787	15 E3	- 43 kb	F
1300018J18Rik	223776	15 E3	+ 83 kb	R
Trabd	67976	15 E3	+ 96 kb	R

Δ TrkA^{niedrig} B

Tier und Lokus	Gen-ID	Chromosom	Position zum Transkriptionsstart (Intron, Exon)	Orientierung
dTrkA^{niedrig}-A5				
Krtcap2	66059	3 F2	< + 1 kb (1. Exon)	R
Trim46	360213	3 F1	- 1 kb	F
Muc1	17829	3 F1	+ 18 kb	R
Thbs3	21827	3 E3-F1	+ 32 kb	R
Mtx1	17827	3 F1	- 33 kb	F
Gba	14466	3 F1	+ 34 kb	R
1110013L07Rik	68521	3 F1	+ 64 kb	R
Scamp3	24045	3 F2	+ 70 kb	R
Clk2	12748	3 F1	+ 82 kb	R
Hcn3	15168	3 F2	- 87 kb	F
Pklr	18770	3 F1	+ 111 kb	R
Dpm3	68563	3 F2	- 17 kb	R
Rag1ap1	19729	3 F1	+ 24 kb	F
Efna1	13636	3 F1	+ 32 kb	F
Efna3	13638	3 F1	+ 76 kb	F
Efna4	13639	3 F1	+ 91 kb	F
Adam15	11490	3 F1	+ 103 kb	F
Pip5k1c	18717	10 C1	+ 5 kb	F
Tjp3	27375	10 C1	- 7 kb	R
Apba3	57267	10 C1	+ 30 kb	F
Mrpl54	66047	10 C1	- 31 kb	R
Matk	17179	10 C1	+ 40 kb	F
9130206N08Rik	103406	10 C1	+ 65 kb	F
Atcay	16467	10 C1	- 67 kb	R
2510012J08Rik	70312	10 C1	- 23 kb	F
Tbxa2r	21390	10 C1	- 31 kb	F
Gipc3	209047	10 C1	+ 45 kb	R
Hmg20b	15353	10 C1	+ 53 kb	R
4930404N11Rik	432479	10 C1	+ 68 kb	R
Fzr1	56371	10 C1	+ 80 kb	R
Dohh	102115	10 C1	- 87 kb	F
2210404O07Rik	72273	10 C1	- 95 kb	F
dTrkA^{niedrig}-A6				
Tsc22d4	78829	5 G2	+ 3 kb	F
6430598A04Rik	243300	5 G2	- 9 kb	R
Hrbl	231801	5 G2	- 64 kb	R
2010007H12Rik	69871	5 G2	- 30 kb	F
Bcdin3	231803	5 G2	+ 37 kb	R
Zcwpw1	381678	5 G2	- 39 kb	F
Pilra	231805	5 G2	+ 96 kb	R
Pilrb1	170741	5 G2	+109 kb	R
dTrkA^{niedrig}-A8				
2010208K18Rik	72096	7 F4	+ 28 kb	R
A930008G19Rik	77938	7 F3	- 12 kb	R
C430003P19Rik	109359	7 F3	- 47 kb	F
Zranb1	360216	7 F3	- 125 kb	F
dTrkA^{niedrig}-A9				
Fmnl3	22379	15 F3	+ 38 kb (5. intron)	F
Tegt	110213	15 F3	- 60 kb	R
Prpf40b	54614	15 F3	- 38 kb	R
EG545136	545136	15 F3	- 44 kb	F
Mcrs1	51812	15 F1	- 81 kb	F
EG383080	383080	15 E1	+ 3 kb (1. intron)	R
Rbx1	56438	15 E1	+ 54 kb	F
Ep300	328572	15 E1	- 65 kb	F
Btbd14a	67991	2 A3	+ 55 kb (3. intron)	R
C330006A16Rik	109299	2 A3	+ 73 kb	R
Ubac1	98766	2 A3	- 46 kb	R
LOC665199	665199	2 A3	- 72 kb	R
LOC100040100	100040100	2 A3	- 83 kb	R
Camsap1	227634	2 A3	- 85 kb	R

8. Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Vorträge

8.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Newrzela, S., Cornils, K., Li, Z., Baum, C., Brugman, M.H., Hartmann, M., Meyer, J., Hartmann, S., Hansmann, M.-L., Fehse, B., von Laer, D.: Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood*, im Druck.

Van Lunzen, J., Glaunsinger, T., Stahmer, I., von Baehr, V., Baum, C., Schilz, A., Kuehlcke, K., Naundorf, S., Martinius, H., Hermann, F., Giroglou, T., Newrzela, S., Choi, I., Brauer, F., Brandenburg, G., Alexandrov, A., von Laer, D.: Transfer of autologous gene-modified T lymphocytes in HIV-infected patients with severe immunodeficiency. *Mol. Ther.* 15:1024-1033, 2007.

Von Laer, D., Baum, C., Schambach, A., Kühlcke, K., Zahn, R., Newrzela, S., van Lunzen, J., Johnson, R. P., Schmitz, J. E.: Gene therapeutic approaches for immune modulation in AIDS, *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 6: , 2007.

Newrzela, S., Brandenburg, G., von Laer, D.: Culture of murine T cells for gammaretroviral and lentiviral gene transfer. In: *Methods in molecular medicine: gene modification of hematopoietic stem cells*. Ed.: C. Baum. The Humana Press Inc., im Druck.

8.2 Vorträge

Newrzela, S., Cornils, K., Li, Z., Baum, C., Hartmann, M., Hartmann, S., Hansmann, M.-L., Fehse, B., von Laer, D.: A comparative analysis of the leukaemic potential of mature T cells versus T cell precursors. 14. Internationaler AEK Krebs-Kongress 2007, 28.02-02.03.2007, Frankfurt am Main.

Newrzela, S., Cornils, K., Li, Z., Baum, C., Hartmann, M., Hartmann, S., Hansmann, M.-L., Fehse, B., von Laer, D.: A comparative analysis of the leukaemic potential of mature T cells versus T cell precursors. 12. Kongress des Europäischen Hämatologie Verbunds (EHA) 2007, 07.-10.06.2007, Wien.

Lebenslauf

Sebastian Newrzela

Geburtsdatum/-ort: 13.07.1978 in Dessau
 Anschrift: Rosenstraße 3
 63517 Rodenbach
 Familienstand: verheiratet, 1. Kind
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1985 – 1989	Anne-Frank-Schule, Grundschule in Hanau
1989 – 1998	Franziskanergymnasium Kreuzburg, Großkrotzenburg
17.06.1998	Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1998 – 2003	Biologiestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
1998 – 2000	Grundstudium mit Diplomvorprüfung
2000 – 2002	Hauptstudium
2002	Mündliche Diplomprüfungen erfolgreich in den Fächern Genetik, Biochemie und Mikrobiologie abgelegt.
2002 - 2003	Diplomarbeit im Georg-Speyer-Haus Frankfurt am Main, in der Arbeitsgruppe von Laer, zu dem Thema: „Expression eines neutralisierenden Antikörpers gegen HIV-1 in Lymphozyten, mit Hilfe eines retroviralen Vektoren“
08.08.2003	Studienabschluss als Diplom-Biologe

Promotion

seit 10.2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main, Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. D. von Laer
11.–12.2004 und	Arbeiten in BIDMC, Harvard Medical, bei Prof. Dr. J. Schmitz an dem Thema: Preclinical monkey model for gene therapy of
04.-06.2005	HIV.
2005 - 2006	Doktorandensprecher
seit 04.2006	Mitglied im Betriebsrat des Georg-Speyer-Haus

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Resistenz polyklonaler, reifer T-Zellen gegenüber der Transformation durch retrovirale Transduktion“ von mir selbstständig und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Frankfurt am Main, im April 2008

Sebastian Newrzela

"MEDICINE IS MAGICAL AND MAGICAL IS ART

for david

THE BOY IN THE BUBBLE"

1.6.2 - 1.6.3 - 1.6.3 - 4.2 - 4.4.2 - 3.2.4 - 3.1.3 - 4.2
- 3.1.12 - 1.4.2.1 - 3.1.12 - 5 - 4.4.2 - 1.4.2.1 - 1.6.2 - 4