

**Entwicklung von retroviralen Vektoren zum selektiven  
Gentransfer in hämatopoetische Vorläuferzellen und  
Untersuchungen zur R-Peptid vermittelten Membranfusion bei  
 $\gamma$ -Retroviren.**



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim  
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB 14)  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Maria Bobkova  
aus Rybinsk

Frankfurt am Main 2008  
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Cichutek

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 2. Dezember 2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Paul-Ehrlich-Institut in Langen unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Cichutek angefertigt.

Teile der vorgelegten Arbeit sind veröffentlicht in:

Engelstadter M., **Bobkova M.**, Baier M., Stitz J., Holtkamp N., Chu TH., Kurth R., Dornburg R., Buchholz C. J. and Cichutek K.: *Targeting human T cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library*. Hum Gene Ther. 2000 Jan 20; 11(2):293-303

Stitz J., Steidl S., Merget-Millitzer H., König R., Müller P., Nocken F., Engelstadter M., **Bobkova M.**, Schmitt I., Kurth R., Buchholz C. J. and Cichutek K.: *MLV-derived retroviral vectors selective for CD4-expressing cells and resistant to neutralization by sera from HIV-infected patients*. Virology 2000 Feb 15; 267(2):229-36.

M. Engelstädter, **M. Bobkova**, C. Buchholz und K. Cichutek.: *Neuer Weg zur Herstellung retroviraler Zelltargeting-Vektoren*. Bioforum 2000 (3):96-98.

Engelstadter M., Buchholz C. J., **Bobkova M.**, Steidl S., Merget-Millitzer H., Willemsen R. A., Stitz J. and Cichutek K. *Targeted gene transfer to lymphocytes using murine leukaemia virus vectors pseudotyped with spleen necrosis virus envelope proteins*. Gene Ther. 2001 Aug; 8(15): 1202-6.

**Bobkova M.**, Stitz J., Engelstädter M., Buchholz C.J., Cichutek K.: *Identification of R-peptides in envelope proteins of C-type retroviruses*. J Gen Virol. 2002 Sep; 83(Pt 9): 2241-6.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. Reinhard Kurth und Herrn Professor Dr. Johannes Löwer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut/Langen.

Herrn Professor Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Überlassung des Themas, sowie die wissenschaftliche Anleitung bei der Durchführung dieser Arbeit, die in seiner Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ entstand.

Herrn Professor Dr. Bernd Ludwig vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität/Frankfurt danke ich für die freundliche und fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Buchholz danke ich für die Betreuung während der Fertigstellung dieser Arbeit, insbesondere für die Mühe und Sorgfalt bei der Durchsicht.

Dr. Martin Engelstädter, Dr. Renate König, Dr. Peter Müller, Dr. Jörn Stitz, danke ich für ihre Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung bei der Bewältigung der experimentellen Probleme im Laboralltag. Herrn Dipl.-Ing. Martin Selbert danke ich für die Durchführung aller Sequenzierarbeiten und Herrn Herbert Bartel für die fototechnischen Arbeiten.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe 6/2 danke ich für einen problemlosen Wissens-, Material- und Methodentransfer. Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Fachgebiete 6/01, 6/1 und 6/2, die mich die letzten drei Jahre begleitet und unterstützt haben. Durch ihren Witz und Humor sorgten sie stets für ein sehr angenehmes Arbeitsklima. Sie alle haben dadurch dazu beigetragen, daß die vorliegende Arbeit zustande gekommen ist.

Ich danke ganz besonders den Menschen, die mir nahe stehen und mich in einer Weise unterstützt haben, die weit über fachliche Diskussionen und technische Hilfe hinausgeht: meinen Eltern, meinen Freunden und meinem Mann Stanislav Gorbulev.

***für Maya***

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1        | Gentherapie   | 9         |
| 1.2        | Gentransfer mit Hilfe von retroviralen Vektorsystemen   | 12        |
| 1.3        | Das SNV-System  | 16        |
| 1.4        | Mechanismen viraler Zelleintritt und Membranfusion  | 18        |
| 1.5        | Ziel der vorliegenden Arbeit  | 20        |
| <b>2</b>   | <b>Materialien und Methoden</b>   | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Materialien und Methoden der Molekularbiologie</b>   | <b>22</b> |
| 2.1.1      | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 22        |
| 2.1.2      | Plasmide und Vektoren   | 23        |
| 2.1.3      | Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von Plasmid DNA  | 24        |
| 2.1.4      | Herstellung kompetenter Bakterien und deren Transformation  | 25        |
| 2.1.5      | Plasmid-Präparation   | 26        |
| 2.1.6      | Agarose-Gelelektrophorese   | 26        |
| 2.1.7      | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen  | 27        |
| 2.1.8      | Nukleotidsequenzbestimmung  | 28        |
| 2.1.9      | Oligonukleotide   | 28        |
| 2.1.9.1    | Oligonukleotide zur Klonierung der <i>zeo</i> -Resistenzgen-Kassette  | 28        |
| 2.1.9.2    | Oligonukleotide für die Herstellung der pRD134- $\Delta$ R, pALF-PERVA- $\Delta$ R und pALF-PERVB- $\Delta$ R | 28        |
| 2.1.9.3    | Oligonukleotide für die Klonierung der pALF-GALV und pALF-GALV- $\Delta$ R.                                   | 29        |
| 2.1.9.4    | Sequenzierprimer zur Analyse der SNV-TM DNA-Sequenz:  | 29        |
| <b>2.2</b> | <b>Materialien und Methoden der Zellkultur</b>  | <b>30</b> |
| 2.2.1      | Zellen und Medien   | 30        |
| 2.2.2      | Verpackungszelllinien   | 31        |
| 2.2.3      | Präparation von HSC aus Nabelschnurblut   | 31        |
| 2.2.4      | Separierung von CD34-positiver Zellsubpopulationen  | 32        |
| 2.2.5      | Einfrieren und Auftauen von Zellen  | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.5.1 Einfrieren von Zellen:   | 32        |
| 2.2.5.2 Auftauen von Zellen:   | 33        |
| 2.2.6 Transfektionstechniken   | 33        |
| <b>2.2.6.1 Transfektion mittels Lipofectamin™</b>  | <b>33</b> |
| 2.2.7 Transduktionen und Titrationsen  | 34        |
| 2.2.7.1 Transduktion von adhärenenten und Suspensionszellen  | 35        |
| 2.2.7.2 Transduktion CD34-positiver Stammzellen aus dem Nabelschnurblut  | 35        |
| 2.2.8 Klonogener Assay auf Methyl-Zellulose  | 36        |
| 2.2.9 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (X-Gal-Färbung)  | 37        |
| 2.2.10 Analytische Durchflußzytometrie   | 37        |
| <b>2.3 Methoden der Proteinbiochemie</b>   | <b>38</b> |
| 2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)   | 38        |
| 2.3.1.1 Probenaufbereitung   | 38        |
| 2.3.1.2 Verwendete Protein-Molekulargewichts-Marker  | 39        |
| 2.3.1.3 Zusammensetzung der 12% SDS-Polyacrylamid-Gele   | 40        |
| 2.3.2 Western-Blot-Analysen  | 40        |
| 2.3.3 Luziferase Assay   | 41        |
| 2.3.4 Radioimmunpräzipitation (RIPA)   | 42        |
| <b>3 Ergebnisse</b>  | <b>44</b> |
| <b>3.1 Herstellung und Charakterisierung von CD34-spezifischen SNV-abgeleiteten Vektoren</b>                                   | <b>45</b> |
| 3.1.1 Konstruktion des mit dem antiCD34-scFv modifizierten SNV Env Protein   | 45        |
| 3.1.2 Etablierung stabiler Verpackungszellklone für die Produktion hochtitriger anti-CD34 SNV-Vektorstocks                     | 46        |
| 3.1.3 Transduktion verschiedener humanen Zelllinien mit dem [(antiCD34-TM)SNV] - Vektor  | 48        |
| 3.1.4 Transduktion primärer CD34 positiver Stammzellen aus Nabelschnurblut und PBMC  | 50        |
| 3.1.5 Nachweis der Zielzell-Spezifität der hergestellten Vektoren. Diskriminierungs-Experimente in gemischten Zellpopulationen | 54        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 3.1.6      | Analyse des Differenzierungspotentials der transduzierten CD34 primären Zellen mittels klonogenen Assays | 57         |
| <b>3.2</b> | <b>Charakterisierung der <math>\gamma</math>-Retrovirus vermittelten Fusion</b>                          | <b>61</b>  |
| 3.2.1      | Biochemische Charakterisierung des SNV Wildtyp Env Proteins  | 61         |
| 3.2.2      | Aminosäure-Sequenzvergleich der zytoplasmatischen Domäne des TM Proteins bei $\gamma$ -Retroviren        | 63         |
| 3.2.3      | Konstruktion von Env-Varianten mit verkürztem <i>C-tail</i>  | 64         |
| 3.2.4      | Biochemische Charakterisierung der SNV Env-Variante  | 66         |
| 3.2.5      | Nachweis der Membranfusion per qualitative Reporter-gen-Assay  | 68         |
| 3.2.6      | Quantitativer Analyse des fusogenen Potentials der Env-Varianten   | 72         |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion</b>  | <b>75</b>  |
| <b>4.1</b> | <b>Gentransfer in humane hämatopoetische Stammzellen</b>   | <b>75</b>  |
| <b>4.2</b> | <b>Biochemische Charakterisierung des SNV Env Proteins</b>   | <b>78</b>  |
| <b>4.3</b> | <b>Ausblick</b>  | <b>82</b>  |
| 4.3.1      | Der therapeutische Einsatz des [(antiCD34-TM)SNV]-Vektors  | 82         |
| 4.3.2      | Anwendung hochfusogener retroviraler Env-Proteine in der Genterapie                                      | 83         |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>85</b>  |
| <b>6</b>   | <b>Abkürzungen</b>   | <b>87</b>  |
| <b>7</b>   | <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>89</b>  |
| <b>8</b>   | <b>Lebenslauf</b>  | <b>103</b> |



# 1 Einleitung

## 1.1 Gentherapie

Von der Gentherapie verspricht man sich die gezielte Behandlung von Erbkrankheiten, Tumorerkrankungen und Infektionskrankheiten. Dabei wird entweder ein funktionelles Homolog eines defekten Gens oder ein relevantes therapeutisches Gen mittels „nackter“ DNA oder mittels so genannter Genfähren, die als Vektoren bezeichnet werden, in Körperzellen des Menschen eingeführt. Die möglichen klinischen Anwendungen der Gentherapie sind zahlreich und beinhalten die Behandlung vieler Krankheiten.

Für manche Krankheiten kann allein das Einführen eines funktionellen Homologs und dadurch wiederhergestellte Expression von kleinen Mengen des Produktes zum ausgeprägten therapeutischen Effekt führen. So waren im Falle der Hämophilie-Therapie in einem Ratten-Modell 10-20 % des normalen Faktor IX ausreichend (Yao et al., 1991).

Die meisten Ansätze, insbesondere bei Erbkrankheiten, erfordern eine generalisierte und lang andauernde Expression des therapeutischen Gens. Dabei ist diese Expression unter anderem von der Lebensdauer der transduzierten Zellen abhängig. In meisten Fällen, bei denen die Gentherapie an somatischen (differenzierten) Zellen angewendet wurde ist der therapeutische Effekt relativ kurz und muss durch wiederholte Behandlung aufrecht erhalten werden. In diesem Sinne ist der Ansatz der Gentherapie an Zellen, die das Potenzial haben, sich in verschiedene Körperzellen des Menschen zu differenzieren und somit das therapeutische Gen weiter zu geben, viel effizienter. Solch ein Target stellen unter anderem die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) dar.

Gentherapeutische Anwendungsprotokolle für Stammzellen erfolgten bisher *ex vivo*, wo die zu transformierenden Zellen dem Patienten entnommen und nach erfolgreichem Einschleusen des therapeutischen Gens wieder in den Körper

reimplantiert werden. Das erste Beispiel einer erfolgreichen Gentherapie beinhaltete den Gentransfer in HSC von Kindern mit schwerer Immundefizienz (SCID). *X-linked severe combined immunodeficiency* ist eine X-chromosomal vererbte Erkrankung, bei der die gemeinsame  $\gamma$ -Kette einiger Interleukin-Rezeptoren nicht exprimiert wird und daher das lymphatische System nicht funktionell ist. Für den erwähnten Ansatz wurde die cDNA der fehlerhaften  $\gamma$ -Kette in autologe  $CD34^+$ -Zellen mittels eines pseudotypisierten retroviralen Vektors transferiert. Bei 10 von 11 Kindern konnten dadurch ein voll funktionsfähiges Immunsystem rekonstituiert werden. (Cavazzana-Calvo et al., 2000). 30 Monate nach der Behandlung entwickelten aber zwei Kinder eine durch die Vektorintegration bedingte T-Zell Leukämie (Gaspar et al., 2004)

Eine weitere erfolgreiche Anwendung der Stammzellgentherapie wurde von Aiuti (Aiuti et al., 2002) publiziert. Es handelte sich um zwei Patienten mit ADA-SCID (*adenosin deaminase severe combined immunodeficiency disease*), einer angeborenen Immunschwächekrankheit, bei der die Adenosin-Deaminase fehlt. Die aus dem Knochenmark gewonnenen  $CD34^+$ -Zellen wurden mit einem ADA-tragenden retroviralen Vektor behandelt und den Patienten reimplantiert. Nach einer milden Konditionierung mit Busulfan, die den transduzierten Zellen anfangs einen Wachstumsvorteil verschaffte, konnte das Transgen (ADA) später in allen Blutreihen nachgewiesen werden. Beide Patienten wurden als klinisch gesund beurteilt und zeigten eine normale Entwicklung.

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSCs) nehmen ihren Ursprung aus der intraembryotischen aorta-gonad-mesonephrischen Region (Sanchez et al., 1996) und aus der extra-embryonischen Flüssigkeit (Yoder et al., 1997). Im Laufe der Entwicklung migrieren diese Zellen ins Lebergewebe des Embryos und auch ins Knochenmark. Beim erwachsenen Organismus machen diese Zellen im Knochenmark, im Nabelschnurblut und in der Zellmasse der Skelettmuskulatur aber auch im mobilisierten peripheren Blut 0,1% bis 2% aus. Aufgrund ihrer Eigenschaft, sich unbeschränkt zu teilen und in alle Zelltypen der Blutbahn zu differenzieren, stellen HSCs ein ideales Target für die Gentherapie der Blutkrankheiten dar (Barrette and Orlic, 2000). Durch den einzigartigen

Reifungsprozess dieser Zielzellen würde ein erfolgreicher Gentransfer in HSCs in einem langandauernden therapeutischen Effekt resultieren (Mulligan, 1993).

Der Reifungsprozess der Stammzellen ist kompliziert und besteht aus mehreren Stufen. Im Laufe des Reifungsprozesses exprimieren diese Zellen verschiedene Moleküle auf ihrer Oberfläche (Oberflächenmarker), anhand derer sie bestimmten Reifestadien zugeordnet werden können. Es sind unter anderem Transitzellen, reifende Zellen und die eigentlichen primitiven Stammzellen. Transitzellen können proliferieren, sind aber begrenzt in der Teilung und stellen die Vorstufe der reifenden Zellen dar (z. B. Vorstufen der verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen). Funktion der Transitzellen ist, die Zahl der zu reifenden Zellen aus jedem Stammzelldepot im Organismus zu amplifizieren. Reifende Zellen können sich nicht teilen und exprimieren auf ihrer Oberfläche Differenzierungsmarker (Potten and M., 1997) Um einen lang andauernden therapeutischen Effekt in Blutzellen zu erzielen, sollte der Gentransfer in die Zellen stattfinden, die dem Phänotyp der primitiven Stammzelle (HSC) entsprechen. Unter anderem wurde das Sialomucin CD34 Oberflächenmolekül als Marker der frühen primitiven Stammzellen identifiziert (Strauss et al., 1991). Mit Hilfe von anti-CD34 monoklonalen Antikörpern ist es möglich, die Population von eigentlichen primitiven Stammzellen von reifenden Vorläuferzellen der späteren Stadien zu unterscheiden und mit Hilfe von MACS (*magnetic activated cell sorting*) oder FACS (*fluorescence activated cell sorting*) anzureichern.

Um Gene stabil in hämatopoetische Zellen einzuführen, werden derzeit fast ausschließlich retrovirale Vektoren benutzt. Der onkoretrovirale Präintegrationskomplex ist instabil und nicht in der Lage, die Kernmembran zu passieren. Deswegen muss innerhalb weniger Stunden nach der Transduktion eine Teilung der Zielzellen stattfinden, um die Integration des genetischen Materials zu ermöglichen. Für die Stammzellen, die sich zum größten Teil in der G<sub>0</sub> Phase befinden, ist eine Prästimulation mit bestimmten Zytokinen notwendig. Diese induzieren die Proliferation bei hämatopoetischen Stammzellen, ohne eine Differenzierung der Zellen herbeizuführen. Unter anderem werden Thrombopoetin (TPO), Flt-3 *ligand*, IL-3 und G-CSF eingesetzt.

## 1.2 Gentransfer mit Hilfe von retroviralen Vektorsystemen

Es existiert eine große Anzahl an Vektoren, die für den Transfer von DNA in Säugetierzellen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* verwendet werden können. Die am häufigsten angewandten Systeme basieren auf Retroviren (Temin, 1986), Adenoassoziiertes Virus (AAV) (Podsakoff et al., 1994), Adenovirus (Stewart et al., 1993), Herpes Simplex Virus (HSV) (Glorioso et al., 1995), aber auch auf nicht-viralen Partikeln wie z. B. kationischen Liposomen (Thierry and Dritschilo, 1992) oder rezeptorvermittelten Polylysin-DNA-Komplexen (Bayard et al., 1986). In der letzten Zeit gewannen die auf Lentivirus basierende Vektoren aufgrund ihrer Eigenschaft teilungsinaktive Zellen zu transduzieren an besonderer Bedeutung (Miyoshi et al., 1997; Naldini et al., 1996; Poeschla et al., 1996). Außerdem können auch die vom humanen Cytomegalovirus (HCMV) (Mocarski et al., 1996), Epstein-Barr-Virus (EBV) (Robertson et al., 1996) und von Pockenviren (Moss, 1996) abgeleiteten Vektoren von Nutzen sein. Auch die *Negativestrang*-RNA-Viren wie Influenzavirus, Sendai Virus, Masernvirus, aber auch Alphaviren und *Herpesvirus saimiri* werden für das gentherapeutische Vektordesign benutzt (Frolov et al., 1996; Palese et al., 1996); (Duboise et al., 1996).

Die Mehrheit der Vektoren, die in gentherapeutischen Studien eingesetzt werden, ist vom *Moloney murine leukemia virus* (MoMLV), einem Onkovirus, abgeleitet (Braun et al., 1999; Miller et al., 1990).

Retroviruspartikel enthalten zwei identische RNA-Moleküle, die am 5'-Ende eine 7-Methylguanin-Kappe und am 3'-Ende einen poly(A)-Schwanz tragen. Sobald das Virus in die Zellen eingedrungen ist, wird die virale RNA mit Hilfe der viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT), in DNA umgeschrieben. Eine der entstandenen DNA-Kopien, die beiderseits von direkten Sequenzwiederholungen (LTR) flankiert sind, wird in das Genom der Wirtszelle integriert (Swanstrom et al., 1981). Die integrierte virale DNA wird als Provirus bezeichnet. Das Provirus wird von der Wirtszelle wie ein zelleigenes Gen transkribiert, wobei Abschnitte innerhalb der 5'-LTR als Promotor dienen.

Typisch für alle Retroviren sind die Strukturgene *gag*, *pol* und *env*. Diese kodieren für die viralen Matrix- und Kapsidproteine, bzw. für die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase und das virale Hüllprotein.

Ein Teil der viralen RNA wird in die neugebildeten Virionen verpackt. Die Verpackung der RNA-Moleküle wird durch die von Mann et al. (Mann et al., 1983) beschriebene  $\Psi$ - Sequenz vermittelt. Diese Verpackungssequenz befindet sich zwischen der 5'-LTR und dem Start-Kodon der für das Gag-Pol-Polyprotein kodierenden Region.

Anstatt des retroviralen RNA-Moleküls kann eine für ein therapeutisches Gen kodierende RNA verpackt werden. Die auf diese Weise entstehenden Partikel werden als retrovirale Vektoren bezeichnet und sind vermehrungsunfähig, weil die verpackte RNA keine für die Retrovirusvermehrung notwendigen Gene umfasst. Die Infektion mit retroviralen Vektoren, welche als Transduktion bezeichnet wird, führt zur Integration des therapeutischen Gens in das Zielzellgenom, da die Vektoren die für die Integration notwendigen viralen Proteine wie z. B. Reverse Transkriptase, die Integrase und die RNaseH enthalten. Zur Herstellung retroviraler Viruspartikel benötigt man sogenannte Verpackungszellen, welche neben dem  $\Psi$ -positiven Expressionsvektor die viralen Strukturproteine Gag, Pol und Env liefern. Nach Einbringen des  $\Psi$ -positiven Expressionsvektors in Verpackungszellen kommt es zur Abgabe der Vektorpartikel in den Zellkulturüberstand.

Das Wirtszellspektrum von Retroviren und retroviralen Vektoren wird durch die Interaktion des löslichen Oberflächen-Hüllproteins (*surface unit*, SU) mit den zellulären Rezeptoren bestimmt (Battini et al., 1992). Für alle Retroviren wird zunächst ein vorläufiges Oberflächenhüllprotein (Env) synthetisiert, das während des Transports an die Zelloberfläche in ein lösliches Oberflächen-Hüllprotein (SU) und in ein Transmembran-Hüllprotein (TM) gespalten wird. Der Viruseintritt in die Zelle erfolgt in zwei Schritten. Als Erstes bindet das SU an den zellulären Rezeptor. Dies führt zu Konformationsänderung in SU und TM, so dass das hydrophobe 20 Aminosäuren langes Fusionspeptid, das sich am N-

Terminus des TM befindet, in die Zellmembran eintritt. Die Virusmembran und die Zellmembran kommen so in räumliche Nähe und fusionieren.

Das bekannteste retrovirale Vektorsystem, das in der gentherapeutischen Forschung verbreitet benutzt wird, basiert auf dem Maus-Leukämie-Virus (MLV). Ecotropes MLV infiziert ausschließlich Nagetier-Zellen (Kavanaugh et al., 1994; Miller, 1996), während amphotropes MLV sowohl Nagerzellen als auch fast alle humane Zellen infizieren kann. Daher unterscheidet man ecotrope retrovirale Verpackungszellen, die hauptsächlich für eine Struktur- und Funktionsanalyse der Retrovirusinfektion oder Zelltargeting eingesetzt werden, und amphotrope retrovirale Verpackungszellen, die bei der Gentherapie des Menschen eine Anwendung finden.

Für den Therapie-Einsatz *in vivo* ist es notwendig, retrovirale Vektoren zu generieren, die gezielt die gewünschte Zellsubpopulation ansteuern und transduzieren („Zelltargeting“). Wie bereits erwähnt, wird der Wirtszellbereich der Retroviren von einem spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche bestimmt, der von dem retroviralen Hüllprotein erkannt wird. Die zellulären Rezeptoren des MLV sind bekannt. Das ecotrope MLV-Env-Protein verwendet den kationischen Aminosäure-Transporter (MKAT-1) (Kim et al., 1991; Wang et al., 1991). Das amphotrope Env-Protein des MLV erkennt den PiT2-Rezeptor (Eiden et al., 1996), einen Phosphat-Transporter (Miller et al., 1994; Taylor et al., 1999; van Zeijl et al., 1994).

Um die für die *in vivo* Gentherapie wünschenswerte Einengung des Wirtszellbereiches der Vektoren zu erzielen, wurden unter anderem Env-Modifikationen mit Heregulin (Han et al., 1995), EGF (*epidermal growth factor*) (Cosset et al., 1995a) oder SCF (*stem cell factor*) (Fielding et al., 1998; Yajima et al., 1998) durchgeführt. In den meisten Fällen konnte dabei die Bindung der entstandenen Vektorpartikel an den jeweiligen Rezeptor gezeigt werden. Eine effiziente Transduktion blieb jedoch mit Ausnahme einiger weniger Fälle aus. In einer Studie wurden Teile des ecotropen MLV-SU-Proteins durch eine Domäne des Hormons Erythropoetin (EPO) ersetzt (Kasahara et al., 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass die durch die Erythropoetin modifizierten MLV-Vektoren humane EPO-Rezeptor-positive Zellen (HEL, *human erythroleukemia*) nicht aber die EPO-negative humane lymphozytäre Zelllinie Raji infizierten.

Eine andere Strategie, den Tropismus und somit die Zielzellspezifität der Vektoren zu verändern, besteht darin, das gesamte Env-Protein durch das Hüllprotein eines anderen Retrovirus mit einem anderen Wirtzellbereich zu ersetzen. Hierfür werden gewöhnlicherweise *gag* / *pol* tragende Verpackungszellen mit einem heterologen *env*-Expressionskonstrukt transfiziert. Die resultierenden so genannten Pseudotypvektoren besitzen im Idealfall den Tropismus des heterologen Env-Proteins. So wurden MLV Vektoren mit dem HIV1-Hüllprotein erfolgreich pseudotypisiert, was zu einer effizienten Transduktion von CD4-positiven Zellen führte (Schnierle et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit, den Zielzellbereich des MLV zu verändern, beinhaltet die Modifikation des SU-Proteins durch Fusion mit einem einkettigen Antikörperfragment (*single chain variable fragment*; scFv). Ein einkettiges Antikörperfragment stellt ein Fusionsprotein dar, das aus zwei variablen Domänen V<sub>h</sub> und V<sub>l</sub> eines monoklonalen Antikörpers zusammengesetzt ist. Die beiden Domänen sind über ein Glycin und Serin-Oligopeptid  $-(\text{ser-gly}_4)_3\text{-gly-}$  verknüpft, das die korrekte Faltung des Fusionsproteins erlaubt (Huston et al., 1991; Whitlow et al., 1993).

Russell et al. (Russell et al., 1993) modifizierten das SU-Protein des ecotropen MLV mit einem scFv, das gegen das Hapten *4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenacetyl-caproat* (NIP) gerichtet war. Es wurden Vektoren generiert, die ein Fusionsprotein des einkettigen Antikörperfragmentes mit dem Oberflächen-Hüllprotein (scFv-gp70<sup>SU</sup>) in der viralen Hülle trugen. Es wurde gezeigt, dass die mit dem scFv modifizierten MLV-Partikel an die Zielzellen binden konnten, es fand jedoch kein Transfer des Reportergens statt. Auch weitere Versuche, einen spezifischen und effizienten Gentransfer mit den von ecotropen MLV abgeleiteten scFv-Env-Vektoren zu etablieren, blieben wenig erfolgreich (Benedict et al., 1999; Zhao et al., 1999). Ager et al., (Ager et al., 1996)

vermuteten, dass die aminoterminal gebundene scFv Domäne einige Funktionen des MLV-Env-Glycoproteins, wie z.B. des intrazellulären Transport, den viralen Eintritt und die Effektivität der Rezeptorbindung, behindern könnten.

Im Gegensatz zum MLV Env-Protein, das nur mäßige Modifikationen erlaubt, kann die gesamte SU-Domäne des SNV-Env-Proteins, das den Wirtszellbereich durch die Bindung an spezifischen Zielzellrezeptoren bestimmt, durch einen Liganden oder durch ein einkettiges Antikörper-Fragment ersetzt werden. So wurden SNV-Zelltargeting-Vektoren beschrieben, welche die effiziente Transduktion humaner Zielzellen erlauben. Mittels des scFv B6.2, das die Anbindung an einen humanen Brust- und Coloncarzinom-Oberflächenmarker vermittelt, konnten humane Coloncarzinoma-Zellen mit einem Titer von bis zu  $10^4$  i.E./ ml transduziert werden (Chu and Dornburg, 1995; Chu and Dornburg, 1997). Weiterhin konnte ein effizienter Gentransfer in humane T-Zellen mit Hilfe von den mit 7A5 scFv modifizierten SNV-Vektorpartikeln etabliert werden. Hierbei handelte es sich um ein einkettiges Antikörperfragment, das aus einer scFv-Phagenbibliothek selektioniert wurde (Engelstadter et al., 2000). Das auf diese Weise modifizierte chimäre scFv-Env-Protein des SNV wird korrekt prozessiert (Chu and Dornburg, 1997; Chu et al., 1994; Martinez and Dornburg, 1995) und kann in den Vektorpartikeln nachgewiesen werden (Engelstadter et al., 2000). Die Möglichkeit das Env-Protein des SNV zu modifizieren und somit die Zelltargeting-Vektorpartikeln herzustellen macht den Einsatz solcher Systeme in der *in vivo* Gentherapie besonders interessant.

### 1.3 Das SNV-System

Als Alternative zu MLV-basierten retroviralen Vektoren, wurden aus Milznekrose-Virus (SNV) abgeleitete Zelltargeting-Vektoren entwickelt. SNV ist pathogen für Vögel, während es für Menschen als apathogen gilt. Der Bereich der *gag*- und *pol*-Gene weist Homologien zu den entsprechenden Genen der  $\gamma$ -Retroviren auf. Das Env-Protein des SNV ähnelt dem der simianen D-Typ Retroviren. Es wird vermutet, dass der Eintritt des SNV in die Zelle über direkte Membran-Fusion erfolgt, wobei der spezifische Oberflächen-Rezeptor bisher unbekannt ist.



Um die von SNV abgeleiteten retroviralen Vektorpartikel zu generieren, welche die cDNA des *lac-Z*-Gens als Reporter übertragen, wurde von Dornburg (Dornburg, 1995) eine Verpackungszelllinie (DSH-CXL) entwickelt. DSH-CXL ist von der Hunde-Osteosarkom-Zelllinie D17 abgeleitet (Dougherty et al., 1989; Watanabe and Temin, 1983). Dazu wurden D17-Zellen mit dem  $\psi$ -negativen Expressionskonstrukt, das für die viralen Gene *gag* und *pol* kodiert, sowie mit einem weiteren,  $\psi$ -negativen *env*-Expressionsgen transfiziert. Weiterhin wurde der  $\psi$ -positive Expressionsvektor pCXL in die Zellen eingeführt. Der Expressionsvektor pCXL kodiert für die bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase. Die durch die SNV-Vektoren vermittelte Übertragung des Reportergens pCXL kann in den transduzierten Zellen mit Hilfe eines X-Gal-Assays nachgewiesen werden.

Um eine effiziente Expression von *gag*, *pol* und *env* Genen (pRD134 und pRD136) in der Verpackungszelllinie DSH-CXL zu ermöglichen, wurde ein MLV-U3-Promotor anstelle der 5'-LTR des SNV eingeführt. Weiterhin wird die Expression aller drei Gene durch das Einfügen der *adenovirus tripartite leader sequence* (AvtI) verstärkt (Sheay et al., 1993). Die 3'-LTR des SNV wurde hierbei durch eine Polyadenylierungssequenz des SV40 ersetzt.

Im Expressions-Vektor pCXL ist die Sequenz für die  $\beta$ -Galaktosidase kodierende cDNA (Lac-Z) und die für die Verpackung notwendige Verpackungssignalsequenz  $\psi$  von den LTR-Sequenzen des SNV flankiert, welche eine stabile Integration ins Zielzellgenom des Reportergenkonstruktes und somit deren Expression ermöglichen. Die resultierende Verpackungszelllinie DSH-CXL produziert SNV-Vektorpartikel, die in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Diese besitzen ausschließlich das *wt*-Env-Protein und können das Reporterogen (Lac-Z) nur in für SNV permissiven Zellen, wie z.B. D17 übertragen.

Um SNV-Zelltargeting-Vektoren herzustellen, deren Tropismus auch auf SNV-Rezeptor negative Zellen (z.B. Zellen humaner Herkunft) ausgeweitet ist, wird das Expressionsplasmid pTC53 in die DSH-CXL Zellen transfiziert. Der gesamte, für die SU-Domäne des SNV-Env-Proteins kodierende Genbereich in

dem Expressionsgen pTC53 wurde durch einen Spacer ersetzt, so dass ein Ligand oder ein Antikörperfragment in diesen eingeführt werden kann. Die anschließende Transfektion dieses Konstrukts in die Verpackungszelllinie DSH-CXL führt zur Produktion von Virionen. Dessen Oberfläche trägt sowohl ein Wildtyp-Env-Protein, das für die effiziente Transduktion notwendig ist (Chu and Dornburg, 1997), als auch ein Fusions-Protein, das aus dem jeweiligen Liganden und der TM-Region des SNV-Env-Proteins besteht.

Die Transduktionseffizienz des SNV-Zelltargetingsystem ist dem MLV-System überlegen, doch ist die biochemische Charakterisierung des SNV bei Weitem noch nicht abgeschlossen. Beispielweise konnte die Funktion des wt-Env-Proteins bei der scFv-vermittelten Transduktion und auch molekulare Mechanismen des viralen Eintritts in die Zielzelle bisher nicht geklärt werden.

#### **1.4 Mechanismen viraler Zelleintritt und Membranfusion**

Behüllte Viren dringen in die Zielzelle durch Membran-Fusion ein. Dabei spielt das Oberflächen-Hüllprotein der Hülle eine entscheidende Rolle. Man unterscheidet zwei Mechanismen der durch die viralen Glykoproteine vermittelten Fusion. Die erste Gruppe bilden Viren, deren Oberflächen-Hüllproteine nur unter saurem pH-Wert eine Fusion mit der zellulären Membran eingehen können, es sind unter anderen die Hüllproteine des Influenza Virus (Hämagglutinin) und des *vesicular stomatitis virus* (G-Protein), welche durch Endozytose in die Zelle gelangen. Die nachfolgende Fusion mit der endosomalen Membran wird durch das Hüllprotein gesteuert (White, 1990). Die zweite Gruppe bilden Viren, deren Oberflächen-Hüllproteine auch unter neutralem pH die Membran-Fusion einleiten können. Die meisten Retroviren gehören zu dieser Gruppe (McClure et al., 1990). Der Eintritt in der Zelle erfolgt durch direkte Fusion der zellulären und viralen Membran.

Die Fusion wird durch die Bindung des löslichen Oberflächen-Hüllproteins (SU) an den spezifischen zellulären Rezeptor initialisiert. Anschließend findet eine durch die Konformationsänderung bedingte Freisetzung des Fusionpeptides statt. Diese 20 Aminosäuren lange hydrophobe Sequenz am N-Terminus des

TM dringt anschließend in die zelluläre Membran ein. Im Fall des Influenza Virus (Hoffman et al., 1997) bindet die Hämagglutinin Domäne HA1 an die Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche, was zu der Internalisierung des Virus in die Endosomen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose führt. In Endosomen bewirken die niedrigen pH-Werte die Konformationsänderung in der HA1- und der mit HA1 assoziierten HA2-Domäne, was in einer Translokation des Fusions-Peptides des HA2 und somit in dem Durchdringen der zellulären Membran resultiert. Dabei ist die Reorganisation der so genannten *heptad repeat sequence* von HA2 in die trimär organisierte „*coiled coil*“-Struktur ein wichtiger Schritt des Fusionsvorgangs (Bullough et al., 1994; Qiao et al., 1998). Ähnliche Mechanismen der Fusion wurden auch für andere behüllte Viren angenommen. So befindet sich die *heptad repeat sequence* auch im HIV1-TM (*human immunodeficiency virus*) (Chan et al., 1997) und im MLV-TM-Protein (Fass et al., 1996).

Studien, die sich mit den Mechanismen des viralen Eintritts und der Membranfusion beschäftigt haben, fokussierten sich überwiegend auf die Rolle der Ectodomäne des TMs, während eine mögliche Beteiligung des cytoplasmatischen Teils von TM an der Regulation der fusogenen Aktivität der Ectodomäne noch nicht intensiv untersucht wurde. Die ersten Hinweise auf so eine mögliche Beteiligung der cytoplasmatischen Domäne des TM-Proteins lieferte die Beobachtung, dass nach der Passage von SIV (*simian immunodeficiency virus*) auf humanen Zelllinien eine Virus-Variante mit einem verkürzten cytoplasmatischen Teil des TMs selektioniert wurde (Chakrabarti et al., 1989; Hirsch et al., 1993). Weitere Studien zeigten, dass die Verkürzung des cytoplasmatischen Teils von SIVagm239 die Fusionsaktivität des Virus drastisch erhöht (Ritter et al., 1993; Zingler and Littman, 1993).

Seit 1981 (Green et al., 1981) ist es bekannt, dass das MLV-TM-Protein im cytoplasmatischen Teil durch die virale Protease während des Partikel-Zusammenbaus prozessiert wird. Kurz davor oder während der Virus-Knospung wird durch die virale Protease ein 16 Aminosäurenreste langes Peptid (R-Peptid) von dem C-Terminus des TMs abgespalten, was zur Entstehung des TM-P12E führt. Dabei sind beide Formen P15E und P12E in den reifen Virionen

vorhanden (Januszeski et al., 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Abspaltung des R-Peptides von dem TM-Protein entscheidend für die Aktivierung der Fusionsaktivität des Env-Proteins bei MLV ist. Wird anstelle von Vollängen-Env-Protein eine um das R-Peptid trunkierte Version in den für MLV-Rezeptor positiven Zellen in Abwesenheit von anderen viralen Proteinen exprimiert, so bilden die Zellen große, unter dem Lichtmikroskop gut sichtbare Synzytien (Ragheb and Anderson, 1994; Rein et al., 1994; Yang and Compans, 1997).

Außerdem wurde die Aktivierung der fusogenen Eigenschaften des Env-Proteins auch für *Mason-Pfizer monkey virus* (MPMV) und für *equine infectious anemia virus* (EIAV) (Rice et al., 1990; Sodroski et al., 1986) gezeigt. Die Spaltstelle des R-Peptides in der cytoplasmatischen Domäne dieser Env-Proteine wurde mit Hilfe von Sequenz-spezifischen Antikörper bestimmt (Cohen and Melikyan, 2001; Fielding et al., 2000; Green et al., 1981; Melikyan et al., 2000; Schultz and Rein, 1985). Auch Expressionskonstrukte, die die verkürzten Varianten der HIV1-, HIV2- und SIV-Env-Proteine darstellten, verstärkten die Fusogenität und Infektiosität (Mulligan et al., 1992; Zingler and Littman, 1993). Die funktionelle Rolle der proteolytischen Spaltung des R-Peptides in der Aktivierung der Fusion wurde außerdem für das Env-Protein des GALV demonstriert (Fielding et al., 2000; Forestell et al., 1997).

## 1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Hämatopoetische Stammzellen stellen eine für den Transfer von therapeutischen Genen wichtige Zielzellpopulation dar. In den meisten Fällen wird der Gentransfer unter *ex vivo* Bedingungen durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erzeugung retroviraler Zelltargeting-Vektoren, die spezifisch humane CD34-positive Stammzellen transduzieren können. Die Spezifität dieser Vektoren sollte durch einen gegen CD34 gerichteten einkettigen Antikörper (scFv), der auf SNV-Vektoren präsentiert wird, erzielt werden. Weiterhin sollte ein Protokoll für die Transduktion von humanen Stammzellen mit diesem SNV-abgeleiteten Vektor etabliert werden. Anschließend sollte in einer Mischkultur-Experiment-Reihe untersucht werden,

ob solche Vektoren CD34-positive von CD34-negativen Zellen während der Transduktion unterscheiden können. Das wäre die wichtigste Voraussetzung für die Anwendung dieser Vektoren in einer *in vivo* Gentherapie.

Darüber hinaus sollte die biochemische Charakterisierung des SNV-basierten Targeting-Systems durchgeführt werden, um die molekularen Mechanismen des viralen Eintritts besser zu verstehen. Im zweiten Teil der Arbeit sollte daher das Env-Protein von SNV auf das Vorhandensein des R-Peptids und seine mögliche Rolle bei der Fusion der viralen und der zellulären Membranen vergleichend mit den anderen  $\gamma$ -retroviralen Env-Proteinen untersucht werden. Außerdem sollte ein quantitativer Assay für den Nachweis der durch die verschiedenen Env- Proteine vermittelten Fusion etabliert werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien und Methoden der Molekularbiologie

#### 2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Techniken ist es möglich, spezifische Nukleotidsequenzen der genomischen DNA, Plasmid- oder cDNA zu amplifizieren (Mullis et al., 1986; Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Das amplifizierte Fragment kann anschließend für weitere Klonierungsschritte eingesetzt werden. Eine aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus* stammende DNA-abhängige DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten) hat ihr Temperaturoptimum bei 72° C. Bei geeigneten Pufferbedingungen, zwei Primern (Starter-Oligonukleotide), Desoxynukleotiden und richtig gewählten Zyklusbedingungen ist es mit Hilfe von Taq-Polymerase möglich, das zwischen den zwei Primern liegende Nukleotidfragment zu amplifizieren.

Eine Standard PCR (100 µl) enthält:

1x PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,8; 50 mM KCl;  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Gelatine)  
je 1-2 µM (+)Primer und (-)Primer  
200 µM je Desoxynukleotid  
2,5 Einheiten Taq-Polymerase  
0,1 µg Plasmid DNA mit der zu amplifizierenden  
Nukleotidsequenz

PCR-Bedingungen:

94° C / 2 min; 94° C / 1 min, 55-60° C / 1 min, 72° C / 1,5 min, 30 Zyklen;  
72° C / 10 min und dann bis 4° C abkühlen.

Die PCR Reaktionen für die Amplifikation von großen Fragmenten (z. B. komplettes Oberflächen-Hüllprotein) wurden mit Hilfe von *proof-reading* DANN-

Polymerase mit 3'-Exonuklease-Aktivität (Boehringer-Mannheim, Mannheim) durchgeführt.

### 2.1.2 Plasmide und Vektoren

Das Plasmid pTC53-antiCD34, das für die Entwicklung von chimären [SNV(scFv-Env)]-Vektoren benötigt wurde, und das Plasmid pRD134, das für *wt* Env-Protein von *spleen necrosis virus* (SNV) kodiert, sind von Prof. Dornburg (Thomas-Jefferson-University, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt worden. Um Verpackungszellen nach einer stabilen Transfektion mit dem pTC53-antiCD34 Plasmid selektionieren zu können, wurde noch eine Antibiotikumresistenz-Kassette (Zeo) in das Plasmid integriert, so daß das resultierende Plasmid pTC53-antiCD34-zeo den Zellen eine Resistenz gegen der Zeocinbehandlung nach der Transfektion verleiht. Hierzu wurde mittels rekombinanter PCR aus dem Vektor pZeoSV2 (+/-) der Firma Invitrogen (NV Leek, Niederlande) eine Zeocin-Kassette amplifiziert und an den 5'- und 3'-Enden mit den Restriktionsschnittstellen für Nde I versehen, so dass die Kassette anschließend in den Nde I restringierten Anteil des pUC19-Rückgrades des pTC53 eingeführt werden konnte.

Das Plasmid pALF-PERV A, das für das Env-Protein des endogenen Retrovirus des Schweins Typ A (PERV A) kodiert, ebenso wie das Plasmid pALF-PERV B, das für das Env-Protein des endogenen Retrovirus des Schweins Typ B (PERV B) kodiert, wurden von Prof. Takeuchi, (Chester Beatty Laboratories, London, UK) und von Dr. Czauderna (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) zu Verfügung gestellt.

Die Plasmide pRD134- $\Delta$ R, pALF-PERVA- $\Delta$ R und pALF-PERVB- $\Delta$ R, die die genetische Informationen über die C-terminal trunkeerte Env-Proteine tragen, wurden mit Hilfe von *QuickChange Site-Directed MutaGensis Kit* (Stratagene, La Jolla, USA) nach Herstellerangaben etabliert. Dazu wurde an der Position 1741 des pRD134 und an der Position 1930 für pALF-PERVA und pALF-PERVB Konstrukte ein Stop-Kodon eingeführt.

Das Plasmid pALF-GALV, das für das Oberflächen-Hüllprotein des *Gibbon ape leukemia virus* (GALV) kodiert, und das Plasmid pALF-GALV- $\Delta$ R, das die Information über die trankierte Variante des Env-Proteins von GALV trägt, wurden mittels PCR, nachfolgender Restriktion und Ligation in das Expressionsvektor pALF hergestellt (J. Stitz, Paul-Ehrlich-Institut, Langen), wobei das Plasmid pMOV-GALV als Matrix diente.

Die Plasmide pT7luc und pCMV-T7pol (Nussbaum et al., 1994) kodieren entsprechend für die T7 RNA-Polymerase-abhängige Luziferase und CMV-Promotor-getriebene T7 RNA-Polymerase, und wurden für die Durchführung des quantitativen Fusionsassays benutzt.

### 2.1.3 Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Alle Restriktionen wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Linearisierte Plasmide wurden mittels alkalischer Phosphatase (CIP, NEB, Schwalbach) dephosphoryliert, um Religationen zu vermeiden. Für die Dephosphorylierung wurden 10 U CIP eingesetzt und 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 75° C inaktiviert.

Restriktionsansätze der Zeo/Neo-Amplifikate ausgehend von der PCR mit Schnittstellen-Primern bzw. des Plasmids pTC53-antiCD34:

100  $\mu$ l Fragment DNA / 6  $\mu$ g Plasmid-DNA  
3  $\mu$ l Nde I (50 U)  
15  $\mu$ l Puffer 4 (NEB)  
15  $\mu$ l BSA (10x)                      ad 150  $\mu$ l Aqua bidest.

Restriktionsansätze der GALV-Amplifikate ausgehend von der PCR mit Schnittstellen-Primern bzw. des Plasmids pALF-PERVA

100  $\mu$ l Fragment DNA / 6  $\mu$ g Plasmid-DNA



3 µl Xba (50 U)  
3 µl Cla I (50 U)  
15 µl Puffer (NEB1)  
15 µl BSA (10x)                    ad 150 µl *aqua bidest.*

Die Ansätze wurden bei 37° C für 1,5 h lang inkubiert und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt. Die Ligationen der aufgereinigten Restriktionsfragmente mit der geschnittenen und dephosphorylierten Vektor-DNA erfolgte im molaren Verhältnis 2:1 mit der T4-Ligase (100 Einheiten / Ansatz), 1,5 µl Ligasepuffer (NEB) in einem Volumen von 15 µl bei 4° C über Nacht.

#### 2.1.4 Herstellung kompetenter Bakterien und deren Transformation

Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurden die *E.coli*-Stämme DH5α, Top10F' (GIBCO BRL, Eggenstein) kultiviert und mit einer nach Hanahan (Hanahan, 1983) modifizierten Methode chemisch kompetent gemacht. Hierzu wurden pro Bakterienstamm 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur (37°C) angeimpft und die Bakterienkultur bei 37°C im Schüttler bis zu einer Dichte (OD<sub>550</sub>) von 0,55 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 min auf Eis gekühlt, mit 6000 rpm bei 4°C (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) pelletiert und in 40 ml TFB1 (30 mM KOAc, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und steril filtriert) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis und einer Zentrifugation bei 4°C mit 6000 rpm wurde das Bakterienpellet in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt und steril filtriert) aufgenommen, als 100 µl-Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert. Für die Transformationen wurden 100 µl dieser kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 sec und einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit 0,5 ml SOC-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein) versetzt und bei 37°C für 1 Stunde im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert und mit der im Gefäß verbleibenden Lösung resuspendiert auf X-Gal-Platten (LB-

Medium mit 50 µg/ml Ampicillin, 50 mg/ml X-Gal und 12 mM IPTG) ausgestrichen. Die X-Gal-Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### LB-Medium + AMP

10 g/l Bacto-Tryptone

10 g/l Bacto-Hefeextrakt

10 g/l NaCl

50 mg/l Ampicillin

### **2.1.5 Plasmid-Präparation**

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mit den QIAGEN-Plasmid-Kits der Firma QIAGEN, Hilden. Für die Präparation einer geringen Menge Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer 15 ml-Übernachtskultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen lysiert und über eine Anionenaustauscher-Säule (tip-20) gereinigt. Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) wurden 200 ml Übernachtskulturen angesetzt.

### **2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Für die Größenbereiche von 0,3 - 3 kb wurden 1,5% Agarosegele verwendet. Dazu wurden 1,5 g Agarose (Gibco BRL) in 100 ml 1x TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht. Auf einem Magnetrührer wurde das noch flüssige Gel abgekühlt, mit 1-2 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) versetzt und in eine Flachbett-Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert und bei 80-120 V 1 h aufgetrennt. Die aufgetrennten DNA-Banden konnten anschließend auf einem UV-Transilluminator (302 nm) photographiert werden.

Als DNA-Größenstandard wurde 100b DNA-Leiter und 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL, Eggenstein) verwendet.

| <u>TAE-Puffer</u> | <u>DNA-Probenpuffer</u>      |
|-------------------|------------------------------|
| 40 mM Tris-Acetat | 15 % Ficoll                  |
| 1 mM EDTA         | 0,1 % Xylenblau (XL)         |
|                   | 0,075 % Bromphenolblau (BPB) |
|                   | 10 mM EDTA                   |

### 2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX™ *Agarose Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden). Die gewünschte DNA-Bande wurde nach der Auftrennung in einem präparativen Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Pro 100 mg Agarosegel wurden 300 µl QX1-Lösung und 10 - 15 µl QIAEX Glaspuder-Emulsion dazugegeben. Während einer Inkubationszeit von 10 min bei 50° C auf einem Thermoschüttler löste sich die Agarose vollständig auf und die DNA adsorbierte an den Glaspuder. Der Ansatz wurde anschließend 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 500 µl QX2-Lösung und danach mit 500 µl QX3-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet getrocknet und die DNA in 40 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Nach dem Pelletieren des Glaspuders befand sich die DNA im Überstand.

| <u>QX1-Lösung</u>                     | <u>QX2-Lösung</u>      | <u>QX3-Lösung</u>       |
|---------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| 3 M NaJ                               | 8 M NaClO <sub>4</sub> | 100 mM NaCl             |
| 4 M NaClO <sub>4</sub>                |                        | 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) |
| 5 mM Tris/HCl                         |                        | 1 mM EDTA               |
| 0,1 % Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> |                        | 70 % Ethanol            |

### 2.1.8 Nukleotidsequenzbestimmung

Alle Sequenzierungen erfolgten mit der Thermostabilen-Sequenase (Amersham) und dem automatischen DNA-Sequenzer Modell 373 A der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt). Die automatischen Sequenzierungen und Auswertungen wurden von Herrn Dipl. Ing. Martin Selbert (PEI, Langen) durchgeführt.

### 2.1.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma ARK Scientific (Darmstadt) bezogen und auf eine Standardkonzentration von 10 µM eingestellt. Zur Durchführung rekombinanter PCR wurden folgende Oligonukleotidprimer benutzt, bei denen die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen durch Unterstreichung hervorgehoben sind.

2.1.9.1 Oligonukleotide zur Klonierung der *zeo*-Resistenzgen-Kassette (Die Erkennungssequenzen des Nde I Restriktionsenzym sind unterstrichen):

ZEO2184+NDE:

5'-GGAATTCCCATATGGGAATCCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC-3'

ZEO3258-NDE:

5'-GGAATTCCATATGGGAATTCCTCAGTCCTGCTCCTCGGCC-3'

2.1.9.2 Oligonukleotide für die Herstellung der pRD134-ΔR, pALF-PERVA-ΔR und pALF-PERVB-ΔR. Die MutaGensestellen sind hervorgehoben.

SNV-ΔRal            5'-CTAGCACTAT**AG**CCACAGTACAAG-3'

SNV-ΔRal-reverse 5'-CTTGTA**CTGTGGCT**ATAGTGCTAG-3'

PERV-ΔR 5'-CAGATCATG**TAA**CTTAGGCAACAG-3'

PERV-ΔR-reverse 5'-CTGTTGCCTAAG**TTA**CATGATCTG-3'

2.1.9.3 Oligonukleotide für die Klonierung der pALF-GALV und pALF-GALV-ΔR.

GaLVwtXba+ 5'-GCTCTAGAATGGTATTGCTGCCTGCCTCC-3'

GaLVwtCla- 5'-CCATCGATTTAAAGGTTACCTTCGTTCTC-3'

GaLV-ΔRCla- 5'-CCATCGATTTACAGAATTTAACTGCACTTATC-3'.

2.1.9.4 Sequenzierprimer zur Analyse der SNV-TM DNA-Sequenz:

SNV-TM(+): 5'-CTGTGGAGCGGCTTGAACG-3'

SNV-TM(-): 5'-CCAGAGCTCCCTCCCACATTCC-3'

## 2.2 Materialien und Methoden der Zellkultur

### 2.2.1 Zellen und Medien

Adhärente Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagles Medium* ("low glucose" DMEM, GIBCO/BRL, Eggenstein) mit 10% Komplement-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS; Biochrom KG, Berlin), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) und Antibiotika (0,1 mg/ml Nystatin, 100 U/ml Penicillin, Biochrom KG, Berlin) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus) kultiviert. Zur Zellpassage wurden die Zellen mit einer 0,25% Trypsinlösung/1 mM EDTA oder mit dem Zellschaber aus den Kulturgefäßen gelöst und mit frischem Medium umgesetzt. Folgende adhärente Zelllinien wurden kultiviert:

|         |   |
|---------|---|
| HeLa    | (humane Zervixkarzinom/Adenokarzinom-Zelllinie; ATCC CCL 2)         |
| NIH 3T3 | (kontaktinhibierte embryonale Mäuse-Fibroblasten)                   |
| D17     | (Hundeosteosarkomzelllinie)   |
| TELCeB6 | (humane Medullarblastom-Zelllinie, Cosset <i>et al.</i> , 1995a, b) |
| HT1080  | (humane Fibrosarkomzelllinie)                                       |
| 293T    | (humane Nierenepithelzelllinie)                                     |
| MCF7    | (humane Mammakarzinom-Zelllinie)                                    |
| MRC5    | (humane Fibroblasten)   |

Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Eggenstein) mit 10 % FKS (KG1 $\alpha$  mit 20%), L-Glutamin und Antibiotika (KG1 $\alpha$  ohne Antibiotika) kultiviert. Folgende Suspensionszelllinien wurden verwendet:

|              |  |
|--------------|--|
| KG1 $\alpha$ | (humane CD34 positive Zelllinie)   |
| C8166        | (humane Leukämie-T-Zellen, die das defekte HTLV-1-Genom enthalten; NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Program: 404) |
| Molt 4.8     | (humane Leukämie-T-Zellen; NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Program: 175)   |

A3.01 (humane Leukämie-T-Zellen; NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Program: 166)

Die humane hämatopoetische Stammzellen (HSC) wurden nach der Aufreinigung aus dem Nabelschnurblut in X-Vivo-Medium mit 2% Bovine Serum Albumin (CellSystems), 2 mM L-Glutamin und Zytokinen-Cocktail (20 ng/ml IL-6; 50 ng/ml SCF; 100 ng/ml FLT 3-Ligand; 20 ng/ml TRP) kultiviert.

### 2.2.2 Verpackungszelllinien

Die Zelltargeting-Vektoren auf Basis des Spleen Necrosis Virus wurden in der Verpackungszelllinie DSH-cxl (Chu and Dornburg, 1995) generiert, die von der Hundeosteosarkomzelllinie D17 abgeleitet wurden. DSH-cxl-Zellen enthalten Konstrukte kodierend für Gag/Pol und Env des SNV und zusätzlich das verpackbare Konstrukt pCXL (Chu et al., 1994), das für die  $\beta$ -Galactosidase kodiert. DSH-cxl Zellen wurden in DMEM, 6% FKS, 2 mM L-Glutamin, Antibiotika und zusätzlich 0,45% Glucose kultiviert.

### 2.2.3 Präparation von HSC aus Nabelschnurblut

Die Präparation der HSC erfolgte durch eine Auftrennung über eine Ficoll-Kissen-Dichtzentrifugation (Histopaque 1077, Sigma, Deisenhofen). Der Nabelschnurblut (Landkreisklinik, Langen) wurde zu gleichen Teilen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) verdünnt und langsam auf das Ficoll-Kissen (15 ml) aufgeschichtet, ohne daß es zu einer Vermischung kam. Anschließend erfolgte die Trennung der Blutzellen durch Zentrifugation (2.300 rpm, 30 min ohne Bremse, Minifuge, Heraeus). Die HSC bildeten einen milchig-trüben Ring zwischen der oberen Serumphase und der unteren Ficollphase. Die Erythrozyten wurden sedimentiert. Die HSC wurden vorsichtig abgezogen und in ein neues Falcon-Röhrchen (50 ml) überführt. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS, um das restliche Ficoll auszuwaschen (Zentrifugation bei 1.300 rpm, 10 min). Im Unterschied zu der PBMC Präparation, wurden die HSC nicht mit

0,86% Ammoniumchloridlösung behandelt. Diese Ammoniumchlorid-Behandlung dient vor allem der Lyse der restlichen Erythrozyten.

#### **2.2.4 Separierung von CD34-positiver Zellsubpopulationen**

Die Anreicherung CD34-positiver Zellen aus einer HSC-Präparation erfolgte mittels magnetischer Zellsortierung (MACS, „magnetic cell sorting“). Das Prinzip beruht auf der Anbindung CD34-positiver Zellen an CD34-spezifische monoklonale Antikörper, welchen mit Hilfe der zweiten Antikörper an die magnetischen Kügelchen gekoppelt werden. Hierzu wurde das MACS-Zellisolationssystem der Fa. Milteny Biotec (Bergisch-Gladbach) verwendet und alle Experimente nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Damit Kontaminationen durch Pilze oder auch Mycoplasmen vermieden werden, wurden die verwendeten Zelllinien und Zellklone in flüssigem Stickstoff gelagert.

##### 2.2.5.1 Einfrieren von Zellen:

Adhärente Zellen wurden mittels Trypsinlösung von den Kulturgefäßböden gelöst und anschließend im Medium resuspendiert. Die Suspensionszellen und resuspendierte adhärenente Zellen wurden daraufhin in einer Heraeus Minifuge für 10 min bei 4°C und 1200 rpm pelletiert. Die pelletierten Zellen ( $1,5 \times 10^6$ ) wurden in 800 µl eisgekühlten Medium 1 (DMEM oder RPMI und 20% FKS) resuspendiert und in ein 2 ml-Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Nach der Zugabe von 800 µl des eisgekühlten Medium 2 (DMEM oder RPMI, 20% FKS und 20% DMSO (Merck, Darmstadt) wurden die Zellen sofort für 24 h bei -70° C eingefroren. Die permanente Lagerung erfolgte im flüssigen Stickstoff.



#### 2.2.5.2 Auftauen von Zellen:

Die in den Einfrierröhrchen befindlichen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37° C zügig aufgetaut und in ein 15 ml Gefäß überführt. Anschließend wurde langsam das vorgewärmte Nährmedium dazugegeben. Damit das zytotoxische DMSO entfernt wird, folgte eine 10 min Pelletierung der Zellen. Anschließend wurden die Zellen in den der Zellzahl entsprechenden Mengen an Medium in Kultur genommen.

### 2.2.6 Transfektionstechniken

Das Einschleusen von Fremd-DNA (Transfektion) in die eukaryotischen Zellen kann zum Einen durch die Komplexierung der DNA mit Lipidvesikeln, die anschließend in das Zytoplasma aufgenommen werden, zum Anderen durch Elektroporation erfolgen.

#### 2.2.6.1 Transfektion mittels Lipofectamin<sup>TM</sup>

Für die Herstellung stabiler Verpackungszellklone wurden die Verpackungszellen mittels des Transfektionsreagenz Lipofectamin<sup>TM</sup> (Gibco-BRL, Life Technologie, Eggenstein) transfiziert. Hierzu wurden am Vortag die entsprechenden Verpackungszellen ( $6 \times 10^5$  DSH-cxl) in 60 mm-Zellkulturschalen (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Für die Transfektion wurden 6 µg Plasmid-DNA der jeweiligen pTC53-antiCD34-zeo Konstrukte mit 100 µl serumfreiem Medium resuspendiert. In einem parallelen Ansatz wurden 10 µl des Lipofectamins mit serumfreiem Medium auf 100 µl/Ansatz verdünnt. Nach der Zugabe des DNA-haltigen Ansatzes wurde das Reaktionsgemisch geschüttelt und 30 min bei RT inkubiert, so daß die kationischen Lipide des Lipofectamins mit der DNA komplexieren. In dieser Zeit wurden die Zellen mit 2 ml serumfreiem Medium überschichtet und gewaschen. Nachdem das Liposomengemisch mit 800 µl serumfreiem Medium verdünnt wurde, erfolgte die Zugabe zu den Zellen, die anschließend im Brutschrank für 4-5 Stunden dem DNA-Liposomengemisch ausgesetzt wurden. Danach wurden die Zellen im normalen Medium für mindestens 48 Stunden kultiviert. Zur Etablierung

stabiler Verpackungszellklone wurde das Kulturmedium durch antibiotikahaltige Medien ersetzt. DSH-cxl Zellen, die mit dem pTC53-antiCD34-zeo Plasmid erfolgreich transfiziert wurden, enthielten eine Zeocin-Kassette (Invitrogen, NV Leek, Niederlande), und konnten nach 72 h mittels Zeocin-haltigem Medium (375 µg/ml) selektioniert werden.

Nach einer Selektionszeit von 14 Tagen wurden resistente Zellkolonien mit einer Eppendorfpipette von der Kulturschale abgelöst und resuspendiert. Diese Einzelzellklone wurden in 24-Lochplatten (Nunc, Wiesbaden) expandiert und im Bezug auf die Vektorproduktion mittels Titration auf geeigneten Zielzellen untersucht.

Für die Durchführung des quantitativen Luziferase-Assays und auch für die Herstellung von lentiviralen Vektoren mittels einer Trippeltransfektion, war es notwendig, mehrere Plasmide gleichzeitig und mit großer Effizienz in die Zellen zu transfizieren. Für diese Zwecke war das Lipofectamin Plus<sup>TM</sup> Reagenz (Gibco-BRL, Life Technologie, Eggenstein) am besten geeignet. Hierzu wurde  $1 \times 10^5$  293T Zellen in einer 6-Loch Platte am Tag zuvor ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde wie folgt zusammengestellt: 3 µg DNA, 30 µl Plus-Reagenz in 100 µl serumfreies Mediums. Parallel dazu wurden 5 µl Lipofectamin in 95 µl serumfreien Mediums resuspendiert. Die beiden Ansätze wurden 15 min bei RT inkubiert, dann miteinander vermischt und noch für weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz mit 800 µl serumfreien Mediums versetzt und auf die gewaschenen Zellen gegeben. 4 Stunden später erfolgte das Mediumwechsel.

### **2.2.7 Transduktionen und Titrations**

Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz empfiehlt sich der Einsatz von 30 µg/ml Polybren (Hexadimethrine Bromid, SIGMA, Deisenhofen). Die Rolle des Polybrens ist, die retroviralen Vektorpartikeln in die räumliche Nähe zu der Zielzelloberfläche zu bringen, um so den Viruseintritt in die Zelle zu erleichtern. Dabei kann Polybren nicht bei allen Zellen eingesetzt werden, da einige Zellen wie z.B. humane CD34-positive Zellen aus dem Nabelschnurblut gegen dieses

Reagenz empfindlich sind. In diesem Fall kann Polypren durch Protaminsulfat ersetzt werden.

#### 2.2.7.1 Transduktion von adhärenenten und Suspensionszellen.

Für die Transduktion von adhärenenten Zelllinien wurden  $2 \times 10^5$  Zellen am Vortag in einer 12-Loch Zellkulturplatte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Für die Transduktion von Suspensionszellen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurden die vektorhaltigen Kulturüberstände durch einen Mikrofilter (45µm, Sartorius) filtriert. In beiden Fällen wurde das Kulturmedium von den zu transduzierenden Zellen entfernt, anschließend wurden die Zellen mit dem vektorhaltigen Überstand der jeweiligen Verpackungszellen inkubiert.

Für Titrations von vektorhaltigen Überständen wurden Verdünnungsreihen (500 µl, 50 µl, 5 µl bzw. 1000 µl, 100 µl, 10 µl) angelegt, die dann zur Transduktion der entsprechenden Zelllinie eingesetzt wurden.

#### 2.2.7.2 Transduktion CD34-positiver Stammzellen aus dem Nabelschnurblut

Transduktion von Stammzellen erfolgte auf den mit RetroNectin<sup>TM</sup> (TAKABA Shuzo, Japan) beschichteten 12-Loch Platten (Falcon, BD Biosciences, San Jose, USA). RetroNectin<sup>TM</sup> ist ein rekombinantes humanes Fibronectinfragment, das den retroviralen Gentransfer in Säugerzellen erleichtert.

Für die Beschichtung mit RetroNectin wurden nicht zellkulturbehandelte Platten verwendet. Es wurden zunächst je  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  des im *aqua bidest.* aufgelösten RetroNectin<sup>TM</sup> pro Loch aufgetragen und bei Raumtemperatur unter der Sterilbank inkubiert. Nach 2 Stunden wurde die retronectinhaltige Lösung durch 2 ml 2% Kälberserum ersetzt und für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 2 ml *Hank's balanced salt solution* (HBSS) mit 2.5 % 1M HEPES gewaschen und mit PBS beschichtet bei 4° C gelagert.

Am ersten Tag der Transduktion wurden zunächst die Platten mit je 500 µl pro Loch des vektorhaltigen filtrierten Überstandes bei 37°C im Brutschrank preinkubiert. Nach 30 min wurde vektorhaltiger Überstand abpipettiert. Es wurde je  $2 \times 10^5$  über Nacht stimulierten CD34-positiven Zellen in 500 µl zytokinehaltigen Medium pro Loch eingesetzt und mit je 500 µl frischen vektorhaltigen Überstand resuspendiert. Im Anschluss folgte die Zugabe von 4 µg/ml Protaminsulphat. Die Transduktion erfolgte unter der Zentrifugation bei 32°C, 24 000 rpm. (Heraeus Minifuge) für 90 min. Anschließend wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 90 min Inkubation wurde Halbmediumwechsel (500 µl des Ansatzes mit 500 µl des frischen zytokinehaltigen Mediums ersetzt) durchgeführt. Das Transduktionsprotokoll wurde noch an weiteren zwei Tage wiederholt.

### **2.2.8 Klonogener Assay auf Methyl-Zellulose**

In Rahmen einer Gentherapie ist das Überleben der behandelten Zellen nach ihrer Reimplantation in Patienten eines der wichtigsten Aspekte. Mit Hilfe von klonogenem Assay ist es möglich, die Anzahl von Zellen, die nach der Behandlung lebensfähig geblieben sind, weitgehend abzuschätzen. Hierzu werden die behandelten und unbehandelten Zellen als Referenz in eine Verdünnungsreihe ( $1 \times 10^4$ ;  $5 \times 10^3$ ;  $1 \times 10^3$ ) mit dem auf 37°C vorgewärmten Methyl-Zellulose-Medium mit Hilfe einer speziellen Nadel (Cell Systems, St. Katharinen) vermischt und in 30mm-Schalen ausplattiert. Die Entwicklung von einzelnen Kolonien wird in den nächsten 2-3 Wochen beobachtet, und abschließend absolute Zellzahl ermittelt. Dabei ist es wichtig, dass die Platten nicht austrocknen und das CO<sub>2</sub>-Gehalt konstant bleibt (5%). Um dies zu ermöglichen, werden jeweils drei 30 mm (2x Test; 1x Wasser) in eine 100 mm Petrischale positioniert und in den Inkubatorschrank gestellt. Am Ende des Experimentes ist der Prozentsatz von entstandenen Kolonien proportional zu der Anzahl der in dem Test eingesetzten Zellen.

### **2.2.9 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (X-Gal-Färbung)**

Der Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von Zellen in Kulturschalen wurde nach einer modifizierten Methode (Sanes et al., 1986) mittels X-Gal-Färbung erbracht. Mit dieser Methode wurde eine erfolgreiche Transduktion humaner Zellen mit den SNV-abgeleiteten Vektoren nachgewiesen. Hierbei wurde der Transfer der verpackbaren Konstrukten, die die Verpackungszellen beisteuern, mittels X-Gal-Färbung detektiert. Bei dieser Färbemethode wird X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid; Sigma, Deisenhofen) durch die  $\beta$ -Galaktosidase metabolisiert. Neben dem X-Gal [1 mg/ml] enthielt die Lösung 5 mM K-Ferricyanid (Sigma, Deisenhofen), 5 mM K-Ferrocyanid (Sigma, Deisenhofen) und 2 mM  $MgCl_2$  in PBS. Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden mit PBS, 2% Formaldehyd und 0,2% Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und mit der X-Gal-Substratlösung für 5-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anhand der intrazellulären Blaufärbung konnte die  $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen werden. Der Vektortiter konnte mittels Auszählung unter dem Lichtmikroskop ermittelt werden. Für die Transduktions-Experimente der CD34-positiven Zellen wurde der Prozentsatz transduzierter Zellen mittels Auszählung in einer Zählkammer ermittelt.

### **2.2.10 Analytische Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellpopulationen und Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Dieses analytische Verfahren wurde in dieser Arbeit genutzt, um eine Aussage über die Expression von membranständigen Rezeptoren zu treffen, wobei die Anzahl der Rezeptor-exprimierenden Zellen bestimmt wurde. Zur spezifischen Markierung der Rezeptoren wurden R-Phycocerythrin (PE) und Fluorescein (FITC)-konjugierte Antikörper verwendet. Die durchgeführten FACS-Analysen wurden an dem FACScan-Durchflußzytometer der Firma BECTON-DICKINSON von Dörte Kahlenberg (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) vorgenommen.

Die Markierung der Zelloberflächen-Proteine CD34, CD38, CD45, AC133 erfolgte mittels monoklonaler, FITC-oder PE-konjugierter Antikörper (Becton Dickenson (BD), Heidelberg; Sigma, St. Luis; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach). Die Durchführung der Markierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

## 2.3 Methoden der Proteinbiochemie

### 2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Kontrolle der Proteinexpression und zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die denaturierende Gelelektrophorese (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) nach Lämmli verwendet (Laemmli, 1970). Dabei werden die Proteine nach ihrem apparenten Molekulargewicht durch die Molekularsiebeigenschaften des Polyacrylamid-Gelsystems aufgetrennt. Es wurden 12% SDS-Polyacrylamidgele benutzt.

#### 2.3.1.1 Probenaufbereitung:

Für die Untersuchung des wt-TM wurden 30 ml des virushaltigen Überstandes von einer konfluenten Kultur der infizierten Zellen (DMEM, 10 % FKS) mittels Ultrazentrifugation (2 h bei 4°C mit einem SW28-Rotor, 28.000 rpm in einer L8-70M-UZ; Beckmann, München) pelletiert. Das Viruspellet wurde anschließend in 2x Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95°C erhitzt.

Für den Nachweis der wt-TM in den Extrakten der infizierten Zellen wurden subkonfluente Zellrasen aus großen (600 ml) Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) mit 1mM EDTA abgelöst, geerntet und lysiert.

#### Lysespuffer:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| 1 M Tris/pH 8,0       | 50 µl  |
| 5 M NaCl              | 30 µl  |
| 1 M MgCl <sub>2</sub> | 1,5 µl |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| 10% NP-40               | 100 µl   |
| 20% SDS                 | 5 µl   |
| Protease- Inhibitor-mix | 40 µl (einer 25fachen Lösung)<br>(Multicomplete™, Boeringer, Mannheim) |
| Aqua bidest.            | 773,5 µl   |

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen und mit 1 ml Lysepuffer für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Abtrennung der Zelltrümmer (2 min, 13 000 rpm, Biofuge, Heraeus) wurde ein Aliquot von 50 µl mit dem gleichen Volumen 2xProbenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

#### 2xProbenpuffer

100 mM Tris/Cl (pH 6,8)  
 200 mM Dithiothreitol (DTT)  
 4 % SDS  
 0,2 % Bromphenolblau  
 20 % Glycerin  
 10 %  $\beta$ -Mercapto-Ethanol

#### 2.3.1.2 Verwendete Protein-Molekulargewichts-Marker:

RPN 800 Full range Rainbow (Amersham, Buckinghamshire, England) [kDa]:  
 250 / 160 / 107 / 77 / 52 / 35 / 30 / 25 / 15 / 10

Die Durchführung des diskontinuierlichen SDS-PAGE erfolgte mittels einer Hoefer Gel-Apparatur (SDS-PAGE für Western-Blot-Analyse der SNV-wt-Env und (scFv-TM)-Proteine) bzw. einer Minigel/Twin-Apparatur (BioRad, München für RIPA und Coomassie gefärbten Proteingelen) nach den Angaben des Herstellers. Als Spannungsquelle diente ein Standard Power Pack P25 (Biometra).

### 2.3.1.3 Zusammensetzung der 12% SDS-Polyacrylamid-Gele

|                                | Sammelgel | Trenngel |
|--------------------------------|-----------|----------|
| Aqua bidest.                   | 7 ml      | 7,25 ml  |
| Acrylamid/<br>Bisacrylamid 30% | 1,65 ml   | 12 ml    |
| 1 M Tris (pH 6,8)              | 1,25 ml   | -----    |
| 1 M Tris (pH 8,8)              | -----     | 11,25 ml |
| 20 % SDS                       | 50 µl     | 150 µl   |
| 10 % APS                       | 50 µl     | 150 µl   |
| TEMED                          | 5,5 µl    | 15 µl    |

#### SDS-Laufpuffer (10x)

360 g Glycin  
77,5 g Tris  
ad 2500 ml Aqua bidest

### 2.3.2 Western-Blot-Analysen

Der Transfer von Proteinen auf proteinbindende Oberflächen (Towbin et al., 1979) wird in Analogie zum Nukleinsäuretransfer Western-Blotting genannt. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einer Fastblot-Apparatur (Biometra, Göttingen) nach den Angaben des Herstellers auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) (Immobilon<sup>TM</sup>-P, Millipore, Bedford) transferiert. Als Transferpuffer dienten 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol in *aqua bidest*. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurden nach dem Blotten die Membranen 1-2 h im TBST (10 mM Tris/8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) / 2% Milchpulver (Marvel) bzw. Pferde- oder Kälberserum inkubiert. Für den spezifischen Nachweis des SNV-TM wurde der monoklonale Antikörper 11A25 oder 11B118 (Cui et al., 1986) verwendet, welcher mit Block-Puffer 1:5000 verdünnt wurde. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit 1:2000 verdünnten Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Maus-IgG-Antikörpern (Sigma, Deisenhofen).



.Für den spezifischen Nachweis der SNV-TM Proteine wurde das *enhanced chemoluminescence* Verfahren (ECL) nach den Angaben des Herstellers (Amersham-Buchler, Braunschweig) angewendet. Durch die Belichtung spezieller Röntgenfilme (Hyperfilm<sup>TM</sup>-ECL; Amersham-Buchler, Braunschweig) wurden die Signale detektiert. Die Expositionszeiten lagen zwischen 5 und 120 sec.

### 2.3.3 Luziferase Assay

Für die Untersuchung der fusogenen Aktivität von Oberflächenhüllproteinen verschiedener Retroviren wurde der Luziferase-Assay durchgeführt. Dabei wird das in die zu untersuchenden Zellen transient transfizierte Luziferasegen des Glühwürmchens durch die Fusion von Zellen angesteuert, so dass es zu einer Expression von der aktiven Luziferase kommt, die mit Hilfe des Substrates Luziferin im Luminometer detektiert und gemessen werden kann (Alam and Cook, 1990).

Die transient in einer 6-Loch-Platte transfizierten Zellen wurden zunächst mit 2 ml PBS (RT) gewaschen, mit 0.25% Trypsin/PBS geerntet und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 4°C und 2000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 300 µl Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zellyse wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (5 min, 4°C, 14000 rpm) abgetrennt.

#### Zusammensetzung von Lysispuffer

500 µl 1M NNa-MES pH7.8

500 µl 1 M Tris-HCl pH7.8

10 µl 1 M DTT

100 µl 20 % Triton X-100

8.890 µl bidest. H<sub>2</sub>O

(Lagerung auf Eis)

Während der Zellyse wurden je 50 µl Assaypuffer auf eine nicht durchsichtige 96 Well Platte (Falcon, BD Biosciences, San Jose, USA) aufgetragen.

#### Zusammensetzung von Assaypuffer

625 µl 1M Na-MES pH7.8

625 µl 1M Tris-HCl pH7.8

125 µl 1M MgAcetat

313 µl ATP (40 mg/ml)

3.312 µl bidest. H<sub>2</sub>O

#### Substratlösung

1 mM Luziferin (Promega, Madison)

in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7.8

Unmittelbar vor der Messung in einem Luminometer (Micro Lumat Plus, Berthold, Bad Wildbad) wurden je 50 µl des Zelllysates in die vorgelegte Platte pipettiert. Die Zugabe des Substrates erfolgte automatisch über die dazu vorgesehenen Schläuche des Luminometers und wurde auf 50 µl Lösung pro Loch eingestellt.

### **2.3.4 Radioimmunpräzipitation (RIPA)**

Zur Detektion der Env-Proteine wurden RIPA-Analysen durchgeführt. Es wurden mit dem entsprechenden Plasmid transfizierte konfluente Zellrasen der 293T Zellen radioaktiv markiert. Hierzu wurden die Zellen für 2 h in einem Cys/Met-Mangelmedium vorinkubiert und anschließend mit 100 µCi / ml eines [<sup>35</sup>S]-*in vitro cell labelling mix* (Promix, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die radioaktiv-markierten Zellen mit eiskaltem PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen und mit 1-2 ml Lysepuffer lysiert (50 mM Tris pH 8,0; 62,5 mM EDTA; 1% NP-40; 0,4% Deoxycholat, Protease-Inhibitor-Mix, Complete™ Boeringer, Mannheim). Das Lysat wurde anschließend mit 50 µl gewaschener Protein A-Sepharose (nach Angaben des Herstellers, Sigma, Deisenhofen) für 1-2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Hierbei sollten unspezifisch an die Protein-A-Sepharose bindende Proteine entfernt werden. Zum Bilden von Immunkomplexen wurden dann zu dem

vorgereinigtem Lysat 3  $\mu$ l des SNV-TM spezifischen 11A25 Antikörpers zugegeben. Nach 1-2 h Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 50  $\mu$ l Protein-A-Sepharose. Nach einer weiteren Inkubationszeit von mindestens 2 h wurden die Protein A-Sepharose-Immunkomplexe 2x mit Lysispuffer / 150 mM NaCl und weitere 2x mit Lysispuffer gewaschen. Die Immunkomplexe wurden anschließend von der Sepharose eluiert (50 mM Tris pH 6,8, 1% SDS) und mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden fixiert (10 % Methanol, 25 % Essigsäure, 65 % Aqua bidest.), getrocknet und auf einen Röntgenfilmen (X-Omat, Kodak, New York) gelegt, der anschließend 1-2 Tage exponiert wurde.

### 3 Ergebnisse

Aufgrund der Eigenschaften der humanen Stammzellen, in verschiedenen Körperzellen des Menschen zu differenzieren, stellen diese für die Gentherapie von Erbkrankheiten eine besonders geeignete Zielzellpopulation da. Das erste Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines selektiven Gentransfers in CD34-positive humane hämatopoetische Stammzellen.

Aufgrund bereits erfolgreicher Vorversuche auf dem Gebiet des gezielten Gentransfers mit dem Milznekrose-Virus (SNV) wurde für diese Aufgabestellung ein auf SNV basierendes retrovirales Vektorsystem (Dornburg, 1995) ausgewählt. In dem entsprechendem Zelltargetingsystem wird die Zellspezifität der Vektoren von einkettigen Antikörperfragmenten (scFv; *single chain variable fragment*) bestimmt, die in die Vektorhülle als Fusionsproteine (scFv-TM) mit dem Transmembran-Hüllprotein (TM) eingebaut werden. (Chu and Dornburg, 1997; Engelstadter et al., 2000)

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung eines der wichtigsten Vorgänge der retroviralen Infektion: der Fusion der viralen und der zellulären Membran während des Viruseintritts. Hier sollte insbesondere untersucht werden inwieweit das SNV Env Protein eine proteolytische Abspaltung des C-Tails bedarf und ob dies ein generelles Mechanismus der Fusionsanleitung bei  $\gamma$ -Retroviren darstellt.

### 3.1 Herstellung und Charakterisierung von CD34-spezifischen SNV-abgeleiteten Vektoren

#### 3.1.1 Konstruktion des mit dem antiCD34-scFv modifizierten SNV Env Protein

Das [(antiCD34-TM)SNV]-Konstrukt pRD160 wurde in zwei Schritten kloniert. Hierzu wurde als erstes aus dem Plasmid pelB1-SCA9069-His6 (Baxter, Deerfield, USA) mittels PCR das antiCD34-scFv Gen amplifiziert und über SmaI Restriktionsschnittstelle in das Rückgrat von pRD15 (ein pUC19 Derivat) eingesetzt. Daraus resultierte das Plasmid pRD159. Nach einer Sequenzierung über den Leserahmen und den Klonierungsschnittstellen zwecks der Überprüfung der fehlerfreien Klonierung wurde das Plasmid pRD159 mit den Restriktionsenzymen Eco47III und HinCII geschnitten. Das resultierende Fragment mit einer Größe von etwa 1000 bp wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und in das mit NaeI geschnittene Rückgrat des Plasmids pTC 53 kloniert. Es resultierte das Plasmid pRD160. (Abb. 1)



**Abb. 1 Schematische Darstellung des vom SNV-env-Gen abgeleiteten antiCD34-Expressionsplasmids pRD160.**

Die kodierende Region umfasst neben der Leadersequenz des SNV-env (Id) eine scFv-Domäne in Fusion mit dem Transmembran-Hüllprotein (TM) des SNV. Die für die antiCD34scFv kodierende cDNA ist mittels der Restriktionsendonuklease *NaeI* eingeführt. Die Sequenz der natürlichen Proteasespaltstelle zwischen SNV-SU und TM wurde mutiert, so dass keine Proteasespaltung in Säugerzellen erfolgt. MLV-P: MLV-Promotor; Avtl: Adenovirus tripartite Leadersequenz; SV40-pA: Polyadenylierungssignal des SV40 Virus.

### 3.1.2 Etablierung stabiler Verpackungszellklone für die Produktion hochtitriger anti-CD34 SNV-Vektorstocks

Für die Untersuchung der Zelltargeting-Eigenschaften von [(antiCD34-TM)SNV]-Vektoren war es notwendig, hochtitrige Vektorpräparationen herzustellen. Es wurde bereits gezeigt (Engelstadter et al., 2000), daß die Verwendung stabiler Verpackungszellen für das SNV-Targeting essentiell ist. Hierzu sollte das Plasmid pRD160 zusammen mit einem geeigneten eukaryotischen Selektionsmarker gen in die scFv-TM negative Verpackungszelllinie DSH-cxl eingebracht werden. Für diesen Zweck wurde mittels PCR aus dem Vektor pZeoSV2 (+/-) (Invitrogen; Leek, Niederlande) die Zeocin-Resistenzgenkassette amplifiziert und am 5'- und 3'-Ende mit der Restriktionsschnittstelle *Nde*I versehen. Dieses Fragment wurde anschließend in das *Nde*I restringierte Plasmidfragment des Plasmids pTC160 eingesetzt (Jiang et al., 1998) (Abb. 2)



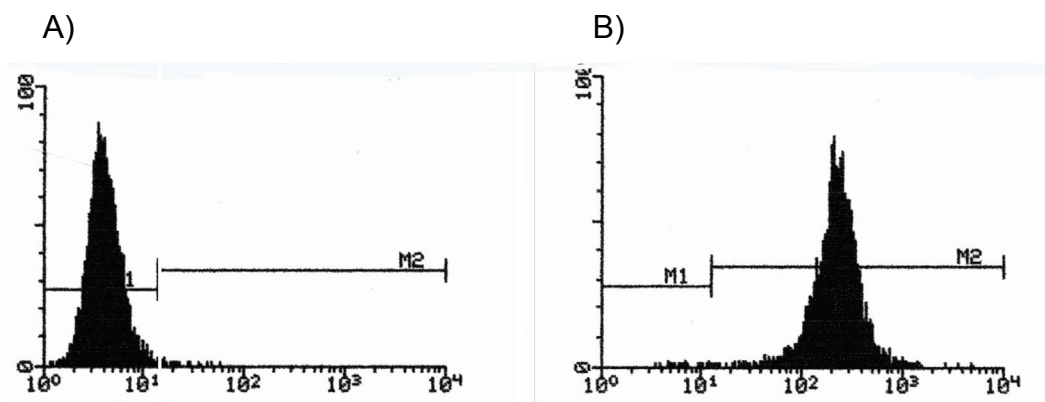
**Abb. 2. Schematische Darstellung des pRD160 (antiCD34-TM)-Expressionsvektors.**

ZeoR: Zeocin-Resistenzgen; Avtl: Adenovirus tripartite Leadersequenz; ld: SNV-Env-Leadersequenz; TM: kodiert für die Transmembran-Domäne des SNV-Env; SV40-pA: Polyadenylierungssignal des SV40 Virus.

Anschließend wurde das Plasmid pRD160-Zeo mittels Lipofectamin in die Verpackungszelllinie DSH-cxl transfiziert. Hierzu wurden  $6 \times 10^5$  DSH-cxl Zellen mit 6  $\mu$ g Plasmid-DNA des pRD160-Zeo nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium abgezogen und zur Selektion stabiler Transfektanden durch Zeocin-haltiges (375  $\mu$ g / ml) Medium ersetzt. Nach 10

Tagen Zeocin-Selektionsdruck wurden etwa 60 Zeocin-positiven Zellklone identifiziert, geerntet und herangezogen.

Die Zellkulturüberstände der Zeocin-resistenten Einzelzellklone wurden dann hinsichtlich ihrer Transduktionseffizienz auf der CD34-positiven KG1a-Zelllinie getestet. Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  KG1a-Zellen mit 1000  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 10  $\mu$ l Kulturüberstand der stabilen Verpackungszellklone in 1000  $\mu$ l Gesamtvolumen in Gegenwart von 20  $\mu$ l/ml Polybren 2h inkubiert. Gleichzeitig wurden  $1 \times 10^5$  KG1a-Zellen auf ihre CD34-Expression mittels FACS Analyse mit anti-CD34 PE-gekoppelten Antikörpern überprüft. Zum Zeitpunkt der Transduktion waren die KG1a-Zellen zur 98,5% positiv für die Oberflächenexpression des CD34-Moleküls (Abb. 3)



**Abb. 3: Expression von DC34-Molekül auf KG1a Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion mit SNV -Vektoren.** Expression von CD34 Oberflächen-Molekül wurde durch Inkubation von KG1a Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten anti CD34 Antikörpern im FACS analysiert. Probe A ist Isotypkontrolle inkubiert mit Maus IgG PE-gekoppelt als Blindprobe. Probe B ist der Testansatz inkubiert mit murinen anti-CD34 Antikörpern (PE). 98,5 % der KG1a Zellen sind in FACS für die Oberflächenexpression von CD34-Molekül positiv.

Der Nachweis der transduzierten Zellen erfolgte nach 48h mittels X-Gal-Tests. Als Kontrolle für eine effiziente Vektorproduktion wurden die Überstände aller Verpackungszellklone parallel auf den für SNV-permissiven D17-Zellen titriert.

Die Vektortiter lagen dabei in allen Experimenten bei  $>10^6$  i.E./ml. Die auf den KG1a-Zellen gemessenen Vektortiter variierten zwischen  $10^2$  bis  $10^5$  i.E./ml. Den höchsten Titer zeigten die Verpackungszellklone 11 und 32. Diese wurden zur weiteren Untersuchung der Zielzellspezifität und zur Produktion des hochtitrigen Vektorstocks herangezogen.

Im Einzelnen wurden weitere Transduktionsexperimente mit verschiedenen Zelltypen durchgeführt, um die Zielzellspezifität der Vektoren zu ermitteln. Weiterhin wurden Versuche unternommen, auch primäre humane Stammzellen mit diesem Vektor zu transduzieren. Dabei sollte untersucht werden, ob ein spezifisches Zelltargeting unter Bedingungen, die sich *in vivo* Situation ähneln, nämlich in einem Gemisch von  $CD34^+$  und  $CD34^-$  Zellen, möglich ist. Schließlich wurde evaluiert, ob transduzierte  $CD34^+$  primäre Zellen ihr Differenzierungspotential nach der Transduktion behalten.

### **3.1.3 Transduktion verschiedener humanen Zelllinien mit dem [(antiCD34-TM)SNV] -Vektor**

Im Folgenden wurden zunächst der Tropismus, die Transduktionseffizienz und die Selektivität des [(antiCD34-TM)SNV]-Vektors untersucht. Hierzu wurden je  $2 \times 10^5$  KG1a Zellen als Positivkontrolle, die humanen T-Zelllinien Molt 4.8, C8166, sowie je  $1 \times 10^5$  Zellen der Zervixkarzinomzelllinie HeLa, der Nierenepithelzelllinie 293T, der Fibrosarkomzelllinie HT1080, der humanen Osteosarkomzelllinie Ghost CD4 und der Ratten Epitheltumorzelllinie GH mit 500  $\mu$ l, 50  $\mu$ l und 5  $\mu$ l [(antiCD34-TM)SNV]-Vektorhaltigem Überstand in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l in Gegenwart von 20  $\mu$ g/ml Polybren 1,5-2 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die oben genannten Zellen auf die gleiche Weise mit dem Überstand der untransfizierten DSH-cxl Verpackungszelllinie transduziert. Der Kulturüberstand dieser Zellen enthält Vektoren, die nur das SNV-*wt*-Env-Protein auf ihrer Oberfläche tragen und somit D17-Zellen nicht aber humane Zellen infizieren. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Vektorproduktion wurden beide Überstände auf D17-Zellen titriert. Zum Nachweis der Transduktion wurden die Zellen nach 48 h fixiert und einer X-Gal-Färbung unterzogen. Die Zahl der blauen Zellen nach der



Durchführung der X-Gal Färbung, bezogen auf die Gesamtzahl der in den Test eingesetzten Zellen, wurde in der Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1. Transduktion verschiedener humaner Zelltypen mit wt und [(antiCD34-TM)SNV]-Zelltargetingsvektor.**

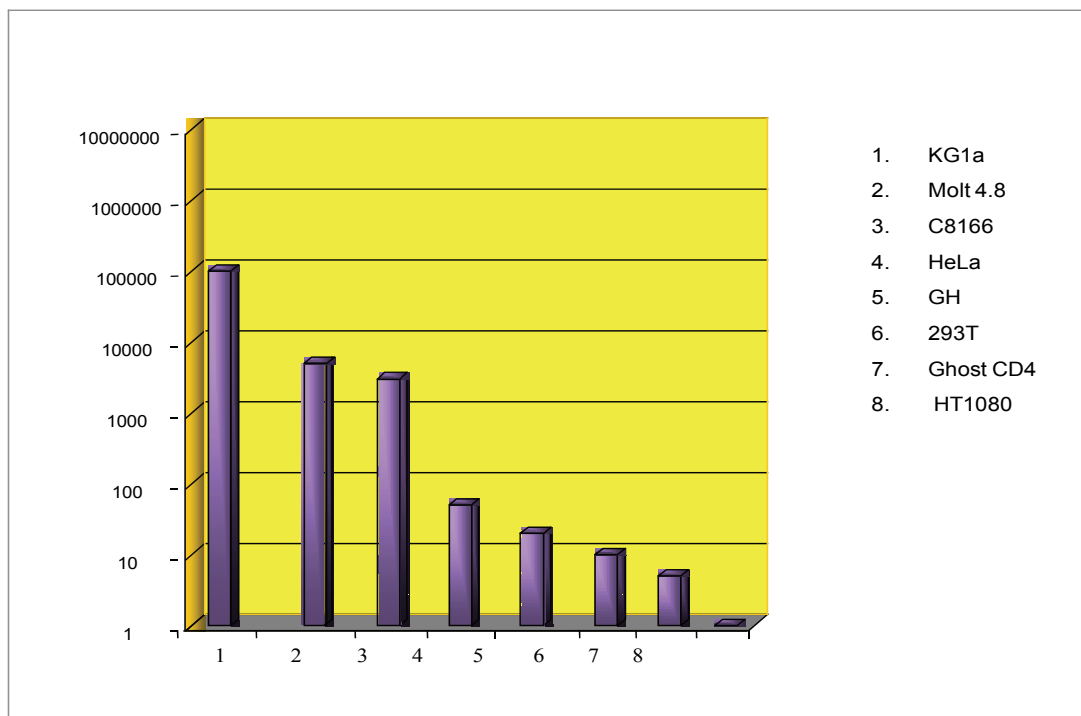
| Vektor-Typ         | KG1a   | Molt 4.8 | C8166  | HeLa   | HT1080 | Ghost CD4 | GH     | 293T   | D17   |
|--------------------|--------|----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|-------|
| [(antiCD34-TM)SNV] | 50%    | 0,25%    | 0,15%  | <0,01% | <0,01% | <0,01%    | <0,01% | <0,01% | 100 % |
| wt-SNV             | <0,01% | <0,01%   | <0,01% | <0,01% | <0,01% | <0,01%    | <0,01% | <0,01% | 100 % |

Transduktionseffizienz dargestellt in Prozentsatz von transduzierten Zellen bezogen auf die absolute Zahl der im Test eingesetzten Zellen.

Die Transduktionseffizienz des Wildtyp (*wt*)-Vektors und des [(antiCD34-TM)SNV]-Vektors auf D17-Zellen lag in beiden Fällen bei 100%. Erwartungsgemäß waren aber humane Zellen für den *wt*-Vektor unzugänglich. Die Transduktionseffizienz befand sich hier im Bereich des Hintergrundrauschens. Dagegen transduzierten die von antiCD34-DSH-CXL-Zellen stammenden Vektoren die CD34 positiven KG1a Zellen zu 50%. Zellen der Linien Molt4.8 sowie C8166, die im FACS für das Vorhandensein des CD34-Moleküls auf der Oberfläche negativ sind, wurden nur mit geringer Effizienz transduziert. Die in der Abb. 4 zusammengefassten Ergebnisse der Transduktionsexperimente mit dem vektorhaltigen Kultur-Überstand der Verpackungszelllinie DSH-CXL-antiCD34-scFv zeigten, dass CD34-positive Zellen, hier KG1a Zellen (Abb. 4 Balken 2) mit einem absoluten Titer von  $1 \times 10^5$  i.E./ml transduziert wurden.

Der bei der Transduktion von humanen T-Zellen (Abb. 4, Balken 3 und 4) mit [(antiCD34-TM)SNV]-Vektor erreichte Titer variierte dagegen zwischen  $3 \times 10^3$  und  $6 \times 10^3$  i.E./ml. Im Gegensatz dazu konnten HeLa-Zellen, Ghost CD4, GH-Zellen, 293T-Zellen und HT1080-Zellen (Abb. 4, Balken 5, 6, 7, 8, 9) kaum oder

nur mit einem geringen Hintergrundtiter (HeLa: <100 i.E./ml) transduziert werden.



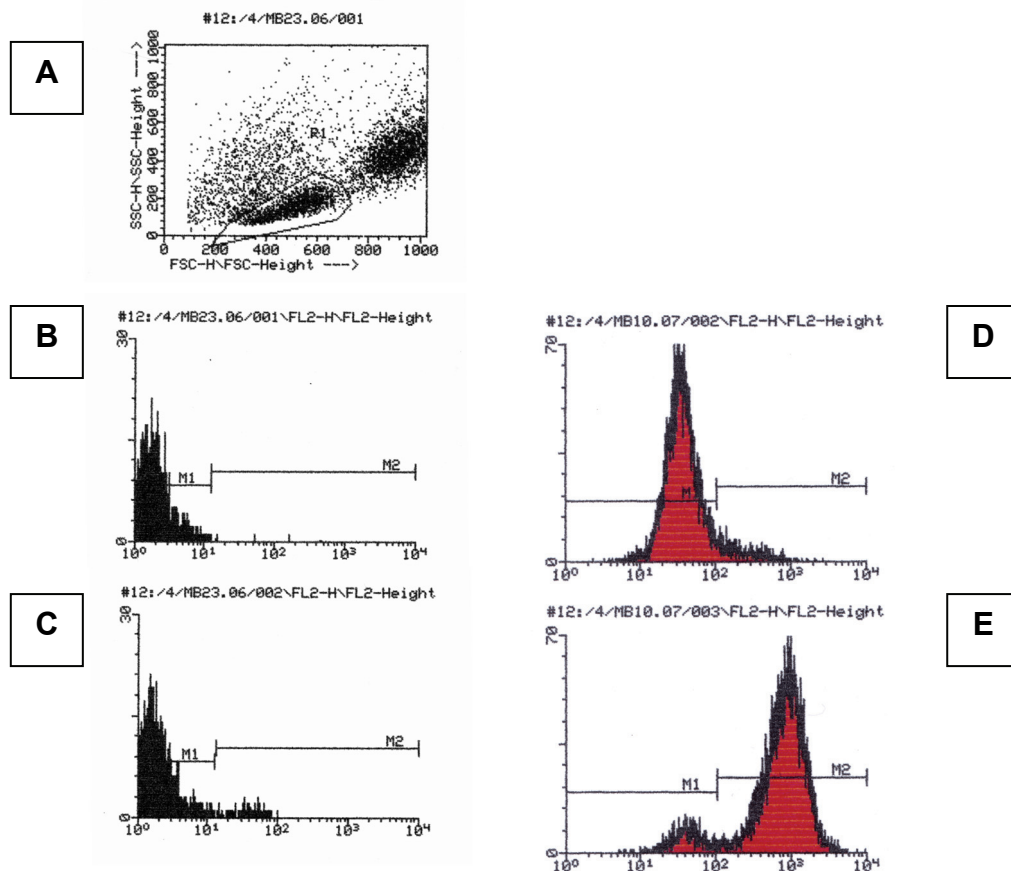
**Abb. 4 Transduktion verschiedener humaner Zelltypen mit [(antiCD34-TM)SNV]-Vektor.** Die absolute Zahl der nach der X-Gal-Färbung positiven (blauen) Zellen bezogen auf der Gesamtvolumina des im Test eingesetzten vektorhaltigen Kulturüberstandes der Verpackungszellen antiCD34-DSH-CXL wurde zur Ermittlung des Vektortiters benutzt

Die Ergebnisse zeigten, dass der [(antiCD34-TM)SNV]- Vektor eine Selektivität für humane CD34 positive Zellen bei der Transduktion besaß. Die Transduktionseffizienz des Vektors für CD34-positive Zellen war fast 100-fach höher als für T-Zellen und 1000fach höher als für die Zellen nicht hämatopoetischer Herkunft.

### 3.1.4 Transduktion primärer CD34 positiver Stammzellen aus Nabelschnurblut und PBMC

Ein wichtiger Aspekt für den Einsatz retroviraler Vektoren in der Gentherapie ist die Transduktion primärer humaner Zellen. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob der [(antiCD34-TM)SNV]-Vektor die Transduktion primärer CD34-positiver Stammzellen ermöglicht. Für diesen Zweck wurden

PBMC mittels Sucrosedichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll-Histopaque, Sigma, München) aus dem Nabelschnurblut humaner Spender isoliert. Anschließend wurden die CD34-positiven Zellen mittels MACS angereichert. Hierbei wurden CD34-positive Zellen mittels magnetischen Beads (DynaBeads®, Invitrogen, Carlsbad, USA), an welche CD34-spezifischen Antikörper gekoppelt waren, von der CD34-negativen Population getrennt. Dabei adhären die CD34-positiven Zellen an die Beads, während sich die CD34-negativen Zellen im Durchfluss befinden.



**Abb. 5: FACS-Analyse der primären Zellen vor und nach der MACS Anreicherung mit antiCD34-Antikörper (PE).**

Expression von CD34 Oberflächen-Molekül wurde durch Inkubation von primären Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten anti CD34 Antikörpern im FACS analysiert. A ist Gesamtdarstellung der zu analysierenden Zellen. B) Isotypkontrolle inkubiert mit Maus IgG PE-gekoppelt als Blindprobe. C) der Testansatz vor magnetische Separation inkubiert mit murinen anti-CD34 Antikörpern (PE). 4% der primären Zellen aus Nabelschnur exprimierten das CD34 Molekül. D) Nicht an die Säule gebundener Zell-Fraktion nach der MACS Separation. E) An die MACS Säule gebundene Zell-Fraktion detektiert mit anti-CD34 Antikörpern (PE). 89 % der Zellen in dieser Fraktion exprimierten CD34 Molekül.

Die Effizienz der MACS-Separation wurde mittels CD34-spezifischer Antikörper der Klasse III (keine Interferenz mit antiCD34 Antikörpern, die für die Anreicherung benutzt wurden) in der FACS-Analyse überprüft. Damit konnte gezeigt werden, dass die angereicherte CD34-Population zu 89% aus CD34-positiven Zellen bestand (Abb. 5). Die somit gewonnene CD34-Zellfraktion wurde anschließend gewaschen und über Nacht in X-Vivo-Medium mit Stammzellenfaktor (SCF), Thrombopoetin (TPO), Interleukin-6 (IL-6) und Flt-3-Ligand stimuliert.

Am nächsten Tag wurden die über Nacht stimulierten CD34-positiven Zellen mit den vektorhaltigen Überständen transduziert. Um die Transduktionsbedingungen zu optimieren wurden 4 unterschiedlichen Transduktionsansätze parallel durchgeführt. Dabei blieb die Anzahl der für die Transduktion verwendeten Zielzellen ( $1 \times 10^5$ ) sowie der verwendete Vektorstock (Titer  $5 \times 10^5$ ) immer gleich. Im Einzelnen wurden die Zielzellen bei dem ersten Ansatz während der Transduktion mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Polybren behandelt. Im zweiten Ansatz wurde alternativ Protaminsulfat (4  $\mu\text{g/ml}$ ) verwendet, das weniger zytotoxisch sein sollte als Polybren. CD34-positive Zellen wurden bei dem dritten Ansatz mit den Verpackungszellen (DSH-cxI) kokultiviert. Dies geschah mittels einer Vektor-durchlässige Membran (Transwell Platten, Promega, Madison, USA) über 2 Tage in X-Vivo Medium.

Tabelle 2. Optimierung der Transduktionsbedingungen für den Gentransfer in primäre Stammzellen.

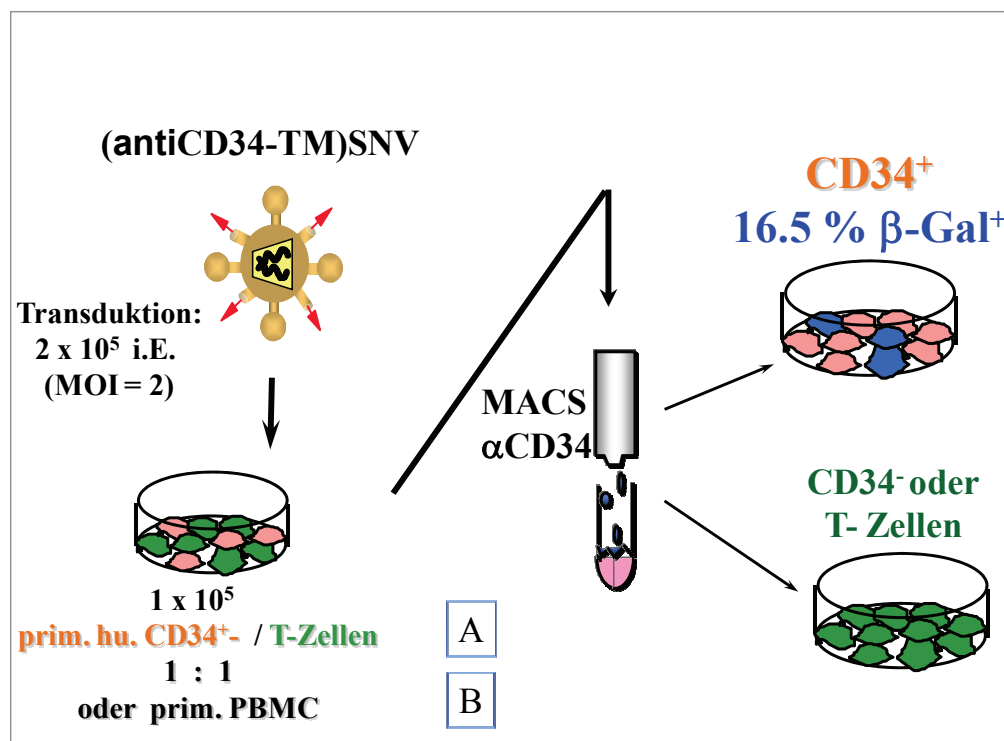
| <b>[(antiCD34-TM)SNV]-Vektor # 11</b> |                        |                      |                        |                       |
|---------------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
|                                       | <b>Protamin-Sulfat</b> | <b>Polybren</b>      | <b>Co-Kultivierung</b> | <b>Zentrifugation</b> |
| <b>Häm. CD34+</b>                     | 1,5 x 10 <sup>3</sup>  | neg.<br>(Zellen tot) | 1,4 x 10 <sup>3</sup>  | 2 x 10 <sup>5</sup>   |
| <b>Häm. CD34-</b>                     | < 10                   | < 20                 | neg.                   | < 20                  |
| <b>D17</b>                            | 5 x 10 <sup>5</sup>    | 5 x 10 <sup>5</sup>  | neg.                   | n.d.                  |
| <b>Mock</b>                           |                        |                      |                        |                       |
|                                       | <b>Protamin-Sulfat</b> | <b>Polybren</b>      | <b>Co-Kultivierung</b> | <b>Zentrifugation</b> |
| <b>Häm. CD34+</b>                     | neg.                   | neg.<br>(Zellen tot) | neg.                   | < 20                  |
| <b>Häm. CD34-</b>                     | neg.                   | neg.<br>(Zellen tot) | neg.                   | < 20                  |
| <b>D17</b>                            | 6 x 10 <sup>5</sup>    | 8 x 10 <sup>5</sup>  | 8 x 10 <sup>5</sup>    | n.d.                  |

Hämatopoetische CD34<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>-Zellen wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert. wt-ENV-Rezeptor-positive Hundeosteosarkomzelllinie D17 diente als Positivkontrolle für die Vektor-Produktion. Es wurde mit einer MOI = 1 transduziert (1 x 10<sup>5</sup> Zellen/ 5 x 10<sup>5</sup> i.E.)

Wie aus der Tabelle 2 entnommen werden kann, wurden in mit [(antiCD34-TM)SNV]-Vektoren behandelten Ansätzen  $\beta$ -Galactosidase-positive Zellen (blaue Färbung) gefunden. Ausnahme stellte der Ansatz 2 da, bei dem Polybren als Transduktionsvermittler eingesetzt wurde. In diesem Ansatz konnten keine blaugefärbten Zellen detektiert werden, was vermutlich auf allgemein schlechten Zustand der primären Zellen infolge der Polybren-Behandlung zurückzuführen war. Der höchste Prozentsatz an transduzierten hämatopoetischen Zellen wurde bei der Transduktion mit der gleichzeitigen Zentrifugation erreicht. Hier erreichte die Zahl der transduzierten Zellen 2 x 10<sup>6</sup>. Auch die Ergebnisse, die mit Hilfe von anderen alternativen Methoden erreicht wurden, sollten berücksichtigt werden, da solche Transduktionsbedingungen sich der möglichen Situation *in vivo*, wo es unmöglich ist ein Zentrifugationsschritt durchzuführen, nähern.

### 3.1.5 Nachweis der Zielzell-Spezifität der hergestellten Vektoren. Diskriminierungs-Experimente in gemischten Zellpopulationen

Aufgrund der Möglichkeit, den durch das Env-Protein bedingten natürlichen Zelltropismus des Vektors zu ändern, und der Tatsache, dass SNV *wt*-Virus für Menschen apathogen ist, ist der Einsatz von SNV-Vektoren im Rahmen einer humanen Gentherapie *in vivo* denkbar. Dazu muss geklärt werden, ob der Vektor, zwischen *target* und *non-target* Zellen auch in gemischten Zellpopulationen unterscheiden kann. Dies wurde wie folgt untersucht (Abb. 6).

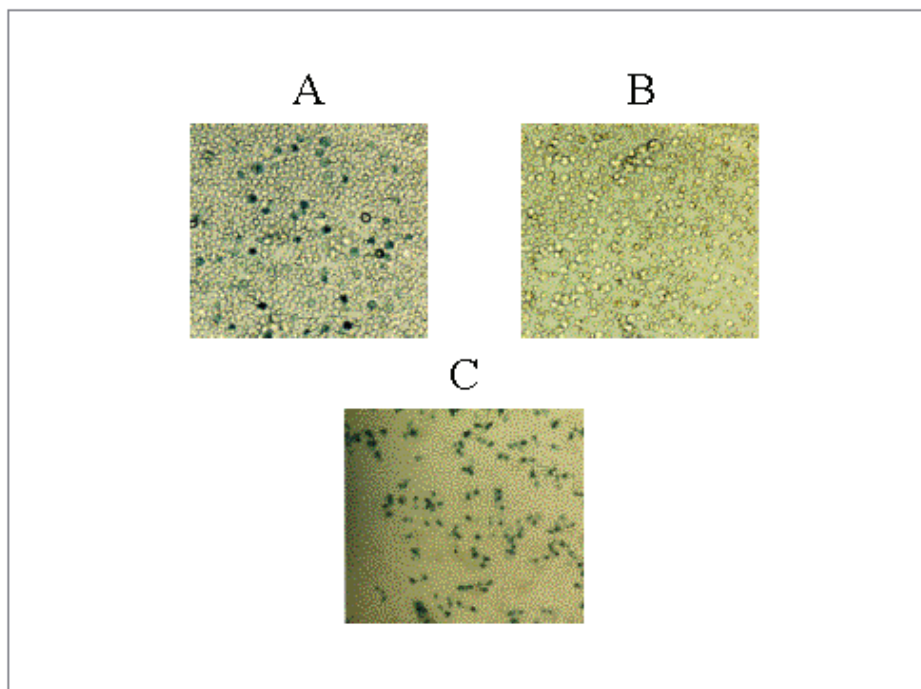


**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Experimentaufbaus.**

Analyse des Diskriminierungspotenzials der [(antiCD34-TM)SNV]-Vektoren zwischen *target* und *non-target* Zielzellen bei der Transduktion einer gemischten Zellpopulation (A) oder gesamten PBMC (B)

Hierbei wurde in dem ersten Versuch ein Zellgemisch aus humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen als „*target*“ und humanen T-Zellen als „*non-target*“ in einem Verhältnis von 1:1 hergestellt (Versuch A, Abb. 6A). In beiden Experimenten wurden 1x10<sup>5</sup> Zellen mit dem vektorhaltigen Überstand mit einer MOI=2 zwei Stunden in Anwesenheit von Protaminsulfat mit einer Konzentration von 4 µg/ml

transduziert. Nach 48 h wurde die CD34<sup>+</sup>-Zellpopulation von den CD34-negativen T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS) und der anti-CD34-Antikörper getrennt. Anschließend wurden beide Fraktionen (CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup> Zellpopulationen) auf die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase Reportergens mittels einer X-Gal Färbung untersucht (Abb. 7).



**Abb. 7. Diskriminierungsexperiment: Detektion des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase durch Substrat-Färbung mit X-Gal in den transduzierten Zellen nach der MACS-Separation** A) CD34<sup>+</sup>-Zellfraktion, isoliert über die MACS-Anreicherung mit CD34-spezifischen Antikörpern aus dem Versuch A (äquivalentes Gemisch von CD34<sup>+</sup>/T-Zellen). B) CD34<sup>-</sup>-Zellfraktion als Durchfluss bei der MACS-Anreicherung mit CD34-spezifischen Antikörpern aus dem Versuch A. C) Transduktion der D17 Zellen als Positivkontrolle für den verwendeten Vektorstock.

In dem zweiten Experiment (Versuch B, Abb. 6B) wurde die totale PBMC-Präparation eines mobilisierten Patienten, isoliert aus einem „*Buffy Coat*“ als natürliches Zellgemisch von CD34<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> Zellen, für die Transduktion mit anti-CD34scFv-Vektoren verwendet. Dabei betrug der Prozentsatz an potenziellen Zielzellen (CD34<sup>+</sup>-Zellen) in isolierten PBMC zum Zeitpunkt der Transduktion 3,5%, wie mittels einer FACScan-Analyse und spezifischen anti-CD34-Antikörper gemessen wurde. Die Transduktion wurde in zwei Ansätzen mit

unterschiedlichen Transduktionsbedingungen durchgeführt. Dabei wurden die zu transduzierenden Zellen während der Transduktion einer Zentrifugation unterzogen (Versuch B1 in der Tabelle 3) oder die Zielzellen (PBMC) wurden mit den Verpackungszellen (DSH-cxl) in speziellen 6-Loch-Transwell-Platten 2 Tage co-kultiviert (Versuch B2 in der Tabelle 3). Genau wie in Versuch A wurden die Zellen auch hier 48 h nach Transduktion mit Hilfe von MACS in CD34-positive und CD34-negative Fraktionen getrennt. Anschließend wurden die Zellen mit X-Gal Substratlösung angefärbt.

Wie die Tabelle 3 zeigt, betrug die Anzahl an CD34<sup>+</sup>-Zellen im ersten Experiment (Tab. 3, Versuch A)  $4,2 \times 10^4$  nach der magnetischen Separation. Davon wurde in  $7 \times 10^3$  Zellen das Reporter gen detektiert, was ca. 16% der gesamten CD34<sup>+</sup>-Zellfraktion entspricht. Im Durchfluss befanden sich nach der MACS-Separation  $2 \times 10^4$  CD34<sup>-</sup>-Zellen, von denen weniger als 100 Zellen (< 0,1%) transduziert worden waren.

In dem zweiten Experiment (Tab. 3 Versuch B1) wurde nach einer MACS-Separation  $4,2 \times 10^4$  CD34 positive Zellen gewonnen, davon waren  $5 \times 10^3$  Zellen für das  $\beta$ -Gal Reporter gen (12%) positiv. Dagegen betrug die Anzahl der CD34<sup>-</sup>-Zellen im Durchfluss  $7,2 \times 10^5$ , von denen  $3 \times 10^3$  Zellen (0,42%) transduziert worden waren. In dem Versuch B2 wurden nach der MACS-Separation insgesamt  $1,4 \times 10^4$  CD34-positive Zellen (Fraktion I) und  $1,6 \times 10^5$  CD34-negative Zellen (Fraktion II, Durchfluss) von den eingesetzten  $2 \times 10^5$  PBMC-Zellen gewonnen. Dabei erreichte der Prozentsatz der erfolgreich transduzierten Zellen in Fraktion I 14 %. Dagegen war der Prozentsatz der  $\beta$ -Gal positiven Zellen in der Fraktion II um das 100fache niedriger und erreichte nur 0,1 %.



**Tabelle 3. Selektive Transduktion CD34-positiver Zellen in den gemischten Populationen und in humanen PBMC**

|  | MACS im Anschluss an Transduktion |                          | X-Gal-positive Zellen       |                             |
|--|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|  | CD34 <sup>+</sup> Zellen          | CD34 <sup>-</sup> Zellen | CD34 <sup>+</sup> Zellen    | CD34 <sup>-</sup> Zellen    |
| <b>Versuch A:</b><br>CD34 <sup>+</sup> Zellen / T-Zellen | 4,2 x 10 <sup>4</sup>             | 2 x 10 <sup>4</sup>      | 7 x 10 <sup>3</sup> (16%)   | < 20 (<0,1%)                |
| <b>Versuchsreihe B: Gesamtpräparation PBMC</b>           |                                   |                          |                             |                             |
| <b>B1. Zentrifugation</b>                                | 4,2 x 10 <sup>4</sup>             | 7,2 x 10 <sup>5</sup>    | 5 x 10 <sup>3</sup> (12%)   | 3 x 10 <sup>3</sup> (0,42%) |
| <b>B2. Co-Kultivierung</b>                               | 1,4 x 10 <sup>4</sup>             | 1,6 x 10 <sup>5</sup>    | 2,3 x 10 <sup>3</sup> (14%) | < 20 (<0,1%)                |

**Versuchsreihe A:** Ein 1:1 Gemisch von CD34-positiven Zellen und CD34-negativen Zellen isoliert aus humanem Nabelschnurblut.

**Versuchsreihe B:** Ein natürliches Gemisch von CD34-positiven und CD34-negativen Zellen in Form von PBMC präpariert aus einem Leucophoresat.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die (CD34scFv-TM)SNV Vektoren aufgrund des mit anti-CD34scFV modifizierten Env-Proteins eine höhere Affinität zu den CD34<sup>+</sup>-Zellen als zu den CD34<sup>-</sup> Zellen haben. Eine Diskriminierung zwischen „target“ (CD34<sup>+</sup>) und „non-target“ (CD34<sup>-</sup>) Zellen konnte auch in gemischten Zellpopulationen mit einem Diskriminierungspotenzial von über 100 (14,2 : 0,1) gezeigt werden.

### **3.1.6 Analyse des Differenzierungspotentials der transduzierten CD34 primären Zellen mittels klonogenen Assays**

Es gibt mehrere Faktoren von denen ein Erfolg der Gentherapie *ex vivo* und *in vivo* abhängig ist. Einer davon ist der Anzahl der therapierten Zellen, die nach einer therapeutischen Behandlung ausschließlich im Organismus gedeihen und das mittels Vektoren eingebrachte therapeutische Gen exprimieren. Im Fall des Gentransfers in Stammzellen ist es daher essentiell, dass die mit retroviralen Vektoren behandelten Stammzellen ihr Potenzial, sich in verschiedene Zellen

des hämatopoetischen Systems zu differenzieren, beibehalten. Dies wurde mit Hilfe des klonogenen Assays untersucht.

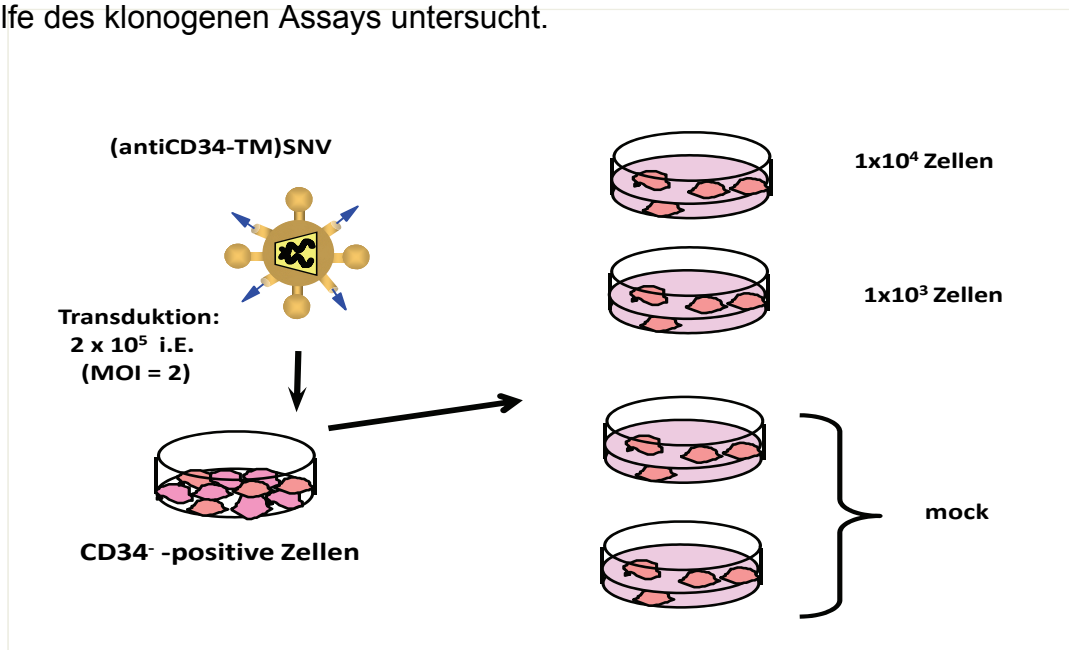
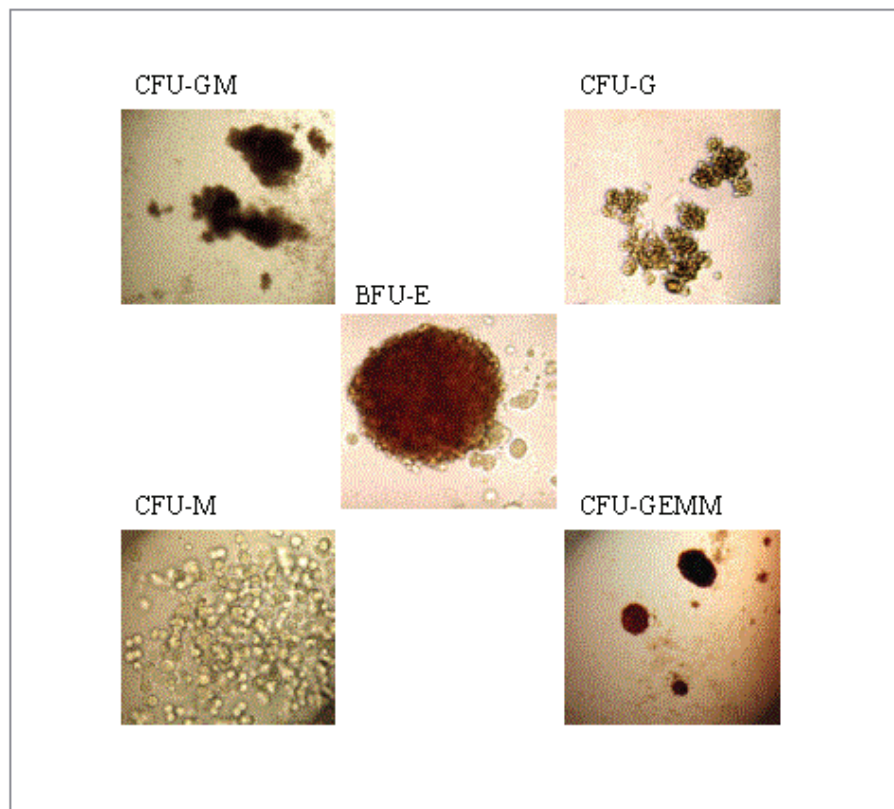


Abb. 8 Experimentaufbau für die Ermittlung klonogener Aktivität der Stammzellen nach der Transduktion mit [(antiCD34-TM)SNV]-Vektoren

Hierzu wurden  $2 \times 10^5$  humane CD34<sup>+</sup>-Zellen, isoliert aus Nabelschnurblut, über Nacht stimuliert und mit einer MOI=1 ( $2 \times 10^5$  i.E./ml) auf die mit Retronectin beschichteten Platten in Anwesenheit von 4 µg/ml Protaminsulfat bei der Zentrifugation transduziert. Anschließend wurden jeweils  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  transduzierte Zellen mit 1 ml Methyl-Zellulose-Medium versetzt und in 30 mm-Schalen ausplattiert (Abb. 8).

Die mit dem *wt*-SNV Vektor transduzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden als Negativkontrolle der Transduktion in dem Experiment mitgeführt. Der gesamte Ansatz wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt 2 Wochen lang kultiviert, wobei ein Teil der Zellen schon 72 Stunden nach der Transduktion als Kontrolle auf die β-Galaktosidase-Expression mit X-Gal Substratlösung angefärbt wurde. Daraus konnte 10% Transduktionseffizienz ermittelt werden. Nach etwa 14 Tagen bildeten sich mehreren Kolonien, die sich in Form, Größe und Farbe unterschieden.

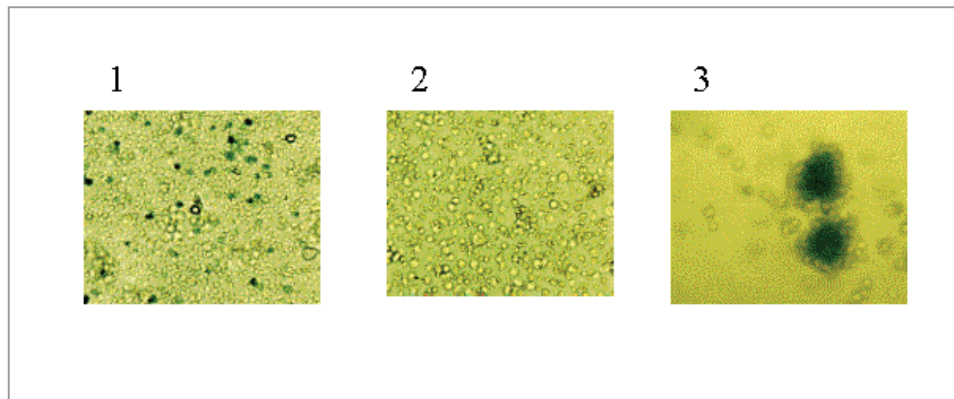


**Abb. 9 Differenzierung transduzierter Stammzellen in dem klonogenen Assay** Zweiwöchige Kultivierung in einem Methylzellulose-Medium mit Zytokinen (SCF, IL-3, Thrombopoetin, IL-6, Erythropoetin, FLT-3 Ligand). Folgende Zelltypen lassen sich morphologisch unterscheiden: BFU-E (*burst forming units* Erythrozyten), CFU-G (Granulozyten), CFU-GM (Granulozyten und Makrophagen), CFU-M (Makrophagen) und CFU-GEMM (gemischte Population an Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Makrophagen)

Desweiteren wurde die Anzahl der entstandenen Kolonien ermittelt. Als ein Vergleichswert für die Differenzierung wurde die Anzahl der aus unbehandelten CD34<sup>+</sup>-Zellen (aus derselben Nabelschnurblut-Präparation stammend) entstandenen Kolonien bestimmt.

Das Differenzierungspotenzial der Zellen ergab sich aus der Anzahl der entstandenen Kolonien und der Anzahl ausplattierter Zellen. Dabei erreichte das Differenzierungspotenzial unbehandelter CD34-positiver Zellen 42%. Die mit [(antiCD34-TM)SNV]-Vektor transduzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen differenzierten dagegen zu 29% und mit wt-SNV Vektor transduzierten CD34-positiven Zellen zu 32%.

Anschließend wurden die Zellkolonien auf die Expression des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase untersucht. Da es nicht möglich war, Zellkolonien einzeln zu isolieren und anzufärben, wurden die Methylzellulose-Schalen mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung überschichtet. Nach 5 min Inkubationszeit wurde Fixierlösung durch die Substratlösung (X-Gal-Lösung) für den Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase ersetzt.



**Abb. 10. Aktivitätsfärbung für das Reportergen  $\beta$ -Galaktosidase von [(antiCD34-TM)SNV]- Vektor transduzierten Stammzellen.** Die Anfärbung erfolgte 2 Tage nach der Transduktion.

- 1) Transduktion mit dem [(antiCD34-TM)SNV]-Vektor.
- 2) Transduktion mit dem SNV *wt*-Env-Vektor als Negativkontrolle,
- 3) Detektion von einigen blaugefärbten Zellkolonien 14 Tage nach Transduktion

Von den 10% der transduzierten Zellen am Anfang der Untersuchung (Detektion des Reportergens 72 Stunden nach Transduktion, Abb. 10/1) exprimierten nur 3 Kolonien das Reportergen  $\beta$ -Galaktosidase nach 14 Tagen (Abb. 10/3). Äquivalente Substrat-Färbung mit *wt*-SNV Vektor transduzierten Stammzellen wies keine gefärbten Zellen nach 72 Stunden (Abb. 10/2) sowie keine gefärbte Kolonien nach. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Differenzierungspotenzial von behandelten Zellen nicht entscheidend beeinträchtigt wird, während die Reportergen-Expression oder das langzeitige Überleben der transduzierten Zellen mit der Zeit abnimmt.

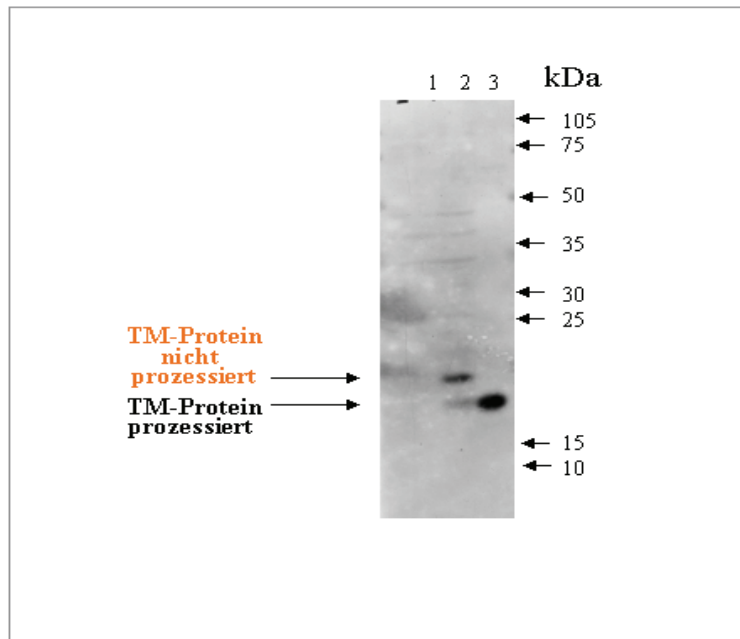
## 3.2 Charakterisierung der $\gamma$ -Retrovirus vermittelten Fusion

Um alle mögliche Risiken einer auf Retrovirus basierenden Gentherapie des Menschen abschätzen und ausschließen zu können und aber auch das Zell-Targeting effizienter zu machen, ist eine gründliche Charakterisierung des zu verwendenden Vektor-Systems erforderlich. Dabei wäre ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge beim Zelleintritt von großer Bedeutung. Bevor der Einsatz von dem auf SNV basierenden Vektor-System für die Gentherapie zwecke diskutiert werden kann, ist auch hier eine vergleichbare Untersuchung seiner biologischen Eigenschaften unabdingbar. Dabei handelt es sich unter anderem um eine biochemische Charakterisierung des Env-Proteins und den Mechanismen dadurch vermittelte Fusion beim viralen Zelleintritt.

### 3.2.1 Biochemische Charakterisierung des SNV Wildtyp Env Proteins

Für die biochemische Untersuchung des SNV wt Env Proteins wurden erstens große Menge an SNV Virus produziert. Hierfür wurden die für das *wt*-SNV-Rezeptor-positiven D17-Zellen, die einer Hundeosteosarkoma-Zelllinie abstammen, mit dem Plasmid pCG4, welches das komplette Genom von SNV trägt, transfiziert. Etablierte Infektion der D17-Zellen mit *wt*-SNV konnte mit Hilfe eines Reverse-Transkriptase-Aktivitäts-Tests (RT-Test) beobachtet und nachgewiesen werden. Die aufgereinigte HIV1 RT wurde als Positivkontrolle des RT-Tests verwendet, während der Zellkulturüberstand von untransfizierten D17-Zellen als Negativkontrolle diente. Desweiteren wurden „*large scale*“ Virus-Präparationen vorbereitet. Hierzu wurden die Überstände von infizierten Zellen gesammelt, filtriert und anschließend durch einen 25% Succrose-Kissen aufkonzentriert. Die Virus-Präparate, die auf diese Weise aus 2 l Zellkulturüberstand gewonnen werden konnten, sowie die parallel dazu hergestellte Lysate der mit SNV infizierten D17-Zellen wurden für die Western Blot verwendet. Etwa 50  $\mu$ g Protein enthaltende Proben wurden erst durch eine 12,5% SDS-PAGE über Nacht bei 12mA aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Spezifische Signale des SNV Env-Proteins auf dem Nitrozellulose Membran konnten dann mit dem gegen das TM-Protein des SNV-Env gerichteten Antikörper (11A25) und anschließende Inkubation mit

einem Peroxidase markierten anti maus IgG unter der Verwendung von 5% FKS als Blockpuffer detektiert werden.



#### Abb.11 Western Blot Analyse des SNV TM-Proteins

Die Detektion viraler Proteine wurde mit Hilfe des für das TM-Protein spezifischen Antikörpers 11A25 durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde Meerrettichperoxidase-konjugierter Anti-Maus-IgG benutzt. Der Blot wurde mit ECL-Reagenz entwickelt.

- 1) Zelllysate uninfizierter D17-Zellen.
- 2) Zelllysate SNV infizierter D17-Zellen
- 3) Virushaltiger Kulturüberstand SNV infizierter D17-Zellen

Die Analyse des Western Blotes ergab, dass das TM-Protein in Virusüberständen eine Größe von etwa 16 Kd aufweist, während das detektierte TM-Protein in SNV-infizierten D17-Zellen einem Molekulargewicht von 20 kD entsprechend migrierte (Abb.11).

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass während der Virus-Knospung eine proteolytische Prozessierung des SNV TM Proteins stattfindet. Dieses Phänomen wurde bereits für das Leukämie-Virus der Mäuse (MLV) und für das *Mason-Pfizer monkey virus* (MPMV) beschrieben. Das während der Virusknospung abgespaltete Proteinfsegment wurde bei MLV als R-Peptid bezeichnet. Daraufhin sollten im nächsten Schritt die Aminosäure-Sequenz des

SNV-TM-Proteins auf Homologien zum MLV TM Protein und die Lokalisation einer potenziellen Spaltstelle untersucht werden.

### 3.2.2 Aminosäure-Sequenzvergleich der zytoplasmatischen Domäne des TM Proteins bei $\gamma$ -Retroviren

Das Milznekrose-Virus der Vögel gehört zu der  $\gamma$ -Retroviren. Da zwischen den Mitgliedern dieser Familie Sequenzhomologien bestehen, wurde per Sequenzvergleich versucht die putative Protease-Spaltstelle zu lokalisieren. Dabei wurde die Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne des MLV-TM-Proteins als Homologie-Matrix genommen, da für dieses die R-Peptidspaltstelle durch Sequenz-spezifische Antikörper bestimmt worden war (Green et al., 1981).

|           | TMD    |                   | R peptide                 |
|-----------|--------|-------------------|---------------------------|
| MLV       | GPCILN | RLVQ.FV.DRSISVVO  | ..ALVL TQQYHQLKPI.EYEP    |
| GaLV      | GPCIIN | KLVQ.FINDR.ISAVK  | ..ILVL RQKYQAL....ENEGNL  |
| SNV       | GPCIM. | KTLTRI IHDK.IQAVK | ILALVP .Q.YKPLPT..EMDTLGQ |
| PERV      | GPCLIN | RFVA.FVRER.VSAVQ  | ..IMVL RQQYQGLLSQGETDL    |
| consensus | GPC00  | +00 00 -+ 0 0V    | 00V0 Q Y L E -            |

**Abbildung 12. Sequenzvergleich der TM-C-Tails verschiedener  $\gamma$ -Retroviren**

MLV (GenBank [M14702](#)), GaLV ([AF055060](#)); SNV (Engelstädter *et al.*, 2000), PERV-A (Y12238). Das C-Tail von PERV-B Env Protein unterscheidet sich vom PERV-A durch zwei konservierten Aminosäuren (Y17013). Die Transmembrandomäne (TMD) und die Position der R-Peptid-Spaltstelle sind bei für MLV angezeigt. In der Konsensus-Sequenz hydrophobe Aminosäurenreste sind als (0), positiv und negativ geladene entsprechend als (+) und (-) gekennzeichnet.

Der Vergleich wurde an dem hoch-konservierten GPC Motiv der Transmembrandomäne begonnen. Die C-Tails von allen in der Abb. 12 dargestellten  $\gamma$ -Retroviren weisen eine positiv geladene Aminosäure am N-Terminus auf und haben eine vergleichbare Länge von 32 bis 35 Aminosäuren.

Basierend auf dem Aminosäuren-Sequenzvergleich wurden alle C-tails in drei Regionen aufgeteilt: die proximale, die zentrale und die distale Region. Dabei entsprach die distale Region des C-Tails dem für MLV beschriebenen R-Peptid. Die proximale Region (14-15 As) aller fünf Viren weist eine starke Homologie

auf, während die Aminosäure-Sequenz der distalen Region, die auch eine Länge von 14-15 As besitzt, weniger konserviert ist. Das einzige konservierte Motiv in der distalen Region, das bei dieser Analyse identifiziert werden konnte, war das Motiv YXXL, ein Endozytose-Signal, das bereits von Ohno et al. (Ohno, 1985) beschrieben wurde. Die zentrale Region des *C-tails* ist komplett hydrophob und enthält vier (bei MLV, GALV, PERV a/b) oder sechs (bei SNV) Aminosäuren. Die R-Peptid-Spaltstelle für MLV wurde zwischen Leucin 646 (P1) und Valin 647 (P1') mit Hilfe von sequenzspezifischen Antikörpern von Green et al. (Green et al., 1981) ermittelt. Dasselbe LV-Motiv konnte auch bei GALV und SNV in der zentralen Region der zytoplasmatischen Domäne des TM Proteins identifiziert werden. Außerdem weisen die Aminosäurereste an den putativen P2 und P2' Positionen eine sehr starke Homologie zu denen von MLV auf.

Der Aminosäure-Sequenzvergleich lässt somit vermuten, dass sich die R-Peptid-Spaltstellen bei GALV TM-Protein zwischen Leucin 671 und Valin 672 befindet, bei SNV zwischen Leucin 580 und Valin 581. Bei PERV (A/B) wäre die Spaltstelle mit großer Wahrscheinlichkeit zwischen Methionin 643 und Leucin 644 zu finden. In diesem Fall wären die P1' und P2' Aminosäurereste mit denen von MLV absolut identisch. Dagegen wies das Spaltstellen-Motiv von PERV weniger Homologien auf, besonders Methionin in der Position 1 unterscheidet sich von allen entsprechenden Aminosäureresten der anderen Retroviren. Deswegen kann eine alternative Spaltstelle für das PERV R-Peptid, z.B. zwischen Ile und Met, oder Val und Met, nicht ausgeschlossen werden.

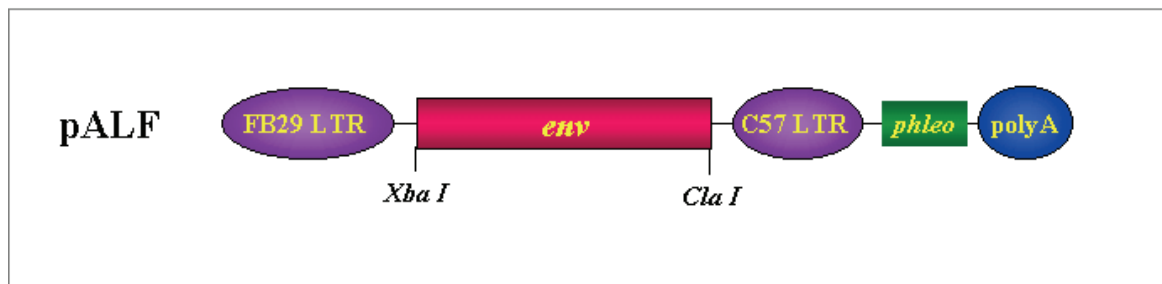
Im Allgemeinen, zeigte der Aminosäure-Sequenzvergleich, dass die proximalen und zentralen Regionen der zytoplasmatischen Domäne des TM-Proteins und auch die vorhergesagte Protease-Spaltstelle für alle untersuchten  $\gamma$ -Retroviren stark konserviert zu sein scheinen.

### **3.2.3 Konstruktion von Env-Varianten mit verkürztem *C-tail***

Wie im letzten Abschnitt beschrieben, wurde aufgrund der Aminosäure-Sequenz-Analyse festgestellt, dass die zytoplasmatischen Domäne der oben



aufgeführten retroviralen Env-Proteinen starke Homologien zu dem *C-tail* von MLV aufweisen. Da die proteolytische Prozessierung des *C-tails* und die entsprechende Funktion des R-Peptids für MLV bereits beschrieben worden sind, wurde nun die Frage gestellt, ob die im Abschnitt 3.2.2 aufgestellte Schlussfolgerung auch im Bezug auf die Funktionalität bewiesen werden kann. Hierzu sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob bei dem Sequenz-Vergleich identifizierte putative R-Peptide dieser Viren analog zu MLV einen bereits für das R-Peptid des MLV beschriebenen inhibitorischen Effekt auf die Membranfusion aufweisen. Wenn entweder MLV Env-Variante, der das R-Peptid fehlt, in MLV Rezeptor positiven Zellen exprimiert wird, entstehen große Zellsyncytien, die unter dem Mikroskop beobachtet werden können. Um die Funktionalität der putativen R-Peptide der anderen  $\gamma$ -Retroviren zu prüfen, wurden analoge Env-Varianten mit verkürztem *C-tail* hergestellt. Hierzu wurde jeweils ein Stop-Kodon an der vorhergesagten P1' Positionen bei den GALV, SNV, und PERV (A/B) *env* Genen eingeführt.



**Abb.13. Schematische Darstellung des Expressionsvektors pALF.**

LTR von FB29 *Friend MLV*, Phleomycin Resistenzgen (*phleo*) befindet sich abwärts vom *env*-Gen unter Kontrolle von *Friend MLV* C57 LTR

Für die Expression des GALV Env-Proteins wurde das Plasmid pALF-GALV als Ausgangsplasmid benutzt. Das Stop-Kodon wurde mittels PCR mit den Primern GALV $Xba^+$  und GALV $\Delta RCl a$  eingeführt, wobei das Plasmid pALF-GALV als Matrix diente. Das resultierende Konstrukt wurde als pALF-GALV $\Delta R$  bezeichnet. Für die Expression des SNV Env Protein wurde das Plasmid pRD134 (Martinez et al., 1995) benutzt. Hier wurde das Stop-Kodon an Position 2719 mit Hilfe einer positionsgerichteten Mutagenese mit den Primern SNV- $\Delta Ral$  und SNV- $\Delta Ral$ -reverse eingeführt, so dass das Plasmid pRD134 $\Delta R$  resultierte. Für die Untersuchung der Eigenschaften des R-Peptids aus den

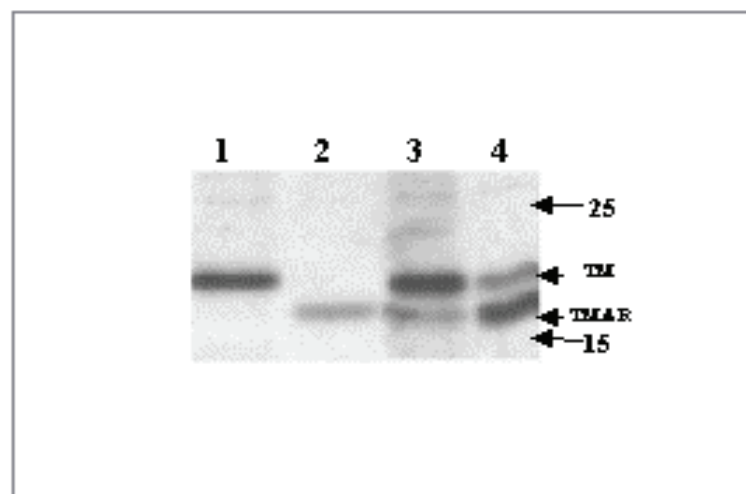
Viren der PERV-Familie wurden die Plasmide pALF-PERV A und pALF-PERV B benutzt. Die entsprechenden verkürzten Varianten wurden mit Hilfe von Plasmiden pALF-PERV-A $\Delta$ R bzw. pALF-PERV-B $\Delta$ R exprimiert, die ebenfalls per Mutagenese mit der Primern PERV- $\Delta$ R und PERV- $\Delta$ R-*reverse* hergestellt worden waren. Die Stop-Kodons wurden jeweils im Leserrahmen an der Position 1930 eingeführt, so dass den daraus resultierenden PERV A und PERV B Env-Proteinen die putativen R-Peptide fehlten.

### 3.2.4 Biochemische Charakterisierung der SNV Env-Variante

Um die Frage nach der Funktionalität der verkürzten Env Proteine und somit die Rolle des R-Peptids bei der Membranfusion beantworten zu können, sollte zunächst überprüft werden, ob die modifizierten *env*-Gene zu einer erfolgreichen Expression von entsprechend verkürzten Env-Proteinen in eukaryotischen Zellen führen. Die Expression wurde mittels Radioimmunpräzipitation untersucht. Hierzu wurden 18  $\mu$ g des Plasmids pRD134 $\Delta$ R in  $1 \times 10^7$  293T Zellen mittels Lipofectamin Plus Reagenz transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 100  $\mu$ Ci/ml eines [<sup>35</sup>S]-*In-vitro Cell Labelling Mix* (Promix, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach einer Vorinkubation der Zellen in einem Cys/Met Mangelmedium radioaktiv markiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1 ml Lysepuffer aufgelöst (50 mM Tris pH 8,0; 62,5 mM EDTA; 1% NP-40; 0,4 % Deoxycholat, Protease-Inhibitor-Mix (Complete<sup>TM</sup> Boeringer, Mannheim). Das Lysat wurde mit 50  $\mu$ l gewaschener Protein A-Sepharose (nach Angaben des Herstellers, Sigma, Deisenhofen) für 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation bei 13000 rpm. Zu dem vorgereinigten Lysat wurden dann zur Bildung von Immunkomplexen 3  $\mu$ l des SNV-TM-spezifischen Antikörpers 11A25 zugegeben. Nach 1-2 h Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 50  $\mu$ l Protein-A-Sepharose. Nach einer weiteren Inkubationszeit von mindestens 2 h wurden die Protein A-Sepharose-Immunkomplexe 2x mit Lysispuffer/150 mM NaCl und weitere 2x mit Lysispuffer gewaschen. Die Immunkomplexe wurden anschließend von den "Beads" gelöst (50 mM Tris pH 6,8, 1 % SDS) und mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden

fixiert, getrocknet und auf einen Röntgenfilm gelegt, der anschließend 1-2 Tage exponiert wurde.

Als Referenz wurden Zellextrakte von 293T Zellen hergestellt, die entweder mit dem für das SNV-Env kodierenden Plasmid pRD134, oder mit dem Plasmid pRD134 zusammen mit dem Plasmid pHIT60, das die *gag/pol* Gene des MLV enthält, transfiziert wurden.



**Abb.14. Nachweis des verkürzten SNV TM Proteins mittels Radioimmunpräzipitation (RIPA)** Radioimmunpräzipitation von SNV-TM-Proteinen aus dem Zelllysat der transfizierten 293T Zellen und dem dazugehörigen Kulturüberstand mit gegen das TM Protein gerichteten Antikörper(11A25). 1: Zelllysat von 293T Zellen transfiziert mit wt *env* Expressionskonstrukt (pRD134). 2: Zelllysat von 293T-Zellen transfiziert mit *env-ΔR* (pRD134 $\Delta$ R). 3: Co-Transfektion von pRD134 / pHIT60, Zelllysat. 4: Co-Transfektion von pRD134 / pHIT60, Zellkulturüberstand

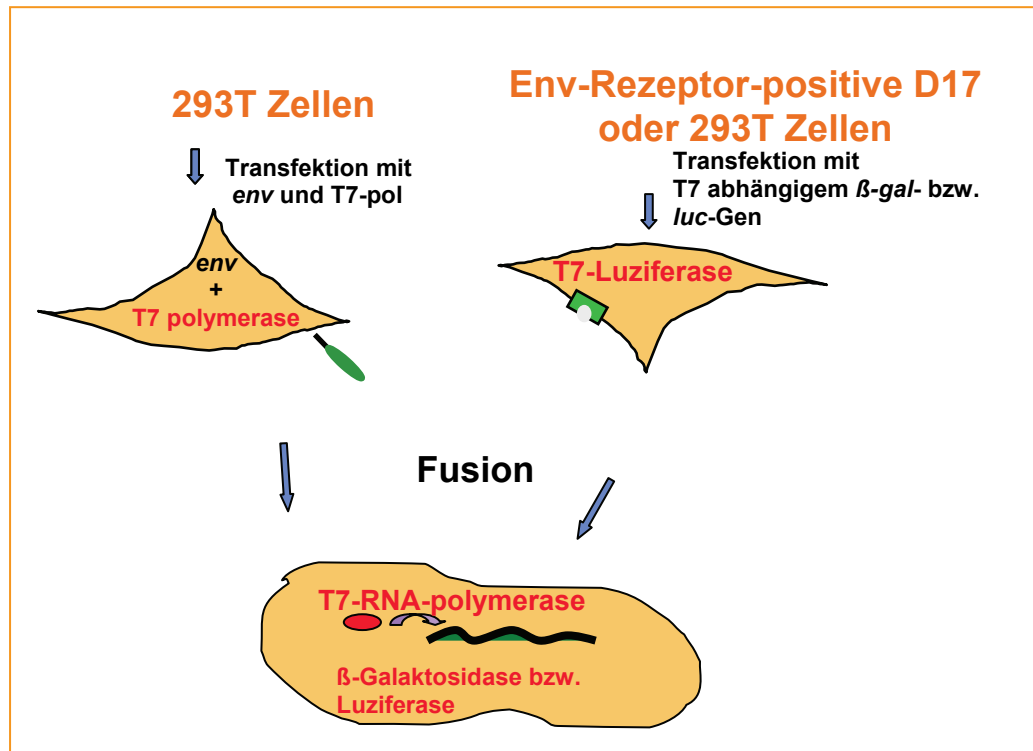
Wie die Abb. 14 zeigt, konnte das verkürzte TM-Protein erfolgreich detektiert werden. Die Proteinbande, die dem Konstrukt pRD134 $\Delta$ R entspricht, ist bei 17 Kd in der Spur 2 zu sehen. Als Kontrolle wurde in die Spur 1 das Zelllysat von pRD134 transfizierten Zellen aufgetragen. Erwartungsgemäß besaß das detektierte TM Protein ein Gewicht von 20 Kd, das anhand des Molekulargewichtsmarkers bestimmt werden konnte. Des Weiteren detektierte man das Vollängen-SNV-TM-Protein (Spur 3) in den Zelllysaten, wogegen ein verkürztes TM-Protein überwiegend in dem Zellkulturüberstand nachgewiesen

werden konnte (Spur 4), wenn das Plasmid pRD134 zusammen mit dem Plasmid pHIT60 in den 293T Zellen exprimiert wurde. Daraus kann man schließen, dass das SNV TM-Protein von der MLV Protease prozessiert werden konnte. Außerdem ergibt die Co-Migration des prozessierten TM-Proteins und des SNV-Env $\Delta$ R-Proteins einen Hinweis darauf, dass die eigentliche Prozessierungsstelle identisch mit oder zumindest sehr nah an vorhergesagten Prozessierungsstelle sein muss.

Nachdem eine erfolgreiche Expression der SNV Env-Variante bewiesen werden konnte, sollte als nächstes untersucht werden, ob die Prozessierung der TM Proteine tatsächlich die fusogenen Eigenschaften der Env Proteine verändert.

### **3.2.5 Nachweis der Membranfusion per qualitative Reporter-gen-Assay.**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, hat das R-Peptid des MLV-TM eine fusionsinhibierende Wirkung auf das Env-Protein, solange es noch nicht von einer viralen Protease von dem TM Prozessiert wurde. Sobald R-Peptid-freies Env-Protein in MLV-Rezeptor-positiven Zellen exprimiert wird, entstehen große Zellsynzytien, die unter dem Mikroskop beobachtet werden können. Um zu prüfen, ob die hier erzeugten trunkierten Env Varianten in ähnlicher Weise zur Synzytienbildung führen, wurde ein qualitativer Reporter-gen-Assay entwickelt, der einen hervorragenden visuellen Nachweis der Synzytien-Induktion liefern konnte. Der Assay beruht auf der durch die Zellfusion vermittelten Zusammenführung von T7-RNA-Polymerase und dem unter T7-Promotor Kontrolle stehenden  $\beta$ -Galaktosidase Reporter-gen (Abb. 15). Die Synzytienbildung kann somit über die Reporter-genexpression verfolgt werden.

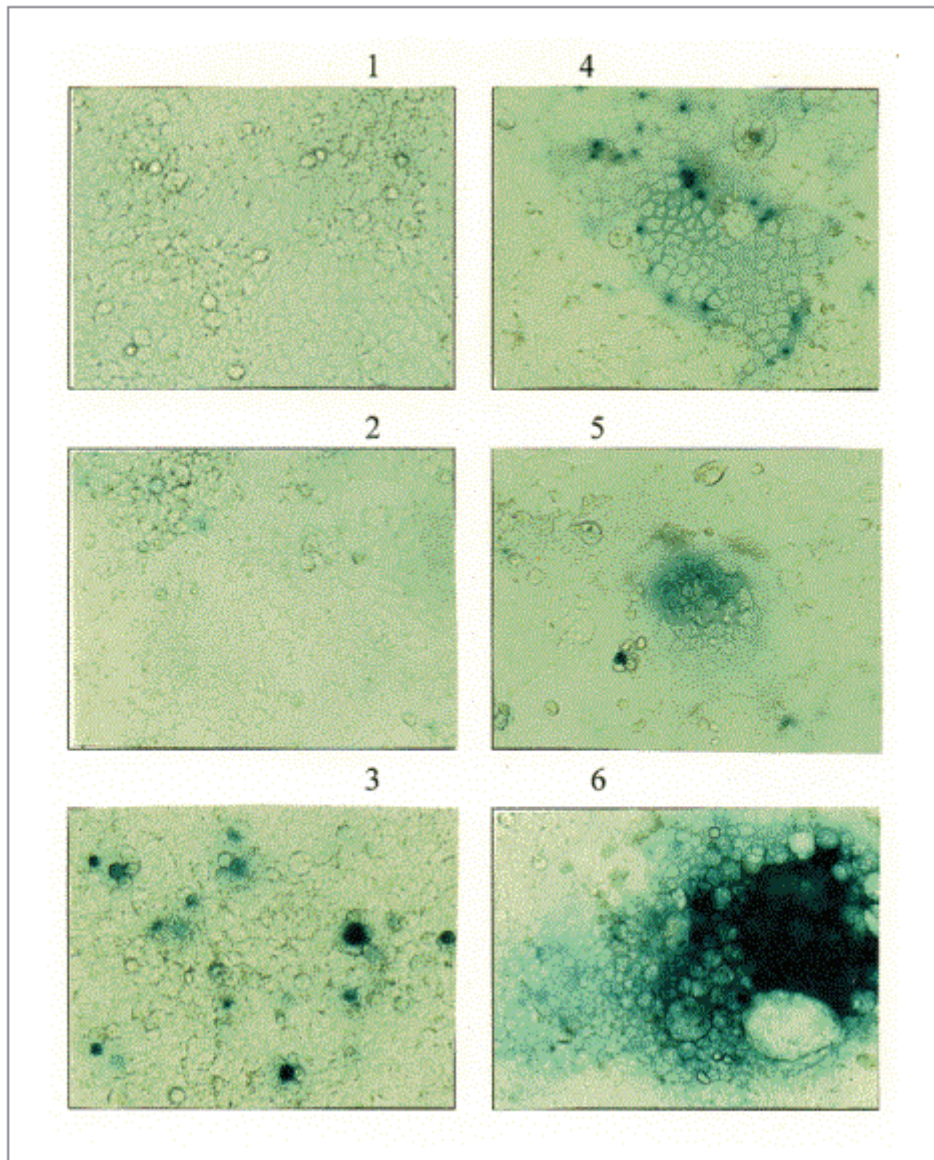


**Abb.15 Schematische Darstellung von qualitativen, bzw. quantitativen Fusionsassay.** 293T Zellen werden mit dem T7-pol Expressionskonstrukt und dem zu testenden *env*-Konstrukt co-transfiziert. Parallel dazu werden Zellen, welche jeweiligen Zellrezeptor tragen, mit einem T7 RNA-abhängigen *β-Gal* oder *luc*-Expressionsplasmid transfiziert. Anschließend werden die beiden Zellpopulationen co-kultiviert und die Expression von *β-Galaktosidase* bzw. *Luziferase* verfolgt

Es wurden jeweils 2,5 µg DNA von den Plasmiden pALF-GALVΔR, pALF-PERV-AΔR und pALF-PERV-BΔR zusammen mit 0,5 µg pCMV-T7Pol (kodiert T7-RNA-Polymerase) in der Anwesenheit von 5 µl Lipofectamin in  $5 \times 10^5$  293T Zellen transfiziert (Population 1). Parallel dazu wurden jeweils 3 µg pT7-Gal in 5 µl Lipofectamin in eine zweite Population (Population 2) von 293T Zellen transfiziert. Nach 4 Stunden wurden jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen aus Population 1 und  $2,5 \times 10^5$  Zellen aus der Population 2 vermischt und in Zellkulturmedium kultiviert. Außerdem wurden  $5 \times 10^5$  293T Zellen mit den Plasmiden pCMVT7-pol und pT7-Gal als Positivkontrolle co-transfiziert. Zudem werden die entsprechenden Ansätze mit den wt-Env Varianten hergestellt. Als Negativkontrolle für die *β-Galaktosidase*-Aktivität wurde das Plasmid pT7-Gal allein in 293T Zellen transfiziert. Am nächsten Tag nach der Transfektion

wurden alle Ansätze einer X-Gal Färbung unterzogen und 2 h später mikroskopisch ausgewertet.

Wie die Abb. 16 zeigt, entwickelten alle getesteten trunkierten Env-Protein-Varianten eine fusogene Aktivität. Am stärksten entwickelten sich Synzytien in den Zellen, die mit pALF-PERV-A $\Delta$ R transfiziert worden waren. Die entstandenen Synzytien bestanden aus mehr als 100 Nuklei und breiteten in einem Zeitraum von 17-20 h nach Transfektion über die gesamte Fläche des Zellrasens aus. Die mit pALF-GALV $\Delta$ R transfizierten Zellen bildeten im Durchschnitt kleinere Synzytien (10-50 Nuklei). Synzytien, die in pALF-PERV-B $\Delta$ R transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnten, waren wesentlich kleiner (5-10 Nuklei). Tests mit den entsprechenden *wt*-Env verliefen negativ. Keines der getesteten *wt*-Env-Proteine zeigte in diesem Test Fusionsaktivität. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Env-Proteine aller getesteten  $\gamma$ -Retroviren durch Trunkierung des TM Proteins fusionsaktiv werden.



**Abb.16 Qualitativer Fusionsassay.** Färbung mit X-Gal für den Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den durch die transiente Expression der R-Peptidlosen Env-Varianten entstandenen Synzytien. Transfektion: 1. pALF-PERV-Awt, 2. pALF PERV-Bwt, 3. pALF-GALVwt, 4. pALF-PERV-A $\Delta$ R, 5. pALF-PERV-B $\Delta$ R, 6. pALF-GALV $\Delta$ R

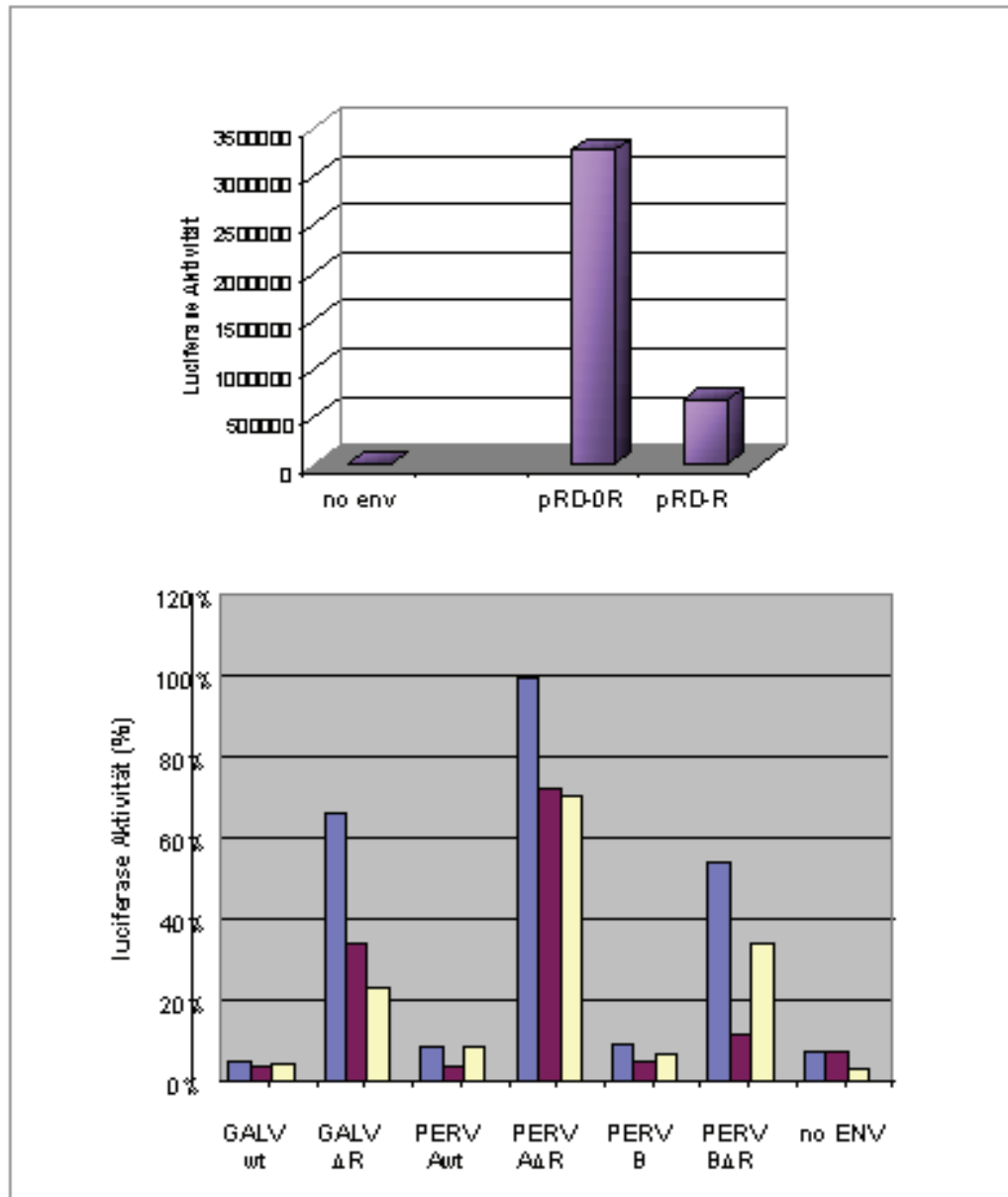
### 3.2.6 Quantitativer Analyse des fusogenen Potentials der Env-Varianten

Wie aus dem Abschnitt 3.2.5 hervorgeht, entwickelten die trunkierten Env Proteine fusogene Aktivitäten mit unterschiedlicher Stärke. Zu weiteren Charakterisierung werden die Membranfusionsaktivität der Env $\Delta$ R-Varianten mit Hilfe eines quantitativen Luziferase-Tests bestimmt. Dabei beruht der Test, der zum ersten Mal von Nussbaum et al. (Nussbaum et al., 1994) beschrieben wurde, auf dem gleichen Prinzip wie der Test für den qualitativen Nachweis von Synzytien (Abb. 15). Anstelle des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens wird hier allerdings das Gender Glühwürmchen-Luziferase verwendet (pT7-Luc). Die nach Synzytien-Bildung entstehende Luziferase kann nach Zugabe von Luziferin-Substrat in einem Luminometer quantifiziert werden, wobei sich die gemessene Luziferase-Aktivität proportional zu der Zahl der entstandenen Luziferase-Moleküle verhält und somit das Ausmaß der Syzytien-Bildung widerspiegelt.

Hierzu wurden jeweils 2,5  $\mu$ g DNA von den Plasmiden pALF-GALV $\Delta$ R, pALF-PERV-A $\Delta$ R und pALF-PERV-B $\Delta$ R, die für trunkierte Varianten des Env-Proteins kodieren, zusammen mit 0,5  $\mu$ g pCMV-T7Pol in der Anwesenheit von 5  $\mu$ l Lipofectamin und 30  $\mu$ l Plus<sup>TM</sup>-Reagenz in  $5 \times 10^5$  293T Zellen transfiziert (Population 1). Parallel dazu wurde jeweils 3  $\mu$ g pT7-Luc in 5  $\mu$ l Lipofectamin 30  $\mu$ l Plus<sup>TM</sup>-Reagenz in eine zweite Population ( $5 \times 10^5$  Zellen, Population 2) von 293T Zellen transfiziert. Nach 4 Stunden wurden jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen aus Population 1 und  $2,5 \times 10^5$  Zellen aus der Population 2 vermischt und in Zellkulturmedium kultiviert. Durch co-Transfektion von  $5 \times 10^5$  293T Zellen mit den Plasmiden pCMVT7-pol und pT7-Luc wurde die maximale Aktivität (Aktivitätsmaß 100%) bestimmt. Als Referenz zu den fusionsaktiven Env-Varianten wurden die entsprechenden Ansätze mit den *wt-env* Genen ebenfalls durchgeführt. Als Negativkontrolle der Luziferase-Aktivität wurde das Plasmid pT7-Luc allein in 293T Zellen exprimiert. Da 293T Zellen keinen Rezeptor für das SNV-Env auf der Oberfläche tragen, war es notwendig, die für den SNV-Env-Rezeptor positive Zelllinie D17 in den Test mit einzubeziehen. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  D17 Zellen mit 3  $\mu$ g pT7-Luc mit Hilfe von 5  $\mu$ l Lipofectamin und 30  $\mu$ l Plus<sup>TM</sup>-Reagenz transfiziert und anschließend mit pRD134 $\Delta$ R / pCMV-T7



transfizierten 293T Zellen im Verhältnis 1:1 vermischt und ausplattiert. Am nächsten Tag nach der Transfektion wurden nach dem im Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Protokoll die Zelllysate aller Ansätze hergestellt und im Luminometer auf die Luziferase-Aktivität überprüft.



**Abb. 17. Quantifizierung der Fusionsaktivität.**

Bestimmung der Luziferase-Aktivität im Zelllysate von 293T, bzw. D17 Zellen. Oben: Luziferase-Aktivität der D17 Zellen nach der Transfektion mit dem trunkierten und wt-SNV *envs* in U / ml. Unten: Luziferase-Aktivität der entsprechenden trunkierten und wt-Env-exprimierenden 293T Zellen, dargestellt als Prozentsatz zur Aktivität der Positivkontrolle (Co-Transfektion von pCMV-T7pol und pT7-luc) in drei unabhängigen Experimenten.

Obwohl die im Luminometer gemessene absolute Luziferase-Aktivität in den drei durchgeführten Wiederholungen des Experimentes unterschiedlich ausfiel, resultierte die Expression von PERV-A $\Delta$ R wiederholt im höchsten Aktivitätslevel von Luziferase, der sich dem der Positivkontrolle (Co-Transfektion von 293T Zellen mit pCMV-T7pol und pT7-luc) annäherte (Abb. 17). Die nach Expression der *wt*-Env Proteine vermittelte Luziferase-Aktivität lag nicht signifikant über der Negativkontrolle, bei der die *env*-Konstrukte weggelassen werden. Dagegen lagen die Luziferase-Aktivitäten nach der Expression von verkürzten GALV und PERV B Env-Varianten 5-6fach höher als die der entsprechenden *wt*-Env-Proteine. Das SNV Env $\Delta$ R-Protein war auch in der Lage die Fusion zwischen den 293T Zellen und den SNV-Rezeptor-positiven D17 Zellen hervorzurufen. Auch hier lag die detektierte Luziferase-Aktivität weit über dem bei der Expression von SNV *wt*-Env-Protein gemessenen Signal. Allerdings können die absoluten Werte der Luziferase-Aktivität für SNV nicht mit den entsprechenden Werten von PERV A/B und GALV verglichen werden, da die für diesen Test relevante Transfektionseffizienz von D17 Zellen deutlich geringer ist als die von 293T Zellen.

Zusammenfassend konnte der quantitative Fusions-Assay die Ergebnisse von vorherigen Experimenten bestätigen. Dabei erwies sich das PERV A $\Delta$ R Protein als effizientester Fusionsvermittler in 293T Zellen, gefolgt von dem GALV, SNV und PERV B Varianten.

## 4 Diskussion

In Hinblick auf die Gentherapie von Erbkrankheiten, Tumoren oder Infektionskrankheiten böte der *in vivo* Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen die Möglichkeit der Entwicklung innovativer Ansätze. In der vorliegenden Arbeit wurde ein von SNV abgeleiteter retroviraler Vektor generiert, der eine Zielzell-Spezifität für hämatopoetische CD34-positive Stammzellen aufweist. In diesem Zusammenhang wurde der Eintrittsmechanismus des SNV biochemisch untersucht und eine proteolytische Prozessierung des viralen TM-Proteins bei der Virusknospung für SNV aber auch für die andere  $\gamma$ -Typ Viren beschrieben. Ergebnisse der Transduktionsversuche, sowie molekulare Mechanismen des Zelleintritts und die Zukunftsperspektiven der gewonnenen Erkenntnisse sind die Bestandteile der nachfolgenden Diskussion.

### 4.1 Gentransfer in humane hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen stellen ein wichtiges Target dar, um Krankheiten oder persistierende virale Infektionen, welche vorwiegend die Blutzellen betreffen, zu therapieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass ein von SNV abgeleiteter Vektor einen effizienten Gentransfer in die aus Nabelschnurblut isolierte humane primäre CD34-positive Zellen erlaubt. Die Spezifität des Targeting wurde durch die Modifikation des Oberflächen-Hüllproteins erreicht. Dabei wurde das gesamte SNV SU-Protein durch das einkettige Antikörperfragment anti-CD34-scFv ersetzt.

Für die Herstellung der entsprechenden [(antiCD34-TM)SNV]-Vektoren wurde das retrovirale Expressionsgen in die Verpackungszelllinie DSH-CXL (SNV-*gag/pol*<sup>+</sup>, SNV-*env*<sup>+</sup>,  $\Psi$ -positives pCXL (*Lac Z*) transfiziert. Die SNV-Partikel trugen somit sowohl die mit anti-CD34-scFv modifizierten Env-Proteine als auch Wildtyp-Env-Proteine.

In Transduktionsexperimenten konnten gezeigt werden, dass die hergestellten Zelltargeting-Vektoren einen selektiven Transfer des *lac Z*-Gens in eine Reihe von Zelllinien vermittelten. Dabei diente der für die  $\beta$ -Galaktosidase kodierende verpackbare Expressionsvektor (pCXL) als Reporter gen, dessen Genprodukt in transduzierten Zellen mit Hilfe des X-Gal-Assays nachgewiesen werden konnte. Auf diese Weise wurde die CD34-positive humane Zelllinie KG1a transduziert, dabei wurde ein Titer von  $10^5$  i.E./ ml gemessen. Dagegen konnte die CD34-negative Zelllinie Molt4.8 nur mit einem Titer von  $4 \times 10^3$  i.E. / ml transduziert werden, was einem Diskriminierungsfaktor von ca. 30 entsprach.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Vektoren zudem primäre humane CD34-positive Stammzellen transduzierten. Für die Optimierung der Transduktionsbedingungen waren zunächst verschiedene Parameter, wie z. B. der Einsatz von Protamin-Sulfat oder Polybren, sowie die Zusammensetzung des für die Aktivierung der Zielzellen notwendigen Zytokinen-Cocktails und nicht zuletzt die Art und die Dauer der Transduktion optimiert worden. Es wurde versucht, die Transduktionseffizienz durch eine unmittelbare Beteiligung der Verpackungszellen am Transduktionsprozess durch Co-Kultivierung mit Zielzellen zu erhöhen. Im Optimalfall betrug die Transduktionseffizienz der primären CD34-positiven Stammzellen  $2 \times 10^6$  i.E. / ml. Dabei stellte es sich heraus, dass das üblicherweise für die retrovirale Transduktion benutzte Polybren für die Transduktion von Stammzellen nicht eingesetzt werden konnte, da es auf die primären CD34-positiven Zellen sehr toxisch wirkte.

Sowohl die Eignung des etablierten Transduktionsprotokolls für einen retroviralen Gentransfer in die primären humanen Stammzellen als auch die Lebensfähigkeit behandelter Zellen wurden mit Hilfe eines klonogenen Assays im Methylzellulose-Nährmedium nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Differenzierungseigenschaften der therapierten Zellen sich nicht von denen der unbehandelten Zellen unterscheiden. Dabei betrug das Differenzierungspotenzial der zur Transduktion eingesetzten Stammzellen 29%, wobei das Differenzierungspotenzial von unbehandelten Zellen bei 41% lag.

Eine effiziente Selektivität der Targetingvektoren bleibt eine der zentralen Fragen der *in vivo* Gentherapie. Dabei konnte für den anti-CD34-scFv-SNV-Vektor bis jetzt nur die Spezifität für das CD34-Molekül gezeigt werden (Jiang et al., 1998). In dem publizierten Fall konnte die Transduktion einer CD34-positiven Zelllinie mittels eines monoklonalen anti-CD34-Antikörpers kompetitiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Selektivität des Vektors untersucht. Dabei wurde in Experimenten mit gemischten Zellpopulationen (CD34<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>), in denen dem retroviralen Vektor mehrere potenzielle Targeting-Ziele zum Gentransfer angeboten wurden, gezeigt, dass der Gentransfer nur in die CD34-positiven, und nicht in die CD34-negativen Zellen erfolgte. Dazu wurden aus einer Blut-Präparation gewonnene PBMC bzw. ein im Verhältnis 1:1 hergestelltes Gemisch von primären CD34<sup>+</sup>-HSC und CD34-negativen T-Zellen als „*target*“ für die Transduktion verwendet und unter Zugabe von Protamin-Sulphat transduziert (MOI=1). Zwei Tage später wurden beide Zellsubpopulationen durch magnetische CD34-Affinitätschromatographie separiert. 16% der CD34-positiven Zellen waren für das transduzierte Reportergen (*lac Z*) positiv, während nur 0.5% der CD34-negativen Zellen transduziert wurden. Dieses Ergebnis stellt somit den ersten Beweis einer Selektivität des retroviralen Zelltargeting da und ist für die zukünftige Weiterentwicklung des Vektors in Rahmen einer Gentherapie *in vivo* sehr bedeutsam.

Nach wie vor sind die molekularen Mechanismen des scFv-abhängigen Zelleintritts und die Rolle des *wt*-Env-Proteins bisher kaum charakterisiert. Zwar wurden auch funktionelle Vektoren ohne *wt*-Env beschrieben, diese transduzierten jedoch ihre Zielzellen um den Faktor  $10^2$ - $10^3$  weniger effizient, als bei Co-Expression des *wt*-Env-Proteins (Chu and Dornburg, 1997). Verschiedene Studien an HIV, RSV, ALV und anderen behüllten Viren zeigten, dass dem Fusionsprozess während des Zelleintritts des Vektorpartikels Konformationsänderungen des Env-Proteins vorausgehen, die durch Rezeptorkontakt ausgelöst werden (Hughson, 1997; Wyatt and Sodroski, 1998). Es ist eher unwahrscheinlich, dass dieser hochspezifische Prozess von dem

(scFv-TM)-Fusionsprotein geleistet werden kann. Vielmehr ist es denkbar, dass das scFv-TM für die Anheftung der Vektorpartikel an die Zelloberfläche verantwortlich ist. Die Interaktion des *wt*-Env-Proteins mit einem weiteren, bisher nicht bekannten schwach-affinen ubiquitären Rezeptor könnte dann die Fusion mit der Zellmembran vermitteln (Dornburg, 1997; Jiang et al., 1998). Der Rezeptor für simiane Typ D-Retroviren könnte ein Kandidat für den postulierten schwach affinen Rezeptor sein. Diesbezüglich wurde von Rasko et al. (1999) gezeigt, dass 3T3-Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren, von SNV bis zu 10fach besser infiziert werden konnten. Eine alternative Erklärung für die Notwendigkeit einer Co-Inkorporation von *wt*-Env-Protein lieferte eine Beobachtung, die von Zhao et al. (Zhao et al., 1997) bei der Untersuchung der funktionalen Interaktionen zwischen den einzelnen Monomeren des retroviralen Proteinkomplexes gemacht wurde. Es wurde postuliert, dass die Oberflächen-Hüllproteine auf der Oberfläche nicht als Monomere, sondern als trimere Proteinkomplexe erscheinen. Dabei unterstützt jedes Mitglied dieses Trios das andere in seiner Funktion. So kann bei fehlender Rezeptorbindung eines Env-Moleküls die Bindungseigenschaften des anderen, „gesunden“ Env-Proteins benutzt werden. Im Fall von SNV vermittelter Transduktion ist es auch denkbar, dass Env-Proteine auf der Oberfläche als heterologe trimere Komplexe präsentiert werden und sich gegenseitig in ihrer Funktion unterstützen. So übernimmt das (scFv-Tm)-Fusionsprotein die Rezeptorbindung, wobei das *wt*-Env das für den Zelleintritt notwendige Fusions-Peptid zu Verfügung stellt.

## 4.2 Biochemische Charakterisierung des SNV Env Proteins

Der Einsatz von retroviralen Vektoren *in vivo* ist zugleich mit einer Reihe von Risiken für den Patienten verbunden. Um diese abschätzen und ausschließen zu können, ist eine vollständige biochemische Charakterisierung des zu verwendenden therapeutischen Systems notwendig. Das SNV System öffnet im Bezug auf eine *in vivo* Anwendung neue Perspektiven, daher ist eine Aufklärung seiner biochemischen Charakteristika von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurden einige Aspekte des viralen Eintrittes in die Zielzelle und die fusogene Eigenschaften des Env-Proteins untersucht.

SNV-TM-Protein konnte mit Hilfe von für SNV TM-Protein spezifischen Antikörpern in Zelllysat infizierter Zellen und auch in virushaltigen Kultur-Überstand mittels Western-Blot detektiert werden. Erstaunlicherweise war die elektrophoretische Mobilität des von Plasmid pRD134 kodierten SNV-TM-Proteins geringer als die des *wt*-SNV. Das die *wt*-Env-Proteins kodierende Plasmid pRD134 und das davon abgeleiteten Plasmid pTC53, das für (scFv-TM)-Fusionsprotein kodiert, wurden am 3'-Ende des TM-Leserahmens sequenziert und analysiert. Der Vergleich ergab, dass diese Konstrukte basierend auf einer fehlerhaft publizierten *wt*-Env-Sequenz konstruiert worden waren (Kewalramani et al., 1992), was somit zu einer bisher unerkannten Veränderung der Länge und der Sequenz des C-terminalen Endes des TM-Proteins führte. Die ersten Experimente mit korrigierten Konstrukten zeigten aber keinen deutlichen Unterschied zu den bisher verwendeten (M. Bobkova und M. Engelstädter, unveröffentlichte Daten).

Mittels Western-Blot-Analyse wurde außerdem folgende interessante Entdeckung gemacht: das Vektorpartikel-assoziierte *wt*-TM-Protein zeigte eine deutlich höhere elektrophoretische Mobilität als das entsprechende aus dem Zellextrakt gewonnene Protein. Diese Tatsache deutete auf eine proteolytische Prozessierung des SNV-TM Proteins während der Partikelreifung hin. Bisher wurde ein solcher Vorgang nur für MLV und *Mason-Pfizer monkey virus* beschrieben. Dabei wurde durch Punktmutagenese nachgewiesen, dass das C-terminale Ende des TM-Proteins für einen effizienten Einbau des Glykoproteinkomplexes in die knospenden Viruspartikeln dieser Viren verantwortlich ist. Weiterhin zeigten diese Untersuchungen, dass die Interaktion des C-terminalen unprozessierten Endes des TM mit den Matrixproteinen die Fusionsfunktionen des Glykoproteins während der Partikelreifung unterdrücken kann (Ragheb and Anderson, 1994; Rein et al., 1994).

Der beschriebene Mechanismus der proteolytischen Abspaltung des so genannten R-Peptides von dem C-terminalen Ende des TM-Proteins bei MLV wurde auch bei SNV vermutet. Die Ergebnisse des Western Blots und ein direkter Sequenzvergleich des C-terminalen Bereiches von MLV TM-Protein mit der korrigierten Sequenz des SNV TM-Proteins führten zur Identifizierung eines

konservierten GPC-Motivs, das auch in der Aminosäureabfolge anderer  $\gamma$ -Retroviren gefunden wurde. Weiterhin ließ sich eine putative Proteasenspaltstelle für die Prozessierung des R-Peptids vorhersagen.

Die Prozessierung des SNV TM-Proteins wurde auch mit Hilfe der Radio-Immun-Präzipitation untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass das SNV TM-Protein nur durch eine virale und nicht durch eine zelluläre Protease abgespalten werden kann, wobei diese nicht unbedingt von SNV stammen muss. In diesem Fall wurde das TM-Protein von SNV durch die Protease von MLV prozessiert.

Die Funktion des SNV R-Peptides und die fusionsaktivierende Rolle dessen Prozessierung wurden näher untersucht. Durch die Einführung eines Stop-Kodons an der vorhergesagten Spaltstelle wurde ein für das trunkierte SNV Env (pRD134- $\Delta$ R) kodierendes Expressionskonstrukt generiert. Eine Co-Kultivierung der mit pRD134- $\Delta$ R transfizierten 293T-Zellen mit für den SNV-Rezeptor positiven D17 Zellen führte zur Bildung großer Synzytien. Dieser Effekt konnte dagegen nicht in den Kontroll-Ansätzen mit unverändertem *wt-env* Expressionskonstrukt pRD134 beobachtet werden.

Die fusionsregulierende Funktion des SNV R-Peptides wurde weiterhin anhand eines Reporter-gen-Assays bestätigt. Als Reporter diente  $\beta$ -Galaktosidase, die nur bei einer Fusion von SNV Rezeptor-positiven D17-Zellen mit den das trunkierte SNV Env-Protein exprimierenden 293T Zellen gebildet wurde. Die Induktion der Synzytien-Bildung zwischen 293T- und D17-Zellen konnte quantitativ gemessen werden, indem anstelle  $\beta$ -Galaktosidase Luziferase als Reporter-gen benutzt wurde. Dabei überstieg die fusogene Potenz des R-Peptid-losen SNV Env Proteins um 7fach die des SNV *wt-Env*'s. Somit gelang es zum ersten Mal die Env vermittelte Fusion quantitativ zu charakterisieren.

Wie bereits erwähnt, wurde durch ein Sequenzvergleich der Env-Proteine verschiedener  $\gamma$ -Retroviren eine putative Protease-Prozessierungsstelle des R-Peptides vorhergesagt. Nachdem für SNV die Abspaltung des R-Peptids



während der Partikelreifung und fusionsaktivierende Funktion dieses Vorgangs bewiesen war, stellte sich die Frage, ob dies ein generelles Phänomen von  $\gamma$ -Retroviren darstellt. Um zu demonstrieren, dass fusogene Eigenschaften der Env-Proteine von  $\gamma$ -Retroviren unterschiedlicher Herkunft auf gleiche Weise aktiviert werden, wurden die R-Peptid-lose Varianten der Env-Proteinen des GaLVs und der endogenen Retroviren des Schweins (PERV) Typ A und Typ B generiert. Der Einsatz dieser Varianten im Repotergen-Assay ergab einen Anstieg der Luziferase-Aktivität gegenüber den Kontroll-Ansätzen mit unveränderten Env-Konstrukten. Starke Synzytien-Bildung konnte auch visuell verfolgt werden. Dabei besaß das trunkierte Env-Protein von PERV-A die höchste fusogene Aktivität.

Basierend auf diesen Daten kann postuliert werden, dass die Abspaltung des R-Peptids einen notwendigen Schritt bei der Reifung der  $\gamma$ -retroviralen Partikeln darstellt, der die fusogenen Eigenschaften der Env-Proteine reguliert. Die Erkennungs-Sequenz für die Protease-Prozessierung ist bei allen untersuchten  $\gamma$ -Retroviren hochkonserviert. Dabei kann die R-Peptid-Prozessierung in einigen Fällen auch durch eine heterologe virale Protease, wie z.B. die Prozessierung des SNV R-Peptides durch die MLV-Protease, erfolgen. Ein ähnliches Phänomen wurde von Kiernan und Freed 1998 für die Prozessierung des MLV R-Peptides durch die HIV-Protease beschrieben. Auf welche Art und Weise die Abspaltung des R-Peptides zu dem hochfusogenem Env-Protein führt, und was die tatsächliche Rolle der R-Peptid-Prozessierung während der Virus-Knospeung ist, bleibt weiterhin unklar. Yang *et al.* vermuteten 1996, dass die Abspaltung des R-Peptides zu einer Änderung der Interaktion zwischen SU und TM-Proteinen und somit zur Änderung der fusogenen Eigenschaften der Virus-Partikeln führt. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen auch Spies *et al.* 1994, die die fusogene Eigenschaften des SIV Env-Proteins untersuchten. Dabei wurde gezeigt, dass sich die Konformation und die Stabilität des trunkierten TM-Proteins im Vergleich zu *wt*-TM ändert, was zu einer erhöhten Fusogenität der TM-Ectodomäne führt. Olsen und Dornburg beschrieben 1999 mehrere Palmitoylierungs-Ereignisse am MLV R-Peptid und seine Verankerung in der Membran. Außerdem wurden ein Modell der Funktion des R-Peptides bei dem Transport des neusynthetisierten Env-Komplexes zur Plasmamembran

und die Rolle des palmitoylierten R-Peptides bei der Kontrolle der Virusknospung durch die Beeinflussung der Membran-Ausstülpung vorgeschlagen.

Genauso wenig ist bekannt über die Mechanismen der Synzytien-Bildung, die durch die Expression fusogener Env-Proteine in den Env-Rezeptor-positiven Zellen hervorgerufen wird. In einer Studie von Wang und Kollegen (Wang et al., 2005) wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Synzytien-Formation von der Anzahl der Env-Rezeptor-Moleküle an der Zelloberfläche abhängig ist. Außerdem folgte auf die Interaktion zwischen dem Env-Protein und dem Env-Rezeptor eine cAMP-abhängige intrazelluläre Signaling-Kaskade über Protein-Kinase A (PKA) zur Raf-1 Kinase, deren Aktivierung für die Synzytien-Bildung absolut notwendig sind. Die Frage, wie es nun tatsächlich zur Membranverschmelzung kommt, bleibt trotzdem noch offen.

### **4.3 Ausblick**

#### **4.3.1 Der therapeutische Einsatz des [(antiCD34-TM)SNV]-Vektors**

Mit dem hier hergestellten [(antiCD34-TM)SNV]-Vektor steht ein für alle CD34-positiven, aber im Besonderen für die humanen Stammzellen hocheffizienter Zelltargeting-Vektor zur Verfügung. Mittels dieser Vektorpartikeln wäre es möglich, die Blutzellen-assoziierten Krankheiten, wie z. B. die schwere kombinierte Immunschwäche (SCID) zu therapieren. Hierbei handelt es sich um einen Defekt des Adenosin-Desaminase-Gens (*ada*) oder des für die Tyrosinkinase JAK-3 kodierenden Gens (Macchi *et al.*, 1995). Der von Cavazzana-Calvo beschriebene erfolgreiche Gentherapieansatz bei dieser Erkrankung (Cavazzana-Calvo et al., 2000) könnte möglicherweise vereinfacht werden. Weiterhin könnte der Vektor zur Vorsorge im Rahmen einer Immunisierung, aber auch einer Therapie der erworbenen Immunschwäche AIDS eine Anwendung finden. Als therapeutische Genprodukte kämen Ribozyme, Antisense-RNA, transdominant-negative Mutanten von HIV-Proteinen oder Anti-Integrase/Reverse Transkriptase-scFv in Frage (Chang et

al., 1994; Chang and Stoltzfus, 1987; Duan et al., 1995; Hopper et al., 1988; Leavitt et al., 1996; Levy-Mintz et al., 1996; Ramezani et al., 1997; Smith et al., 1996).

Der Einsatz retroviraler Vektoren, die von Onkoretroviren wie MLV oder SNV abgeleitet sind, beschränkt sich auf die Transduktion teilungsaktiver Zellen. Seit es bekannt geworden ist, dass humane Stammzellen sich im Organismus normalerweise zu 75 % in der G<sub>0</sub>-Phase befinden und daher ohne eine Vorstimulation für Retrovirus unzugänglich sind (Cheshier et al., 1999), und dass eine Zytokinenstimulation sich negativ auf die Repopulierungspotenzial auswirken könnte (Gothot et al., 1998; Howell et al., 2002) ist das Interesse an einem spezifischen Vektor, der in der Lage wäre auch ruhende Stammzellen zu transduzieren stark gewachsen. Parveen und Kollegen (Parveen et al., 2000) konnten mittels Insertion eines Kernlokalisierungssignals (NLS) in das Matrixprotein (MA) des SNV eine neue Generation von SNV-Vektorpartikeln herstellen. Der [(7A5-scFv-Env)SNV]-Vektor war in der Lage, Wachstums-arretierte humane T-Zellen mit einem Titer von bis zu  $3 \times 10^5$  i.E./ml zu transduzieren. Die ersten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass dieser Vektor in der Lage war, auch teilungsinaktive ruhende Zellen zu transduzieren. Daher wäre es denkbar, dieses System auch für den in dieser Arbeit entwickelten CD34-spezifischen SNV-Vektor anzupassen.

#### **4.3.2 Anwendung hochfusogener retroviraler Env-Proteine in der Gentherapie.**

Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Induktion von Synzytien-Bildung durch die Expression von R-Peptid-losen Env-Proteinen von  $\gamma$ -Retroviren, liegt die Idee eines gentherapeutischen Einsatzes dieser Proteine für die Bekämpfung von Tumoren nahe. Higuchi und Kollegen (Higuchi et al., 2000) zeigten, dass Synzytien-Formation von Hep3B Zellen (humane hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie), die durch die Expression eines fusogenen viralen Glycoproteins (GALV-FMG) ausgelöst wurde, zum nekrotischen Absterben der Target-Zellen mit einem hohen „Bystander-Effekt“ führte. Dabei ist das Absterben der Zellen durch Nekrose im Sinne einer Tumor-

Therapie vorteilhafter als durch Apoptose, da bei der Apoptose zusätzlich auch das Immunsystem aktiviert wird.

Diaz und Kollegen (Diaz et al., 2000) generierten lentivirale Vektoren, die das GALV-FMG als therapeutisches Gen enthielten. Eine Transformation von humanen xenotransplantierten Tumorzellen mit diesen viralen Partikeln führte zur Expression von fusogenem GALV-FMG in Targetzellen, zur Synzytien-Bildung und zum nachfolgenden nekrotischen Absterben bis hin zur vollen Eliminierung des Tumor-Gewebes.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Vergleichsstudie von fusogenen Eigenschaften der Env-Proteine verschiedener  $\gamma$ -Retroviren, wurde gezeigt, dass Synzytien-Bildung mit unterschiedlicher Effizienz verläuft. Dabei induzierte die Expression von PERV-A Env- $\Delta$ R in den Targetzellen die größten Synzytien. Humane Zellen sind für das endogene Retrovirus des Schweins zugänglich (Wilson et al., 1998). Der vor Kurzem entdeckte natürliche humane Rezeptor für PERV-A wird in verschiedenen humanen Gewebe exprimiert (Ericsson et al., 2003). Daher kann das Env- $\Delta$ R des Typ A (PERV-A) als ein potenzielles therapeutisches Agens und als eine Alternative für das GALV-FMG Protein für die Tumorthherapie angesehen werden. Die Spezifität der Synzytien-Bildung könnte zusätzlich durch den Einbau eines für Tumorzellproteasen spezifischen Spaltstellen-Motivs zwischen dem R-Peptid und dem C-Terminus des Env-Proteins gesteigert werden, so dass das PERV-A Env-Protein nur in dem Tumor-Gewebe prozessiert wird und dort die Synzytien-Bildung auslösen kann.

## 5 Zusammenfassung

Eine *in vivo* Modifizierung von Blutstammzellen wäre für eine Reihe gentherapeutischer Therapieansätze vorteilhaft. Dies würde voraussetzen, dass retrovirale Vektoren gezielt auf Blutstammzellen ausgerichtet werden können. Für dieses sogenannte Zelltargeting bietet sich das vom Milznekrose-Virus von Vögeln (SNV) abgeleitete Vektorsystem an, bei dem die Rezeptorbindungsdomäne des Env-Proteins modifiziert werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein SNV-basierter retroviraler Zelltargeting-Vektor entwickelt werden, der einen selektiven Gentransfer in die primären humanen CD34-positiven hämatopoetischen Zellen ermöglicht. Zur weitergehenden Charakterisierung des SNV-Vektorsystems sollte geklärt werden, ob das Env-Protein des SNV ein mit anderen  $\gamma$ -retroviralen Env-Proteinen vergleichbares R-Peptid aufweist, dessen mögliche Rolle bei viralem Zelleintritt ebenfalls untersucht werden sollte.

Um eine Zielzell-Spezifität des SNV-Vektors zu erreichen, wurde die gesamte SU-Domäne des SNV-Env-Proteins mit einem einkettigen Antikörperfragment (scFv) ersetzt, das gegen das CD34 Molekül gerichtet ist. Mit diesem modifizierten Env gelang es, [(antiCD34-TM)SNV]-Vektorpartikel herzustellen, die spezifisch CD34-positive Zellen transduzierten. Essentiell für die Erzeugung solcher Vektoren war die Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie, die Vektorpartikel mit einem Titer von  $2 \times 10^5$  i.E./ml produzierte. In Transduktionsexperimenten mit verschiedenen Zelllinien wurde gezeigt, dass [(antiCD34-TM)SNV]-Vektoren eine deutliche Präferenz für CD34<sup>+</sup>-Zellen und nicht für CD34<sup>-</sup>-Zellen besitzen, wobei der Unterschied in der Transduktionseffizienz zwischen CD34-positiven und -negativen Zellen um den Faktor 100 lag. [(antiCD34-TM)SNV]-Vektoren waren in der Lage, den Reportergenttransfer auch in primäre humane Stammzellen zu bewirken. Hierzu wurde ein Transduktionsprotokoll so optimiert, dass die aus dem Nabelschnurblut isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen transduziert werden konnten. Der für diese Zielzellen bestimmte Vektortiter betrug bis zu  $2 \times 10^6$  i.E./ml. In einem

Gemisch von primären CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>-</sup>-Zellen konnte der Vektor zwischen dem Target- und Nontarget-Zellen unterscheiden. Somit wurde zum ersten Mal nicht nur Spezifität, sondern auch Selektivität des SNV-Vektorsystems demonstriert. Dieses Ergebnis ist für eine Weiterentwicklung des Vektors für die *in vivo* Anwendung in Rahmen einer Gentherapie eine wichtige Voraussetzungen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Fusionsvorgang bei Virus-Eintritt näher untersucht. Anlass dafür war die experimentelle Beobachtung, dass das Env-Protein des SNV bei der Virusknospung von einer viralen Protease innerhalb der zytoplasmatischen Domäne proteolytisch gespalten wird. Ein Sequenz-Vergleich des SNV TM-Proteins mit dem MLV TM-Protein ergab Hinweise darauf, dass es sich um die Abspaltung des sogenannten R-Peptides analog zu MLV handeln könnte. Die Expression von SNV-Env- Mutanten mit einem entsprechend verkürzten C-Tail (Env $\Delta$ R) führte zur Synzytien-Bildung.

Die bildung hochfusogener Oberflächenhüllproteine durch die Abspaltung des R-Peptids konnte auch für andere  $\gamma$ -Retroviren gezeigt werden. Die Synzytienbildung konnte quantitativ unter den Env $\Delta$ R-Varianten verschiedener  $\gamma$ -Retroviren in einem etablierten Fusionsassay verglichen werden. Das Env $\Delta$ R des endogenen Retrovirus des Schweins (PERV) des Typs A erwies sich als potentestes Fusionsagens. Als Folge der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde postuliert, dass die Abspaltung des R-Peptides ein allgemeiner Mechanismus bei der Partikelreifung der  $\gamma$ -Retroviren ist und eine fusionsregulierende Rolle besitzt. Eine Weiterentwicklung fusionsaktiver Env-Varianten als mögliche therapeutische Gene für eine Tumor-Gentherapie ist somit diskutierbar.

## 6 Abkürzungen

|            |   |
|------------|---|
| Abb.       | Abbildung                                       |
| Aqua dest. | Aqua destillata                                 |
| AS         | Aminosäure                                      |
| bp         | Basenpaare                                      |
| °C         | Grad Celsius                                    |
| CA         | Kapsid Protein                                  |
| cDNA       | komplementäre DNA                               |
| DEPC       | Diethylpyrocarbonat                             |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid                                |
| DNA        | Desoxyribonukleinsäure                          |
| dNTP       | Desoxynukleosidtriphosphat                      |
| E. coli    | Escherichia coli                                |
| EDTA       | Ethylendiamintetraacetat                        |
| <i>env</i> | envelope ORF                                    |
| Env        | virale Glykoproteine, kodiert von <i>env</i>    |
| ER         | endoplasmatisches Retikulum                     |
| EtOH       | Ethanol   |
| FCS        | fötale Kälberserum                              |
| g          | Gramm   |
| G          | Guanosin  |
| G418       | Geneticin                                       |
| <i>gag</i> | group specific antigen ORF                      |
| Gag        | virale Strukturproteine, kodiert von <i>gag</i> |
| eGFP       | enhanced green fluorescence protein,            |
| h          | Stunde  |
| HIV        | Human Immunodeficiency Virus                    |
| hyg®       | Hygromycinresistenz                             |
| kb         | Kilobasen                                       |
| LTR        | lange terminale Repetition                      |
| µg         | Mikrogramm                                      |
| µl         | Mikroliter                                      |
| µmol       | Mikromol  |
| m          | Milli   |
| M          | Molar   |
| M813       | M813 Maus-Leukämievirus                         |
| MA         | Matrixprotein                                   |
| min        | Minute  |
| MESV       | Murine Embryonic Stem cell Virus                |
| MMTV       | Mouse Mammary Tumor Virus                       |
| Mo-MuLV    | Moloney Murine Leukemia Virus                   |
| MPEV       | Vektor basierend auf MPSV und MESV              |
| MPMV       | Mason Pfizer Monkey Virus                       |
| MPSV       | Myeloproliferatives Sarcoma Virus               |
| mRNA       | Boten-RNA                                       |
| MuLV       | Maus-Leukämieviren                              |
| n          | nano  |

|            |   |
|------------|---|
| NC         | Nukleokapsidprotein                                   |
| NaA        | c Natriumacetat                                       |
| neoR       | Geneticin-Resistenz                                   |
| ng         | Nanogramm   |
| OD         | optische Dichte                                       |
| ORF        | open reading frame, offener Leserahmen                |
| PCR        | polymerase chain reaction, Polymerase Ketten Reaktion |
| PBS        | Phosphatpuffer  |
| <i>pol</i> | Polymerase ORF  |
| Pol        | virale Replikationsenzyme, kodiert von <i>pol</i>     |
| RNA        | Ribonukleinsäure                                      |
| rpm        | rounds per minute, Umdrehungen pro Minute             |
| RT         | Reverse Transkriptase                                 |
| s          | Sekunde   |
| SDS        | Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat             |
| SFEV       | Vektor basierend auf SFFV und MESV                    |
| SFFV       | Spleen Focus Forming Virus                            |
| TE         | Tris/EDTA   |
| TBE        | Tris Borat EDTA                                       |
| Tris       | Trishydroxymethylaminomethan                          |
| U          | unit, Einheit   |
| UV         | ultraviolett  |
| V          | Volt  |
| VSV        | Vesicular Stomatitis Virus                            |
| w/v        | Gewichts-/Volumenverhältnis                           |
| w/w        | Gewichts-/Gewichtsverhältnis                          |



## 7 Literaturverzeichnis

- Abonour, R., Williams, D.A., Einhorn, L., Hall, K.M., Chen, J., Coffman, J., Traycoff, C.M., Bank, A., Kato, I., Ward, M., Williams, S.D., Hromas, R., Robertson, M.J., Smith, F.O., Woo, D., Mills, B., Srour, E.F. and Cornetta, K. (2000) Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med*, **6**, 652-658.
- Ager, S., Nilson, B.H., Morling, F.J., Peng, K.W., Cosset, F.L. and Russell, S.J. (1996) Retroviral display of antibody fragments; interdomain spacing strongly influences vector infectivity. *Hum Gene Ther*, **7**, 2157-2164.
- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M.G. and Bordignon, C. (2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, **296**, 2410-2413.
- Alam, J. and Cook, J.L. (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, **188**, 245-254.
- Anderson, W.F. (1992) Human gene therapy. *Science*, **256**, 808-813.
- Barrette, S. and Orlic, D. (2000) Alternative viral envelopes for oncoretroviruses to increase gene transfer into hematopoietic stem cells. *Curr Opin Mol Ther*, **2**, 507-514.
- Battini, J.L., Heard, J.M. and Danos, O. (1992) Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses. *J Virol*, **66**, 1468-1475.
- Bayard, B., Bisbal, C. and Lebleu, B. (1986) Activation of ribonuclease L by (2'-5')(A)4-poly(L-lysine) conjugates in intact cells. *Biochemistry*, **25**, 3730-3736.
- Benedict, C.A., Tun, R.Y., Rubinstein, D.B., Guillaume, T., Cannon, P.M. and Anderson, W.F. (1999) Targeting retroviral vectors to CD34-expressing cells: binding to CD34 does not catalyze virus-cell fusion. *Hum Gene Ther*, **10**, 545-557.
- Bevec, D., Dobrovnik, M., Hauber, J. and Bohnlein, E. (1992) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9870-9874.
- Blaese, R.M. and Culver, K.W. (1992) Gene therapy for primary immunodeficiency disease. *Immunodeficiency Rev*, **3**, 329-349.

- Braun, S.E., Chen, K., Blazar, B.R., Orchard, P.J., Sledge, G., Robertson, M.J., Broxmeyer, H.E. and Cornetta, K. (1999) Flt3 ligand antitumor activity in a murine breast cancer model: a comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and a potential mechanism of action. *Hum Gene Ther*, **10**, 2141-2151.
- Brody, B.A., Kimball, M.G. and Hunter, E. (1994) Mutations within the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus: loss of SU-TM association and effects on infectivity. *Virology*, **202**, 673-683.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, **371**, 37-43.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L. and Fischer, A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, **288**, 669-672.
- Chakrabarti, L., Emerman, M., Tiollais, P. and Sonigo, P. (1989) The cytoplasmic domain of simian immunodeficiency virus transmembrane protein modulates infectivity. *J Virol*, **63**, 4395-4403.
- Chambers, P., Pringle, C.R. and Easton, A.J. (1990) Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol*, **71** ( Pt 12), 3075-3080.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. and Kim, P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, **89**, 263-273.
- Chang, H.K., Gendelman, R., Lisziewicz, J., Gallo, R.C. and Ensoli, B. (1994) Block of HIV1 infection by a combination of antisense tat RNA and TAR decoys: a strategy for control of HIV1. *Gene Ther*, **1**, 208-216.
- Chang, L.J. and Stoltzfus, C.M. (1987) Inhibition of Rous sarcoma virus replication by antisense RNA. *J Virol*, **61**, 921-924.
- Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X. and Weissman, I.L. (1999) In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3120-3125.
- Chu, T.H. and Dornburg, R. (1995) Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer. *J Virol*, **69**, 2659-2663.
- Chu, T.H. and Dornburg, R. (1997) Toward highly efficient cell-type-specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies. *J Virol*, **71**, 720-725.

- Chu, T.H., Martinez, I., Olson, P. and Dornburg, R. (1995) Highly efficient eukaryotic gene expression vectors for peptide secretion. *Biotechniques*, **18**, 890-896, 898-899.
- Chu, T.H., Martinez, I., Sheay, W.C. and Dornburg, R. (1994) Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody- envelope fusion proteins. *Gene Ther*, **1**, 292-299.
- Cohen, F.S. and Melikyan, G.B. (2001) Implications of a fusion peptide structure. *Nat Struct Biol*, **8**, 653-655.
- Cosset, F.L., Morling, F.J., Takeuchi, Y., Weiss, R.A., Collins, M.K. and Russell, S.J. (1995a) Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain. *J Virol*, **69**, 6314-6322.
- Cosset, F.L. and Russell, S.J. (1996) Targeting retrovirus entry. *Gene Ther*, **3**, 946-956.
- Cosset, F.L., Takeuchi, Y., Battini, J.L., Weiss, R.A. and Collins, M.K. (1995b) High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol*, **69**, 7430-7436.
- Cui, Z.Z., Lee, L.F., Silva, R.F. and Witter, R.L. (1986) Monoclonal antibodies against avian reticuloendotheliosis virus: identification of strain-specific and strain-common epitopes. *J Immunol*, **136**, 4237-4242.
- Culver, K.W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E.H. and Blaese, R.M. (1992) In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, **256**, 1550-1552.
- Diaz, R.M., Bateman, A., Emiliusen, L., Fielding, A., Trono, D., Russell, S.J. and Vile, R.G. (2000) A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy. *Gene Ther*, **7**, 1656-1663.
- Dornburg, R. (1995) Reticuloendotheliosis viruses and derived vectors. *Gene Ther*, **2**, 301-310.
- Dornburg, R. (1997) From the natural evolution to the genetic manipulation of the host- range of retroviruses. *Biol Chem*, **378**, 457-468.
- Dougherty, J.P., Wisniewski, R., Yang, S.L., Rhode, B.W. and Temin, H.M. (1989) New retrovirus helper cells with almost no nucleotide sequence homology to retrovirus vectors. *J Virol*, **63**, 3209-3212.
- Duan, L., Zhu, M., Bagasra, O. and Pomerantz, R.J. (1995) Intracellular immunization against HIV1 infection of human T lymphocytes: utility of anti-rev single-chain variable fragments. *Hum Gene Ther*, **6**, 1561-1573.
- Duboise, S.M., Guo, J., Desrosiers, R.C. and Jung, J.U. (1996) Use of virion DNA as a cloning vector for the construction of mutant and recombinant herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11389-11394.

- Dunbar, C.E., Kohn, D.B., Schiffmann, R., Barton, N.W., Nolta, J.A., Esplin, J.A., Pensiero, M., Long, Z., Lockey, C., Emmons, R.V., Csik, S., Leitman, S., Krebs, C.B., Carter, C., Brady, R.O. and Karlsson, S. (1998) Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: in vivo detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther*, **9**, 2629-2640.
- Eiden, M.V., Farrell, K.B. and Wilson, C.A. (1996) Substitution of a single amino acid residue is sufficient to allow the human amphotropic murine leukemia virus receptor to also function as a gibbon ape leukemia virus receptor. *J Virol*, **70**, 1080-1085.
- Engelstadter, M., Bobkova, M., Baier, M., Stitz, J., Holtkamp, N., Chu, T.H., Kurth, R., Dornburg, R., Buchholz, C.J. and Cichutek, K. (2000) Targeting human T cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. *Hum Gene Ther*, **11**, 293-303.
- Engelstadter, M., Buchholz, C.J., Bobkova, M., Steidl, S., Merget-Millitzer, H., Willemsen, R.A., Stitz, J. and Cichutek, K. (2001) Targeted gene transfer to lymphocytes using murine leukaemia virus vectors pseudotyped with spleen necrosis virus envelope proteins. *Gene Ther*, **8**, 1202-1206.
- Ericsson, T.A., Takeuchi, Y., Templin, C., Quinn, G., Farhadian, S.F., Wood, J.C., Oldmixon, B.A., Suling, K.M., Ishii, J.K., Kitagawa, Y., Miyazawa, T., Salomon, D.R., Weiss, R.A. and Patience, C. (2003) Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6759-6764.
- Fass, D., Davey, R.A., Hamson, C.A., Kim, P.S., Cunningham, J.M. and Berger, J.M. (1997) Structure of a murine leukemia virus receptor-binding glycoprotein at 2.0 angstrom resolution. *Science*, **277**, 1662-1666.
- Fass, D., Harrison, S.C. and Kim, P.S. (1996) Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nat Struct Biol*, **3**, 465-469.
- Feng, M., Jackson, W.H., Jr., Goldman, C.K., Rancourt, C., Wang, M., Dusing, S.K., Siegal, G. and Curiel, D.T. (1997) Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. *Nat Biotechnol*, **15**, 866-870.
- Fielding, A.K., Chapel-Fernandes, S., Chadwick, M.P., Bullough, F.J., Cosset, F.L. and Russell, S.J. (2000) A hyperfusogenic gibbon ape leukemia envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display. *Hum Gene Ther*, **11**, 817-826.
- Fielding, A.K., Maurice, M., Morling, F.J., Cosset, F.L. and Russell, S.J. (1998) Inverse targeting of retroviral vectors: selective gene transfer in a mixed population of hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood*, **91**, 1802-1809.

- Forestell, S.P., Dando, J.S., Chen, J., de Vries, P., Bohnlein, E. and Rigg, R.J. (1997) Novel retroviral packaging cell lines: complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer. *Gene Ther*, **4**, 600-610.
- Frolov, I., Hoffman, T.A., Pragai, B.M., Dryga, S.A., Huang, H.V., Schlesinger, S. and Rice, C.M. (1996) Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11371-11377.
- Gallagher, W.R. (1996) Similar structural models of the transmembrane proteins of Ebola and avian sarcoma viruses. *Cell*, **85**, 477-478.
- Glorioso, J.C., DeLuca, N.A. and Fink, D.J. (1995) Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu Rev Microbiol*, **49**, 675-710.
- Gothot, A., van der Loo, J.C., Clapp, D.W. and Srour, E.F. (1998) Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood*, **92**, 2641-2649.
- Green, N., Shinnick, T.M., Witte, O., Ponticelli, A., Sutcliffe, J.G. and Lerner, R.A. (1981) Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6023-6027.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D. and Garten, W. (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV1 glycoprotein gp160. *Nature*, **360**, 358-361.
- Han, X., Kasahara, N. and Kan, Y.W. (1995) Ligand-directed retroviral targeting of human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9747-9751.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harrison, G.S., Long, C.J., Curiel, T.J., Maxwell, F. and Maxwell, I.H. (1992a) Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene. *Hum Gene Ther*, **3**, 461-469.
- Harrison, G.S., Long, C.J., Maxwell, F., Glode, L.M. and Maxwell, I.H. (1992b) Inhibition of HIV production in cells containing an integrated, HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **8**, 39-45.
- Higuchi, H., Bronk, S.F., Bateman, A., Harrington, K., Vile, R.G. and Gores, G.J. (2000) Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy. *Cancer Res*, **60**, 6396-6402.

- Hirsch, V.M., McGann, C., Dapolito, G., Goldstein, S., Ogen-Odoi, A., Biryawaho, B., Lakwo, T. and Johnson, P.R. (1993) Identification of a new subgroup of SIVagm in tantalus monkeys. *Virology*, **197**, 426-430.
- Hoffman, L.R., Kuntz, I.D. and White, J.M. (1997) Structure-based identification of an inducer of the low-pH conformational change in the influenza virus hemagglutinin: irreversible inhibition of infectivity. *J Virol*, **71**, 8808-8820.
- Hoogerbrugge, P.M., Vossen, J.M., v Beusechem, V.W. and Valerio, D. (1992) Treatment of patients with severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase (ADA) deficiency by autologous transplantation of genetically modified bone marrow cells. *Hum Gene Ther*, **3**, 553-558.
- Hopper, C., Sparkes, A., Gruffydd-Jones, T.J. and Harbour, D.A. (1988) Feline T-lymphotropic virus infection. *Vet Rec*, **122**, 590.
- Howell, J.C., Yoder, M.C. and Srour, E.F. (2002) Hematopoietic potential of murine skeletal muscle-derived CD45(-)Sca-1(+)-kit(-) cells. *Exp Hematol*, **30**, 915-924.
- Hughson, F.M. (1997) Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Curr Biol*, **7**, R565-569.
- Huston, J.S., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., McCartney, J., Warren, F., Haber, E. and Oppermann, H. (1991) Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol*, **203**, 46-88.
- Januszeski, M.M., Cannon, P.M., Chen, D., Rozenberg, Y. and Anderson, W.F. (1997) Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein. *J Virol*, **71**, 3613-3619.
- Jiang, A., Chu, T.H., Nocken, F., Cichutek, K. and Dornburg, R. (1998) Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies. *J Virol*, **72**, 10148-10156.
- Kabat, D. (1995) Targeting retroviral vectors to specific cells. *Science*, **269**, 417.
- Kasahara, N., Dozy, A.M. and Kan, Y.W. (1994) Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science*, **266**, 1373-1376.
- Kasid, A., Morecki, S., Aebersold, P., Cornetta, K., Culver, K., Freeman, S., Director, E., Lotze, M.T., Blaese, R.M., Anderson, W.F. and et al. (1990) Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 473-477.
- Kavanaugh, M.P., Wang, H., Boyd, C.A., North, R.A. and Kabat, D. (1994) Cell surface receptor for ecotropic host-range mouse retroviruses: a cationic amino acid transporter. *Arch Virol Suppl*, **9**, 485-494.

- Kewalramani, V.N., Panganiban, A.T. and Emerman, M. (1992) Spleen necrosis virus, an avian immunosuppressive retrovirus, shares a receptor with the type D simian retroviruses. *J Virol*, **66**, 3026-3031.
- Kiernan, R.E. and Freed, E.O. (1998) Cleavage of the murine leukemia virus transmembrane env protein by human immunodeficiency virus type 1 protease: transdominant inhibition by matrix mutations. *J Virol*, **72**, 9621-9627.
- Kim, J.W., Closs, E.I., Albritton, L.M. and Cunningham, J.M. (1991) Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature*, **352**, 725-728.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leavitt, M.C., Yu, M., Wong-Staal, F. and Looney, D.J. (1996) Ex vivo transduction and expansion of CD4<sup>+</sup> lymphocytes from HIV + donors: prelude to a ribozyme gene therapy trial. *Gene Ther*, **3**, 599-606.
- Levy-Mintz, P., Duan, L., Zhang, H., Hu, B., Dornadula, G., Zhu, M., Kulkosky, J., Bizub-Bender, D., Skalka, A.M. and Pomerantz, R.J. (1996) Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol*, **70**, 8821-8832.
- Liu, J.M., Kim, S., Read, E.J., Futaki, M., Dokal, I., Carter, C.S., Leitman, S.F., Pensiero, M., Young, N.S. and Walsh, C.E. (1999) Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther*, **10**, 2337-2346.
- Lu, D.R., Zhou, J.M., Zheng, B., Qiu, X.F., Xue, J.L., Wang, J.M., Meng, P.L., Han, F.L., Ming, B.H., Wang, X.P. and et al. (1993) Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B. *Sci China B*, **36**, 1342-1351.
- Lusher, J.M. (1999) Gene therapy for hemophilia A and B: patient selection and follow-up, requirements for a cure. *Thromb Haemost*, **82**, 572-575.
- Mann, R., Mulligan, R.C. and Baltimore, D. (1983) Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*, **33**, 153-159.
- Martinez, I. and Dornburg, R. (1995) Improved Retroviral Packaging Lines Derived from Spleen Necrosis Virus. *Virology*, **208**, 234-241.
- McClure, M.O., Sommerfelt, M.A., Marsh, M. and Weiss, R.A. (1990) The pH independence of mammalian retrovirus infection. *J Gen Virol*, **71** ( Pt 4), 767-773.

- Melikyan, G.B., Markosyan, R.M., Brener, S.A., Rozenberg, Y. and Cohen, F.S. (2000) Role of the cytoplasmic tail of ecotropic moloney murine leukemia virus Env protein in fusion pore formation. *J Virol*, **74**, 447-455.
- Mhashilkar, A.M., Biswas, D.K., LaVecchio, J., Pardee, A.B. and Marasco, W.A. (1997) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro by a novel combination of anti-Tat single-chain intrabodies and NF-kappa B antagonists. *J Virol*, **71**, 6486-6494.
- Miller, A.D. (1996) Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11407-11413.
- Miller, D.G., Adam, M.A. and Miller, A.D. (1990) Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol*, **10**, 4239-4242.
- Miller, D.G., Edwards, R.H. and Miller, A.D. (1994) Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 78-82.
- Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F.H. and Verma, I.M. (1997) Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10319-10323.
- Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Lyle, J.M. and Greaves, R.F. (1996) A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11321-11326.
- Moolten, F.L. (1986) Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res*, **46**, 5276-5281.
- Moolten, F.L. and Wells, J.M. (1990) Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst*, **82**, 297-300.
- Moolten, F.L., Wells, J.M., Heyman, R.A. and Evans, R.M. (1990) Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. *Hum Gene Ther*, **1**, 125-134.
- Moss, B. (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11341-11348.
- Mulligan, M.J., Yamshchikov, G.V., Ritter, G.D., Jr., Gao, F., Jin, M.J., Nail, C.D., Spies, C.P., Hahn, B.H. and Compans, R.W. (1992) Cytoplasmic domain truncation enhances fusion activity by the exterior glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 2 in selected cell types. *J Virol*, **66**, 3971-3975.



- Mulligan, R.C. (1993) The basic science of gene therapy. *Science*, **260**, 926-932.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. and Trono, D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, **272**, 263-267.
- Nemunaitis, J., Bohart, C., Fong, T., Meyer, W., Edelman, G., Paulson, R.S., Orr, D., Jain, V., O'Brien, J., Kuhn, J., Kowal, K.J., Burkeholder, S., Bruce, J., Ognoskie, N., Wynne, D., Martineau, D. and Ando, D. (1998) Phase I trial of retroviral vector-mediated interferon (IFN)-gamma gene transfer into autologous tumor cells in patients with metastatic melanoma. *Cancer Gene Ther*, **5**, 292-300.
- Nussbaum, O., Broder, C.C. and Berger, E.A. (1994) Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *J Virol*, **68**, 5411-5422.
- Ohno, S. (1985) Immunocytochemical study on the cytoplasmic side of cell membranes infected with vesicular stomatitis virus by quick-freezing and deep-etching replica method. *Histochemistry*, **82**, 565-575.
- Olson, P. and Dornburg, R. (1999) Capture of a recombination activating sequence from mammalian cells. *Gene Ther*, **6**, 1819-1825.
- Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S. and Garcia-Sastre, A. (1996) Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11354-11358.
- Parveen, Z., Krupetsky, A., Engelstadter, M., Cichutek, K., Pomerantz, R.J. and Dornburg, R. (2000) Spleen necrosis virus-derived C-type retroviral vectors for gene transfer to quiescent cells. *Nat Biotechnol*, **18**, 623-629.
- Podsakoff, G., Wong, K.K., Jr. and Chatterjee, S. (1994) Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol*, **68**, 5656-5666.
- Poeschla, E., Corbeau, P. and Wong-Staal, F. (1996) Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11395-11399.
- Potten, C.S. and M., L. (1997) *Stem Cells*. Academic Press, London.

- Purchase, H.G. and Witter, R.L. (1975) The reticuloendotheliosis viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, **71**, 103-124.
- Qiao, H., Pelletier, S.L., Hoffman, L., Hacker, J., Armstrong, R.T. and White, J.M. (1998) Specific single or double proline substitutions in the "spring-loaded" coiled-coil region of the influenza hemagglutinin impair or abolish membrane fusion activity. *J Cell Biol*, **141**, 1335-1347.
- Ragheb, J.A. and Anderson, W.F. (1994) pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: implications for the role of the R peptide and p12E TM in viral entry. *J Virol*, **68**, 3220-3231.
- Ramezani, A., Ding, S.F. and Joshi, S. (1997) Inhibition of HIV1 replication by retroviral vectors expressing monomeric and multimeric hammerhead ribozymes. *Gene Ther*, **4**, 861-867.
- Raper, S.E. and Wilson, J.M. (1993) Cell transplantation in liver-directed gene therapy. *Cell Transplant*, **2**, 381-400; discussion 407-310.
- Rasko, J.E., Battini, J.L., Gottschalk, R.J., Mazo, I. and Miller, A.D. (1999) The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2129-2134.
- Rein, A., Mirro, J., Haynes, J.G., Ernst, S.M. and Nagashima, K. (1994) Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein. *J Virol*, **68**, 1773-1781.
- Reiprich, S., Gundlach, B.R., Fleckenstein, B. and Uberla, K. (1997) Replication-competent chimeric lenti-oncovirus with expanded host cell tropism. *J Virol*, **71**, 3328-3331.
- Rice, N.R., Henderson, L.E., Sowder, R.C., Copeland, T.D., Oroszlan, S. and Edwards, J.F. (1990) Synthesis and processing of the transmembrane envelope protein of equine infectious anemia virus. *J Virol*, **64**, 3770-3778.
- Ritter, G.D., Jr., Mulligan, M.J., Lydy, S.L. and Compans, R.W. (1993) Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. *Virology*, **197**, 255-264.
- Robertson, E.S., Ooka, T. and Kieff, E.D. (1996) Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11334-11340.
- Russell, S.J., Hawkins, R.E. and Winter, G. (1993) Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1081-1085.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic

- sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Salmons, B. and Gunzburg, W.H. (1993) Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*, **4**, 129-141.
- Sanchez, M.J., Holmes, A., Miles, C. and Dzierzak, E. (1996) Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity*, **5**, 513-525.
- Sanes, J.R., Rubenstein, J.L. and Nicolas, J.F. (1986) Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *Embo J*, **5**, 3133-3142.
- Schnierle, B.S., Stitz, J., Bosch, V., Nocken, F., Merget-Millitzer, H., Engelstadter, M., Kurth, R., Groner, B. and Cichutek, K. (1997) Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8640-8645.
- Schultz, A. and Rein, A. (1985) Maturation of murine leukemia virus env proteins in the absence of other viral proteins. *Virology*, **145**, 335-339.
- Sheay, W., Nelson, S., Martinez, I., Chu, T.H., Bhatia, S. and Dornburg, R. (1993) Downstream insertion of the adenovirus tripartite leader sequence enhances expression in universal eukaryotic vectors. *Biotechniques*, **15**, 856-862.
- Smith, C., Lee, S.W., Wong, E., Gallardo, H., Page, K., Gaspar, O., Lebkowski, J. and Gilboa, E. (1996) Transient protection of human T-cells from human immunodeficiency virus type 1 infection by transduction with adeno-associated viral vectors which express RNA decoys. *Antiviral Res*, **32**, 99-115.
- Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Campbell, K. and Haseltine, W.A. (1986) Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature*, **322**, 470-474.
- Somia, N.V., Zoppe, M. and Verma, I.M. (1995) Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to in vivo gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7570-7574.
- Spies, C.P., Ritter, G.D., Jr., Mulligan, M.J. and Compans, R.W. (1994) Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein alters the conformation of the external domain. *J Virol*, **68**, 585-591.
- Stewart, A.K., Lassam, N.J., Graham, F.L., Gauldie, J., Addison, C.L., Bailey, D.J., Dessureault, S., Dube, I.D., Gallenger, S., Krajden, M., Rotstein, L.E., Quirt, I.C. and Moen, R. (1997) A phase I study of adenovirus

- mediated gene transfer of interleukin 2 cDNA into metastatic breast cancer or melanoma. *Hum Gene Ther*, **8**, 1403-1414.
- Stewart, P.L., Fuller, S.D. and Burnett, R.M. (1993) Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J*, **12**, 2589-2599.
- Strauss, L.C., Trischmann, T.M., Rowley, S.D., Wiley, J.M. and Civin, C.I. (1991) Selection of normal human hematopoietic stem cells for bone marrow transplantation using immunomagnetic microspheres and CD34 antibody. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, **13**, 217-221.
- Stroncek, D.F., Hubel, A., Shankar, R.A., Burger, S.R., Pan, D., McCullough, J. and Whitley, C.B. (1999) Retroviral transduction and expansion of peripheral blood lymphocytes for the treatment of mucopolysaccharidosis type II, Hunter's syndrome. *Transfusion*, **39**, 343-350.
- Swanstrom, R., DeLorbe, W.J., Bishop, J.M. and Varmus, H.E. (1981) Nucleotide sequence of cloned unintegrated avian sarcoma virus DNA: viral DNA contains direct and inverted repeats similar to those in transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 124-128.
- Taylor, C.S., Nouri, A., Lee, C.G., Kozak, C. and Kabat, D. (1999) Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 927-932.
- Temin, H.M. (1986) Retrovirus vectors for gene transfer: efficient integration into and expression of exogenous DNA in vertebrate cell genomes. In Kucherlapati, R. (ed.), *Gene Transfer*. Plenum Press, New York, pp. 144-187.
- Thierry, A.R. and Dritschilo, A. (1992) Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5691-5698.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tubiana, M. (1991) The scientific bases of cancer management: at the interface between fundamental research and clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol*, **117**, 275-289.
- van Zeijl, M., Johann, S.V., Closs, E., Cunningham, J., Eddy, R., Shows, T.B. and O'Hara, B. (1994) A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1168-1172.
- Wang, H., Kavanaugh, M.P., North, R.A. and Kabat, D. (1991) Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature*, **352**, 729-731.

- Wang, W., Jobbagy, Z., Bird, T.H., Eiden, M.V. and Anderson, W.B. (2005) Cell signaling through the protein kinases cAMP-dependent protein kinase, protein kinase Cepsilon, and RAF-1 regulates amphotropic murine leukemia virus envelope protein-induced syncytium formation. *J Biol Chem*, **280**, 16772-16783.
- Watanabe, S. and Temin, H.M. (1983) Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vectors. *Mol Cell Biol*, **3**, 2241-2249.
- White, J.M. (1990) Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu Rev Physiol*, **52**, 675-697.
- Whitlow, M., Bell, B.A., Feng, S.L., Filpula, D., Hardman, K.D., Hubert, S.L., Rollence, M.L., Wood, J.F., Schott, M.E., Milenic, D.E. and et al. (1993) An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng*, **6**, 989-995.
- Wilson, C.A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C.E., Rose, T.M. and Burd, P. (1998) Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol*, **72**, 3082-3087.
- Wolff, J.A., Fisher, L.J., Xu, L., Jinnah, H.A., Langlais, P.J., Iuvone, P.M., O'Malley, K.L., Rosenberg, M.B., Shimohama, S., Friedmann, T. and et al. (1989) Grafting fibroblasts genetically modified to produce L-dopa in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9011-9014.
- Wyatt, R. and Sodroski, J. (1998) The HIV1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, **280**, 1884-1888.
- Yajima, T., Kanda, T., Yoshiike, K. and Kitamura, Y. (1998) Retroviral vector targeting human cells via c-Kit-stem cell factor interaction. *Hum Gene Ther*, **9**, 779-787.
- Yang, C. and Compans, R.W. (1997) Analysis of the murine leukemia virus R peptide: delineation of the molecular determinants which are important for its fusion inhibition activity. *J Virol*, **71**, 8490-8496.
- Yao, S.N., Wilson, J.M., Nabel, E.G., Kurachi, S., Hachiya, H.L. and Kurachi, K. (1991) Expression of human factor IX in rat capillary endothelial cells: toward somatic gene therapy for hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8101-8105.
- Yoder, M.C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D.M. and Orlic, D. (1997) Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity*, **7**, 335-344.

- Yu, J.S., Burwick, J.A., Dranoff, G. and Breakefield, X.O. (1997) Gene therapy for metastatic brain tumors by vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced tumor cells. *Hum Gene Ther*, **8**, 1065-1072.
- Zhao, Y., Lee, S. and Anderson, W.F. (1997) Functional interactions between monomers of the retroviral envelope protein complex. *J Virol*, **71**, 6967-6972.
- Zhao, Y., Zhu, L., Lee, S., Li, L., Chang, E., Soong, N.W., Douer, D. and Anderson, W.F. (1999) Identification of the block in targeted retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4005-4010.
- Zingler, K. and Littman, D.R. (1993) Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein increases env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J Virol*, **67**, 2824-2831.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

|                     |                               |
|---------------------|-------------------------------|
| Name                | Maria Bobkova                 |
| Geburtstag          | 08.08.1973                    |
| Geburtsort          | Rybinsk, Russische Föderation |
| Staatsangehörigkeit | Russisch                      |
| Familienstand       | verheiratet, 1 Tochter        |

### Schulbildung

|           |   |
|-----------|---|
| 1980-1990 | Gymnasium in Puschtschino, Russische Föderation<br>Abschlusszeugnis mit Auszeichnung (goldene Medaille) |
|-----------|---|

### Studium

|           |   |
|-----------|---|
| 1991-1994 | Hochschulstudium der Fachrichtung Biologie-Diplom an der Lomonossov-Universität, Moskau, Russische Föderation (Fachbereich Molekularbiologie)   |
| 1994-1995 | Deutschsprachkurse an der VHS Frankfurt (Zertifikat "Deutsch als Fremdsprache")   |
| 1995-1997 | Hochschulstudium der Biologie an der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt a. M. (Hauptfach Biochemie, Nebenfächer: Genetik und Mikrobiologie)  |
| 1997      | Diplomarbeit am Paul-Ehrlich Institut, Langen unter Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek. Thema: „Gezielter Gentransfer in Mammacarzinom-Zellen mit SNV Vektoren“  |
| 1998-2001 | Promotion in der Abteilung Medizinische Biotechnologie im Paul-Ehrlich Institut unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek. Thema: „Spezifischer Gentransfer in die primären humanen CD34+ Zellen mit Hilfe von SNV-abgeleiteten retroviralen Vektoren.“ |
| Seit 2002 | Leiterin der Abteilung Molekularbiologie bei IEP Innovative Enzyme Plus GmbH, Wiesbaden   |

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

**„Entwicklung von retroviralen Vektoren zum selektiven Gentransfer in hämatopoetische Vorläuferzellen und Untersuchungen zur R-Peptid vermittelten Membranfusion bei  $\gamma$ -Retroviren.“**

selbstständig angefertigt, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt, den 17. Juni 2008

Maria Bobkova